Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* y la influencia de su inoculación sobre la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa

Tesis de Licenciatura en Biología – Orientación: Microbiología

Lucía Braga

Orientadora: María Lis Yanes

Laboratorio de Ecología Microbiana - IIBCE

Agradecimientos:

A Lis, por ser una persona divina, por su paciencia, por su orientación, por la ayuda y el conocimiento brindados y por la dedicación que puso para que este trabajo saliera.

A los compañeros del LEM, Micromol y BIOGEM por la buena disposición para ayudar cuando necesité una mano y por los buenos momentos vividos tanto adentro como afuera del laboratorio.

A Claudia y a Elena, por su comprensión y su aguante mientras escribía la tesina.

A la ANII por la ayuda económica brindada durante la realización de este trabajo mediante el programa de becas de iniciación a la investigación. Al productor rural que nos brindó el predio para realizar el ensayo y al laboratorio de suelos del INIA por los análisis del suelo.

A María Morel y a María Inés Siri, por su aceptación para formar parte del tribunal de la tesina.

A mis queridos amigos, que están en todos los momentos, los malos, los buenos y los más o menos, que me ¨bancaron la cabeza¨ mientras no sabía que hacer de la vida. No podría tener mejores amigos que ustedes.

A mis hermanas de la vida, Maite, Gise y Andre, por todo lo compartido, por ser mis consejeras, por quererme y cuidarme.

A mi tía Graciela, a mi tío Micky, a mis primas Mayte y Sofi, a mi hermano Maxi, a los “tíos” Alfredo, Paula, Pertu y Ale, por la paciencia y por no preguntarme en cada asado/cena/almuerzo/cumpleaños: y… ¿cuándo terminas la tesis? Pero, sobre todo por quererme tanto. A la Juli, por trasmitirme su alegría.

A mis padres y mi tío José, por su apoyo incondicional en la vida, por su paciencia, por su protección, pero por encima de todo, por el amor que me dan en cada momento.

Índice

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Resumen

1. Introducción ***1 – 26***

1.1 Las leguminosas forrajeras 1

1.2 Alfalfa: Enfermedades de implantación y estrategias de control 2

1.3 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal 4

1.4 *Pseudomonas* Fluorescentes 7

1.5 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal presentes en *Pseudomonas* fluorescentes 7

1.5.1 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal 8

Producción de Ácido Indolacético 8

Solubilización de Fosfato inorgánico 9

Mineralización de Fosfato orgánico 9

Absorción de Hierro 10

1.5.2 Mecanismos de Control Biológico 11

Competencia por Nicho Ecológico y Nutrientes 12

Producción de compuestos antimicrobianos 14

Resistencia Sistémica Inducida 17

1.6 Utilización de Inoculantes microbianos para el control de plagas 18

1.7 Métodos de estudio de las comunidades microbianas 21

2. Antecedentes ***27***

OBJETIVOS ***28***

3. Estrategia de Trabajo ***29***

4. Materiales y Métodos ***30 – 40***

4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo 30

4.2 Evaluación de las características de promoción del crecimiento vegetal 31

4.2.1 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal 31

Detección de la producción de Ácido Indolacético 31

Detección de la solubilización de fosfato inorgánico ($Ca_3(PO_4)_2$) 31

Mineralización de fosfato orgánico (fitato de sodio) 32

4.2.2 Mecanismos Indirectos de Promoción del Crecimiento Vegetal 32

Ensayos de Antagonismo *in vitro* 32

Producción de HCN (ácido cianhídrico) 33

Detección de Celulasas 33

4.3 Ensayos de Protección de Enfermedad y Promoción del Crecimiento Vegetal en alfalfa por la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 en condiciones de campo 34

4.3.1 Preparación del inoculante 34

4.3.2 Sobrevivencia en Turba 34

4.3.3 Bacterización de las semillas de alfalfa utilizando turba como soporte 34

4.3.4 Recuentos bacterianos en semillas de alfalfa bacterizadas 35

4.3.5 Ensayos en condiciones de campo 35

Recuento de las plantas de alfalfa 37

Colonización de la raíz por la cepa *P. fluorescens* C119 37

Peso seco de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa 37

Evaluación del contenido de fósforo y nitrógeno de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa 38

4.4 Impacto de la inoculación de *P. fluorescens* C119 en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa 38

4.4.1 Extracción de ADN de la rizósfera de alfalfa 38

4.4.2 Amplificación de gen de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano 39

4.4.3 Análisis por DGGE de la comunidad bacteriana rizosférica 39

4.5 Análisis estadístico 40

5. Resultados ***41 – 54***

5.1 Evaluación de los posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal y de la actividad antagónica de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 41

5.1.1 Ensayos de antagonismo *in vitro* 41

5.1.2 Análisis de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal 41

5.1.3 Análisis de los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal 43

5.2 Ensayos en condiciones de campo: Evaluación de la protección frente a enfermedad y promoción del crecimiento vegetal en alfalfa por la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 44

5.2.1 Condiciones iniciales del ensayos de campo 44

5.2.2 Emergencia e implantación de la alfalfa 44

5.2.3 Colonización de la raíz 45

5.2.4 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal 46

Peso seco de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa 46

Análisis de los contenidos de fósforo y nitrógeno de la biomasa aérea 47

5.3 Impacto de la inoculación de la cepa *P. fluorescens* C119 en la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa 49

5.3.1 Extracción de ADN de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa 49

5.3.2 Amplificación por PCR del gen del ARNr 16 49

5.3.3 Análisis por DGGE 50

6. Discusión ***55 – 64***

6.1 Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal y biocontrol presentes en la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 55

6.2 Promoción del crecimiento vegetal y protección de enfermedad de la cepa Pseudomonas fluorescens C119 sobre la alfalfa (*Medicago sativa L*) en condiciones de campo 58

6.2.1 Evaluación de la técnica de inoculación 58

6.2.2 Capacidad biocontroladora y promotora del crecimiento vegetal de la cepa *P. fluorescens* C119 59

6.3 Impacto de la inoculación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 en la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa 62

7. Conclusiones y Perspectivas *65*

8. Bibliografía *66 – 72*

Apéndice I: Abreviaturas *73 – 74*

Apéndice II: Medios de Cultivo *75 – 76*

Índice de Tablas

Tabla 1-	Rango óptimo de macronutrientes y micronutrientes en plantas de alfalfa en estado vegetativo.	**3**
Tabla 2 -	Recopilación de artículos que describen el impacto de la introducción de un inoculante microbiano en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta hospedera.	**20**
Tabla 3 -	Métodos moleculares de estudio de las comunidades microbianas.	**24**
Tabla 4 -	Microorganismos utilizados en este trabajo.	**30**
Tabla 5 -	Porcentaje de inhibición del crecimiento de diferentes fitopatógenos frente a *P. fluorescens* C119.	**41**
Tabla 6 -	Características fisicoquímicas y textura del suelo utilizado para el ensayo de alfalfa.	**44**

Índice de Figuras

Figura 1 -	Diagrama explicando los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal presentes en las PGPRs.	**6**
Figura 2 -	Predio donde se realizó el ensayo de campo.	**36**
Figura 3 -	Esquema del diseño experimental del ensayo de campo realizado.	**36**
Figura 4 -	Producción de AIA.	**41**
Figura 5 -	Solubilización de fosfato inorgánico.	**42**
Figura 6 -	Mineralización de fosfato orgánico.	**43**
Figura 7 -	Producción de HCN.	**43**
Figura 8 -	Número de plantas de alfalfa que sobrevivieron a lo largo del ensayo.	**45**
Figura 9 -	Gráfico de la colonización de la raíz de alfalfa por la cepa *P. flourescens* C119.	**46**
Figura 10-	Porcentaje del peso seco de la biomasa aérea por metro lineal de plantas.	**47**
Figura 11 -	Gráfico del contenido de fósforo y nitrógeno de la biomasa aérea.	**48**
Figura 12 -	Electroforesis en gel de agarosa de algunas de las extracciones de ADN total a partir de muestras de rizósfera.	**49**
Figura 13 -	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* obtenido del ADN total de suelo rizosférico de los muestreos 1 y 2.	**50**
Figura 14 -	Gel de DGGEde los productos de PCR para Bacteria.	**51**
Figura 15 -	Dendograma obtenido a partir del análisis por DGGE de la comunidad bacteriana del suelo rizósferico de alfalfa.	**53**
Figura 16 -	Se muestran los datos de DGGE analizados por PCA.	**54**

Resumen

El control biológico de enfermedades de plantas se presenta como una alternativa promisoria para la aplicación de prácticas de producción sustentables, permitiendo utilizar de manera racional los recursos naturales así como reducir el uso de pesticidas. La alfalfa (*Medicago sativa L*.) es una leguminosa forrajera con una excelente capacidad de producción de forraje y persistencia. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables para una rápida emergencia y establecimiento de las plantas, se observa una alta incidencia de enfermedades de implantación como el *damping-off* producido por patógenos del suelo. Dichas enfermedades son un factor limitante en el mantenimiento de alfalfares productivos, ya que esto solo se obtiene si se han establecido un buen número de plantas durante el primer año de cultivo. La implantación de la alfalfa puede ser mejorada mediante la aplicación de microorganismos antagonistas rizosféricos como *Pseudomonas* fluorescentes. Estas han sido catalogadas numerosas veces como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (*PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) dado que son capaces de estimular el crecimiento de las plantas y/o disminuir el daño provocado por patógenos. A partir de una colección de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de la rizósfera de alfalfa se obtuvo una cepa con características de agente de control biológico, la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119. En este trabajo se evaluó la capacidad de esta cepa de antagonizar *in vitro* microorganismos fitopatógenos y la de producir diferentes compuestos que promueven el crecimiento de las plantas. Por otro lado, se introdujo la cepa C119 en un cultivo de alfalfa y se evaluó si ésta era capaz de proteger y promover el crecimiento vegetal de las plantas en condiciones de campo. Se observó que la cepa C119 fue capaz de promover el crecimiento vegetal de la alfalfa en un 40% sin tener incidencia sobre la comunidad microbiana de la rizósfera de la planta, por lo que

se la considera una cepa promisoria a ser utilizada como inoculante para promover el crecimiento de este tipo de cultivo.

1. Introducción

La intensificación de la agricultura y la demanda de la obtención de una mayor productividad en los cultivos han llevado a los productores a un importante aumento en el uso de agroquímicos, ya que es un método relativamente confiable tanto para la fertilización de los cultivos así como para el control de plagas. Sin embargo, su uso en exceso ha tenido consecuencias negativas, como el desarrollo de resistencia a los pesticidas en algunos fitopatógenos, contaminación de suelos y cursos de agua o la acumulación de residuos tóxicos en productos alimenticios (Gerhardson, 2002; Ristaino & Thomas, 1997). A la gran cantidad de enfermedades con importancia económica para las cuales las soluciones químicas son poco efectivas, de excesivo costo o en algunos casos inexistentes, se le suma la creciente demanda del público por alimentos libres de agroquímicos. Estos hechos han llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías que sustituyan o reduzcan el uso de los productos químicos, posibilitando una agricultura menos agresiva para el ambiente y contribuyendo a su sustentabilidad (Alabouvette, 2006). Dichas alternativas deben asegurar un elevado rendimiento de los cultivos y simultáneamente deben proteger la salud de los suelos (Altier, 1996).

Dentro de estas alternativas, entre las cuales se incluyen prácticas culturales saludables, se encuentra el agregado de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (McSpadden – Gardener & Fravel, 2002). Esta estrategia se basa en el agregado de bacterias benéficas para las plantas, lo cual permitiría la promoción del crecimiento de los cultivos y/o su protección frente al ataque de fitopatógenos, complementando o sustituyendo la aplicación de fertilizantes y pesticidas.

1.1 Las leguminosas forrajeras

Las leguminosas forrajeras juegan un papel fundamental en la agricultura de nuestro país, ya que son una fuente muy importante de alimento de alta calidad para el ganado. Su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, en asociación simbiótica con rizobios, les confiere un efecto beneficioso sostenido en la rotación de los cultivos. Sin embargo, la producción de leguminosas forrajeras sufre importantes pérdidas debidas a patógenos presentes en el suelo (Altier, 1996). Algunos de estos, especialmente aquellos pertenecientes a los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, ejercen sus efectos adversos sobre todo en la etapa de implantación o establecimiento de la pastura, produciendo enfermedades de tipo podredumbre de raíz y *damping-off* de pre- y post- emergencia. Los productos químicos para el tratamiento de semillas y determinadas prácticas de manejo de los cultivos han sido las estrategias utilizadas tradicionalmente para el control de las mencionadas enfermedades (Altier, 1996).

Dentro de las especies forrajeras que componen nuestras praderas, se destacan el lotus, el trébol blanco, el trébol rojo y la alfalfa.

1.2 Alfalfa: enfermedades de implantación y estrategias de control.

La alfalfa presenta una capacidad de producción de forraje y persistencia superior a las restantes leguminosas forrajeras (Formoso, 2000). Esta especie forrajera ha venido creciendo en importancia en los últimos años en los sistemas de producción intensivos, principalmente invernada de vacunos y producción lechera. Se trata de una leguminosa perenne de alto potencial productivo, que provee excelente calidad nutricional y persiste por varios años si se la maneja adecuadamente. Además, su resistencia a la sequía le permite suministrar forraje durante el verano (Rebuffo, 2000).

La alfalfa es muy exigente en cuanto a la calidad del suelo, requiere pH neutro, texturas medias a livianas, buen drenaje y profundidad con alta disponibilidad de fósforo, para poder expresar todo su potencial productivo (Rebuffo, 2000). El fósforo es un macronutriente de alto

impacto en la calidad, productividad y persistencia del cultivo por lo que se hace necesario administrarlo en grandes cantidades mediante fertilizantes fosfatados (Morón, 2000). El nitrógeno, es obtenido mediante la asociación simbiótica con *Sinorhizobium meliloti.* Al parecer la fijación biológica de nitrógeno (FBN) estaría influenciada por la disponibilidad de fósforo en el suelo (Schulze & Drevon 2005). Otros nutrientes importantes para la alfalfa son el potasio, el magnesio y el azufre (tabla 1).

Tabla 1 - Rango óptimo de macronutrientes y micronutrientes en plantas de alfalfa en estado vegetativo. Corresponde a los primeros 15 cm de la parte aérea (Rebuffo, 2000)

Macronutriente	Rango óptimo (%)	Micronutriente	Rango óptimo (mg/Kg)
N	4.5-5.0	**Mn**	31-100
S	0.26-0.50	**Zn**	21-70
P	0.26-0.70	**Cu**	jul-30
Mg	0.30-1.0	**B**	30-80
Ca	1.8-3.0	**Mo**	1.0-5.0
K	2.0-3.5	**Fe**	30-250

Para poder explotar al máximo las ventajas de esta leguminosa, es sumamente importante que la mayor cantidad de semillas posible sobrevivan a la etapa de establecimiento. Esto se debe a que las posibilidades de obtener una buena producción de forraje, son mayores si se ha logrado establecer un buen número de plantas durante el primer año del cultivo (Rebuffo, 2000).

El establecimiento de alfalfares productivos se ve principalmente afectado por la aparición de enfermedades como el *damping-off* causado por fitopatógenos oportunistas, principalmente pertenecientes al género *oomycetes*, cuando las condiciones ambientales favorecen la

aparición de enfermedad, es decir cuando la temperatura es cercana a los 10°C y se establecen condiciones de alta humedad. Existe un período crítico de 15-20 días post-siembra, en el cual las plántulas y las semillas son especialmente susceptibles a dicho patógeno, causando muerte de la planta en pre y post emergencia (Altier, 2000).

En este tipo de cultivo la aplicación de fungicidas es poco utilizada, aunque se han obtenido variedades de alfalfa genéticamente resistentes a fitopatógenos, como *Fusarium* y *Phytophtora*, no se han obtenido para la especie *Phythium* (Lamb et al., 2006; Li & Brummer 2012)

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal para controlar las enfermedades de plantas y mejorar el rendimiento de los cultivos, podría remplazar y/o reducir el uso de los pesticidas químicos y los fertilizantes, convirtiéndose así, en una alternativa atractiva para el manejo de enfermedades en este tipo de cultivo. Algunos ejemplos de bacterias rizosféricas antagónicas que mostraron una mejora en la implantación de la alfalfa luego de su inoculación son *Bacillus* spp. (Jo Handelsman et al., 1990), *Streptomyces* spp. (Xiao et al., 2002) y *Pseudomonas* spp. (Villacieros et al., 2003; Guiñazú et al., 2010; Yanes et al., 2012).

1.3 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (en inglés PGPB: *Plant Growth Promoting Bacteria*) están asociadas a muchas especies vegetales y se presentan comúnmente en casi todos los ambientes (Compant et al., 2005). El grupo de PGPBs más estudiado es el de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (en inglés PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), que colonizan la rizósfera (Kloepper et al., 1987).

La rizósfera es la estrecha zona de suelo que rodea las raíces y es afectada por las mismas. Esta zona se caracteriza por una intensa actividad microbiana que puede ser entre 10 y 1000 veces superior que en el suelo sin vegetación. Las plantas depositan entre el 5 y el 21% de sus

fotosintatos en la rizósfera a través de las raíces, lo cual sugiere un relacionamiento muy evolucionado entre la planta y los microorganismos rizosféricos (Haas & Défago 2005; Lugtenberg & Kamilova 2009).

De acuerdo al efecto producido sobre la planta, la interacción con los microorganismos puede ser clasificada como patogénica, saprofítica o benéfica (Lugtemberg et al., 2002). Los microorganismos patógenos, pueden afectar hojas, tallos y raíces. Los saprófitos viven en tejido muerto y juegan un papel importante en el reciclado de los materiales y el compost.

Los microorganismos benéficos tienen un efecto promotor del crecimiento sobre las plantas a las cuales están asociados. Este efecto promotor puede clasificarse en directo o indirecto (Bashan & Holguin, 1997). Los mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal son aquellos que facilitan la adquisición de nutrientes por las raíces, como por ejemplo, la solubilización de fosfato mineral, la fijación de nitrógeno atmosférico, y la producción de hormonas vegetales que favorecen el desarrollo radicular. Por otro lado, los mecanismos indirectos hacen referencia al control biológico de patógenos que afectan el desarrollo de la planta hospedero (Bashan & Holguin, 1997). Estos microorganismos benéficos a su vez, consumen los nutrientes depositados por las plantas en la rizósfera (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Se ha postulado que las plantas reclutan activamente microorganismos rizosféricos benéficos para contrarrestar ataques de organismos patogénicos (Mendes et al., 2011).

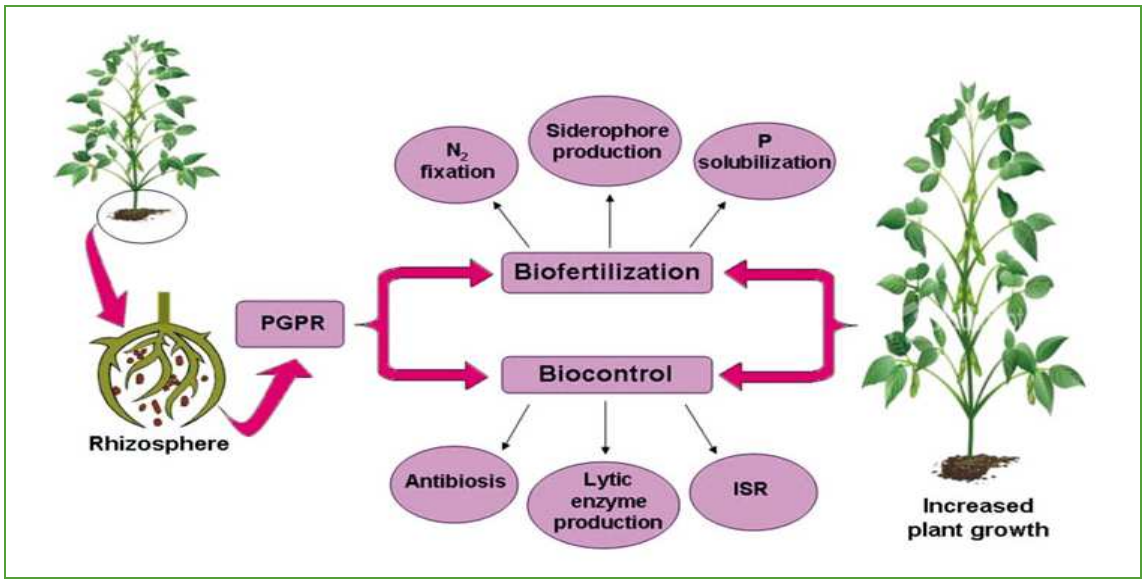

Figura 1 - Diagrama explicando los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal presentes en las PGPRs: biofertilización y biocontrol de fitopatógenos. ISR: Resistencia Sistémica Inducida, del inglés: *Induced Systemic Resistance* (Kumar, Prakash & Johri, 2011).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, pueden tener potencial aplicación para mejorar el rendimiento de los cultivos a nivel agronómico. Según la acción promotora que ejerzan sobre las plantas, estos microorganismos también pueden ser clasificados como: biofertilizantes (brindan a la planta nutrientes; por ejemplo los rizobios, que proveen a la planta de nitrógeno), fitoestimulantes (por ejemplo rizobacterias productoras de auxinas), rizoremediadores (los cuales degradan contaminantes y utilizan los exudados de la raíz como fuente de carbono) y biopesticidas (bacterias antagonistas de patógenos) (Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Haas & Défago, 2005; Trabelsi & Mhamdi, 2013) (Figura 1).

Entre la amplia gama de microorganismos rizosféricos que afectan la actividad y población de los patógenos, se destacan las *Pseudomonas* fluorescentes. Estas bacterias tienen una alta velocidad de crecimiento (Bowen & Rovira, 1976) y colonizan la rizósfera rápidamente (O'Sullivan y O'Gara, 1992). Además, producen metabolitos secundarios antimicrobianos de amplia acción y en general son compatibles con otros microorganismos controladores (Bagnasco et al., 1998)

1.4 *Pseudomonas* fluorescentes

Los miembros del género *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas en forma de bastones. Se caracterizan por una amplia flexibilidad metabólica y respiración aeróbica, aunque algunas cepas pueden respirar anaeróbicamente fermentando arginina y utilizando al nitrato como aceptor final de electrones (*P. aeruginosa*). Poseen uno o varios flagelos polares, lo que les confiere movilidad. Su genoma tiene un alto contenido GC, entre el 59-68% del mismo (Haas & Défago, 2005). Dentro de este género, el grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes es el más estudiado.

El grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes está compuesto por las especies *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* (cuatro biotipos), *P. putida* (dos biotipos), y las especies fitopatógenas *P. cichorii y P. syringae.*

Las *Pseudomonas* fluorescentes están ampliamente distribuidas en la rizósfera, y comúnmente ayudan a suprimir o evitar el esparcimiento de enfermedades causadas por fitopatógenos (Dwivedi y Johri 2003). Se caracterizan por producir un pigmento amarillo-verdoso, que corresponde a los sideróforos de tipo pioverdina, moléculas quelantes del hierro que se producen cuando dicho mineral escasea en el ambiente. Este pigmento florece cuando es expuesto a radiación UV (Meyer & Abdallah, 1978).

1.5 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal presentes en *Pseudomonas* fluorescentes

Las *Pseudomonas* fluorescentes han sido extensamente reportadas como PGPR. Se han identificado mecanismos que generan un aumento de la disponibilidad de nutrientes del suelo hacia las plantas, producción de fitohormonas y producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, lo cual tendría un efecto positivo sobre el crecimiento de las mismas (Haas & Défago, 2005). A su vez se ha visto que no interfieren con la simbiosis de los rizobios

(Villacieros et al., 2003; De La Fuente et al., 2002), por lo que la inoculación de las *Pseudomonas* fluorescentes no tendría efectos negativos sobre la fijación de nitrógeno, lo que haría posible la co-inoculación de ambas especies bacterianas en leguminosas. Estas bacterias presentan características por las cuales podrían ser potenciales agentes de control biológico ya que, abundan en el suelo, principalmente en el sistema radicular, donde su versatilidad metabólica les permite utilizar diversos exudados radiculares como fuente de carbono. Además, su tasa de crecimiento es más alta que la de otras bacterias rizosféricas, al igual que su habilidad para colonizar las raíces y poseen varios mecanismos para suprimir patógenos del suelo, incluyendo la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios antimicrobianos, lo que mejoraría el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos. Crecen fácilmente en sistemas *in vitro*, pueden ser reintroducidas en la rizósfera mediante la bacterización de semillas, y son susceptibles a mutaciones y modificaciones mediante las técnicas moleculares habituales (Chin-A-Woeng et al., 2003; Walsh et al., 2001; Whipps, 2001).

1.5.1 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal descriptos para *Pseudomonas fluorescens*

Dentro de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal reportados para *Pseudomonas fluorescens* se encuentran: producción de ácido indol-3-acético, solubilización de fosfato inorgánico, mineralización de fosfato orgánico y la absorción de hierro.

Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

Las bacterias que habitan la rizósfera pueden influir en el crecimiento de las plantas produciendo fitohormonas, como por ejemplo, las auxinas que influyen sobre el crecimiento y morfología de las raíces. La producción de la auxina AIA, es un mecanismo ampliamente distribuido entre las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

La función de la síntesis de AIA por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el fenotipo de la planta no ha sido demostrada aún o se mantiene ambigua (Malik & Sindhu, 2011). El AIA es una de las auxinas más importantes en las plantas ya que controlan muchos procesos fisiológicos en ellas, incluyendo la división celular y la diferenciación de los tejidos. Esta hormona tiene influencia sobre el alargamiento de la raíz así como sobre el crecimiento de raíces secundarias y pelos radiculares. Los pelos radiculares ayudan a las plantas a anclarse mejor al suelo y absorber de manera más eficiente los nutrientes y el agua, aumentando así la supervivencia de la planta. El AIA también controla las respuestas a la luz y a la gravedad (Lugtemberg et al., 2002; Teale et al., 2006; Spaepen et al. 2007). Concentraciones bajas de AIA exógeno promueven el crecimiento radicular mientras que concentraciones altas inhiben el crecimiento de las raíces (Malik & Sindhu, 2011). Las altas concentraciones AIA disparan la formación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) que es un precursor del etileno. El etileno es un inhibidor del crecimiento de la raíz, sobretodo de la raíz principal (Glick et al., 2005). Algunas rizobacterias poseen la enzima ACC desaminasa, que convierte al ACC en amonio y α-cetobutirato, lo que disminuye la cantidad de ACC y por lo tanto la concentración de etileno, eliminando los efectos inhibitorios del mismo sobre las raíces. Se ha observado que la introducción del gen que codifica para dicha enzima mejora la capacidad de la cepa *P. fluorescens* CHA0 para proteger el pepino contra el *damping-off* causado por *Pythium* spp. (Wang et al., 2000).

Solubilización de fosfato inorgánico y mineralización del fosfato orgánico

Luego del nitrógeno, el fósforo es uno de los nutrientes limitantes para el crecimiento vegetal en la mayoría de los suelos (Browne et al., 2009). En general, el fósforo es inmovilizado por la formación de complejos con cationes metálicos como óxidos e hidróxidos de hierro o de aluminio, o con calcio formando hidroxiapatita, fosfato de roca o fosfato dicálcico o tricálcico (Khan et al., 2006). Dichas formas fosfatadas son altamente insolubles, lo que hace imposible

para las plantas utilizarlas como forma de nutrición fosfatada, esto hace que los rendimientos de los cultivos sean bajos, a pesar de tener niveles altos de fosfato total en el suelo (Browne et al., 2009). Muchos microorganismos, como por ejemplo *Pseudomonas, Azotobacter, Burkholderia, Bacillus,* Rhizobium y hongos tienen la habilidad de hacer disponible al fósforo insoluble del suelo para su utilización por las plantas (Ahmad et al., 2008). En general, estos microorganismos utilizan mecanismos como la extrusión de protones y quelación de los metales catiónicos que están asociados al fosfato, dejándolo disponible para su utilización, mediante la liberación de ácidos orgánicos, o grupos carboxílicos o hidroxilos (Arcand & Schneider, 2006). Las formas orgánicas del fósforo componen alrededor del 30 al 65% del total de fósforo del suelo. Estos compuestos son muy diversos y sus tasas de mineralización varían de un compuesto a otro (Lim et al., 2007). La más significativa de sus formas es el hexafosfato de inositol (fitato), que puede formar parte de más del 80% del fósforo orgánico total del suelo (Turner et al., 2002).

El término fitasas se utiliza para describir a enzimas fosfohidrolíticas, que catalizan la liberación de ortofosfatos inorgánicos a partir de ácido fitíco o de fitatos (Mullaney & Ullah, 2003; Jorquera et al., 2008). Dichas enzimas están distribuidas ampliamente en la naturaleza y se pueden encontrar en animales, plantas y microorganismos. Varios estudios han mostrado que las fitasas microbianas serían las más promisorias para su aplicación biotecnológica. Los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* tienen varias clases de fitasas (Jorquera et al., 2008).

Absorción de Hierro

El hierro es un nutriente fundamental para el desarrollo de las plantas, y aunque es abundante en la naturaleza, en general, no se encuentra de la forma en que éstas lo pueden absorber como nutriente. Esto es porque en presencia de oxígeno y pH neutro el hierro es oxidado rápidamente de su estado ion ferroso (Fe^{2+}), que es el que pueden absorber las raíces de las

plantas, a su estado ion férrico (Fe^{3+}), el cual precipita rápidamente formando óxidos de hierro (Vessey, 2003; Saha et al., 2012). Comúnmente las plantas producen compuestos a nivel de la raíz, conocidos como fitosideróforos que ayudan a captar la forma oxidada del hierro (Fe^{3+}) y mantenerla en solución. En la cercanía a las raíces el ion férrico es reducido a ion ferroso y es inmediatamente absorbido por las mismas.

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (400 – 1000 kDa) con una alta afinidad por el hierro. El rango de los valores de la constante de afinidad de los sideróforos por el ión Fe^{3+} va desde 10^{12} hasta 10^{52}. Aunque la deficiencia de hierro es el factor de mayor importancia en la regulación de la síntesis de sideróforos, factores como el pH, la temperatura y la presencia de otros metales también pueden influir (Saha et al., 2012)

Algunas rizobacterias, así como algunos hongos, que viven en el ambiente del suelo donde el hierro soluble escasea, son capaces de producir sideróforos con alta afinidad por dicho nutriente. Hay evidencia de que algunas plantas son capaces de absorber complejos Fe^{3+} - sideróforo bacteriano (Vessey, 2003).

Algunas PGPR productoras de sideróforos compiten con los organismos patógenos del suelo por el hierro. Este mecanismo, como se describe más adelante, ejerce un efecto biocontrolador sobre los fitopatógenos, ya que disminuye su desarrollo, lo que beneficia a las plantas (Vessey, 2003; Saha et al., 2012).

1.5.2 Mecanismos de Control Biológico reportados para *Pseudomonas fluorescens*

El control biológico fue definido en 1987 por la National Academy of Sciences (EEUU) como, "el uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir los efectos de organismos indeseables (pestes) y favorecer organismos deseables". Los microorganismos rizosféricos, podrían ser los más adecuados como agentes de control biológico, ya que se encuentran en estrecha asociación con las raíces.

Los suelos supresivos son aquellos donde los fitopatógenos no son capaces de sobrevivir, o en caso de estar presentes no inducen síntomas severos de enfermedad en el cultivo susceptible. Se ha llegado a la conclusión de que este fenómeno es el resultado de la presencia de microorganismos rizosféricos con actividad antifúngica. La mayoría de las cepas obtenidas de suelos supresivos pertenecen a los géneros *Pseudomonas* o *Bacillus* (Hass & Defágo, 2005). Dentro de los mecanismos de biocontrol descriptos para *Pseudomonas* fluorescentes están: la exclusión de nicho, la competencia por nutrientes (fuente de carbono, Fe^{3+}, fósforo), la producción de antibióticos, de enzimas líticas, la producción de biosurfactantes y la inducción de resistencia sistémica (Compant et al., 2005).

Competencia por Nicho Ecológico y Nutrientes

La rizósfera es una zona muy rica en compuestos carbonados, en ella existen disponibles nichos atractivos para una gran cantidad de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos. La competencia por estos nichos y nutrientes es un mecanismo fundamental por el cual las PGPR protegen a las plantas de los fitopatógenos. Los agentes biocontroladores deben ser capaces de competir en la rizósfera para así perdurar por un período de tiempo considerable, durante el cual podrán ejercer su capacidad protectora. Por lo tanto, la competencia por los nichos radiculares comprende, la colonización efectiva de la raíz combinada con la habilidad de sobrevivir y proliferar en presencia de microflora nativa (Compant et al., 2005). Los resultados vistos en estudios de colonización demuestran que una buena estrategia de colonización incluye: una buena defensa del interior celular, la captación eficiente de nutrientes (más aún si estos se encuentran en bajas concentraciones), incluyendo aquellos provenientes de otros microorganismos, y la eliminación o neutralización de los organismos competidores o los organismos blanco (Lugtenberg et al., 2002). Además la competencia entre las PGPR y los organismos fitopatógenos puede verse beneficiada si las primeras son capaces de tomar ventaja de un ambiente específico o son hábiles para

adaptarse rápidamente a condiciones cambiantes (Compant et al., 2005). En *Pseudomonas* fluorescentes se ha visto que la quimiotáxis, la movilidad flagelar, los lipopolisacáridos, la proteína de membrana OprF y en menor grado el Pili, son importantes para la colonización radicular (Haas & Défago, 2005). Por el momento no se conocen mecanismos dentro de dicho género que intervengan en el reconocimiento específico de receptores de superficie o de señales de la planta hospedero. Este hecho es afín con que muchas cepas biocontroladoras tengan la capacidad de colonizar un amplio rango de especies vegetales. Sin embargo, muchos de los genes involucrados en la colonización aún no tienen función conocida, por lo cual es posible que pueda demostrarse cierta especificidad (Haas & Défago, 2005).

Otra característica importante que debe tener una rizobacteria biocontroladora es la capacidad de competir con los organismos fitopatógenos por nutrientes excretados por las plantas. Una ventaja para la competencia rizosférica es la habilidad de la rizobacteria de utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono. En *Pseudomonas* spp. se ha visto que la habilidad de usar malato y succinato le provee, a la rizobacteria, una mejor capacidad colonizadora que la habilidad de usar glucosa o fructosa (Haas & Défago, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el hierro, en la forma en que puede ser utilizado por organismos (ion férrico, Fe^{3+}) es un elemento escaso, tanto en el suelo, como en la superficie de las plantas y a su vez esencial para todos los organismos vivos, por lo que se genera una gran competencia entre los microorganismos para obtener dicho mineral. En condiciones donde dicho nutriente es escaso, las PGPR producen sideróforos para adquirir hierro férrico. En general estos compuestos privan de hierro a los hongos fitopatógenos, ya que los sideróforos generados por ellos tienen menos afinidad que los generados por las PGPR (Compant et al., 2005). Algunas cepas de rizobacterias biocontroladoras tienen la capacidad de apropiarse del hierro proveniente de sideróforos heterólogos generados por microorganismos que conviven en su mismo habitat (Whipps, 2001; Lodewyckx et al., 2002). Muchos factores

ambientales pueden influir sobre la producción de sideróforos, como el pH, la concentración y la forma de los iones de hierro que haya en el ambiente, la presencia de otros elementos traza y el suplemento adecuado de fuente de carbono, nitrógeno y fósforo (Duffy et al., 2004). Los sideróforos producidos por *Pseudomonas* fluorescentes son del tipo pioverdinas, ácido salicílico y pioquelinas. Estos sideróforos pueden favorecer la biosíntesis de otros compuestos antimicrobianos además de aumentar la disponibilidad de hierro para dichas bacterias. Los sideróforos, así como también los antibióticos producidos por las *Pseudomonas spp.* pueden actuar como factores de estrés o señales que inducen resistencia sistémica o localizada en la planta hospedero (Duffy & Défago, 1999).

Producción de compuestos antimicrobianos

- Producción de Antibióticos

La síntesis de antibióticos está estrechamente ligada al estado metabólico de la célula, el cual está directamente influenciado por la disponibilidad de nutrientes, como minerales presentes en el ambiente, el tipo de fuente de carbono y la disponibilidad de la misma. El pH y la temperatura, los elementos traza, particularmente el zinc y los niveles de fuente de carbono, influencian la estabilidad genética de la bacteria, lo que afecta su habilidad de producir metabolitos secundarios (Duffy & Defágo, 2000). Muchas cepas bacterianas producen más de un metabolito secundario con actividad antifúngica, y las condiciones que favorecen la producción de uno pueden afectar negativamente la producción del otro (Compant et al., 2005). Algunos antibióticos han sido extensamente investigados y la evidencia experimental indica que tendrían una importante función en el control biológico de enfermedades de raíz. Algunos ejemplos son la fenazina y sus derivados, el floroglucinol, la pilouterina, la pirrolnitrina, los lipopéptidos cíclicos y compuestos volátiles como el ácido cianhídrico (HCN, del inglés: *Hydrogen Cyanide*) (Haas & Défago, 2005).

Las **fenazinas (Phz)** son compuestos nitrogenados heterocíclicos pigmentados sintetizados por bacterias pertenecientes a diversos géneros microbianos como *Brevibacterium, Burkholderia, Pseudomonas* y *Streptomyces*. Las fenazinas inhiben el transporte de electrones y presentan un amplio espectro contra bacterias y hongos patógenos. La Phz tiene un rol importante en la competencia microbiana en la rizósfera, tanto en la supervivencia como en la aptitud para adaptarse al medio (Dwivedi & Johri, 2003; Haas & Défago, 2005).

El **2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG)** es un antibiótico de amplio espectro producido por varias cepas de *Pseudomonas* fluorescentes. Tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antihelmítica y citotóxica (Mavrodi et al., 2011). Además, parecería que 2,4-DAPG dispara el mecanismo de Resistencia Sistémica Inducida (ISR del inglés: *Induced Systemic Resistance*); que se describe más adelante en el texto; ya que induce la síntesis de fitoalexinas u otras moléculas similares (Dwivedi & Johri, 2003).

La **pirrolnitrina (Prn)** [3-cloro-4-(2'-nitro-3'-cloro-fenil) pirrol] es un antibiótico de amplio espectro producido por varias cepas de *Pseudomonas* fluorescentes como también cepas no fluorescentes. Este antibiótico persiste en el suelo por al menos 30 días. Se ha desarrollado un fungicida agrícola a partir de un derivado fenil pirrol (Dwivedi & Johri, 2003). Su mecanismo de acción sería la inhibición de la cadena respiratoria de hongos (Haas & Défago, 2005).

La **pioluteorina (Plt)** [4,5-dicloro-2-(2',6'-dihidroxibenzoil)-pirrol] es producida por varias cepas de *Pseudomonas* fluorescentes, incluyendo aquellas que controlan enfermedades producidas por fitopatógenos. Actúan principalmente inhibiendo el crecimiento de oomycetes patógenos de plantas como por ejemplo *P. ultimum* (Dwivedi & Johri, 2003).

El **ácido cianhídrico (HCN)** es un antibiótico volátil común entre las *Pseudomonas* fluorescentes y se destaca por su capacidad de inhibir el crecimiento o avance de los fitopatógenos. Este tipo de compuesto volátil con actividad antifúngica, brinda al

microorganismo que lo produce la capacidad de generar dosis inhibitorias que pueden antagonizar a los patógenos a una mayor distancia que los compuestos difusibles (Haas & Keel, 2003). El ion cianuro es un potente inhibidor de muchas metaloenzimas, sobretodo de aquellas que contienen cobre, como por ejemplo las citocromo oxidasas (Haas & Defago, 2005).

Los **lipopétidos cíclicos** (CLPs, del inglés: *Cyclic lipopeptides*) son un tipo de biosurfactante. Los biosurfactantes son moléculas de características anfipáticas, que tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de las interfaces agua/aire y agua/aceite (Sachdev & Cameotra, 2013). Los lipopétidos cíclicos son compuestos muy diversos estructuralmente, lo que se corresponde con la versatilidad de actividades biológicas en las que están involucrados. Son producidos por una variedad de géneros bacterianos. En *Pseudomonas* antagonistas de patógenos, estos compuestos son de gran importancia para las siguientes funciones: actividad antimicrobiana, movilidad y formación de biofilms (Raaijmakers et al., 2006).

- Producción de enzimas líticas

Una variedad de microorganismos tienen actividad hiperparasítica y atacan a los fitopatógenos a través de la excreción de enzimas hidrolíticas que destruyen las paredes celulares de los mismos (Compant et al., 2005). En general, los organismos fúngicos, presentan células con paredes formadas por polisacáridos como celulosa, 1,3-glucanos, quitina y proteínas, lo que le dan a la pared una consistencia rígida y protege a estos organismos de las posibles agresiones del ambiente y de los microorganismos antagonistas. Las celulasas consisten en un sistema celulolítico descrito en bacterias y hongos tanto aerobios, como anaerobios. Las enzimas que componen el complejo actúan sinérgicamente para degradar los polisacáridos hasta obtener glucosa. Las β-glucanasas conforman un sistema hidrolítico donde las β-1-3-exoglucanasas cortan en los extremos no reductores de los polímeros, liberando así glucosa y las β-1,3-endoglucanasas rompen enlaces aleatoriamente en el interior de la molécula liberando

pequeños oligosacáridos. Las β-glucanasas son capaces de inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de hongos fitopatógenos. Finalmente, las proteasas han tenido menos trascendencia en el estudio de los mecanismos de biocontrol, dado que no siempre se ha podido comprobar una participación activa en el antagonismo (Hultberg et al., 2000).

Resistencia Sistémica Inducida

La resistencia sistémica inducida (ISR, del inglés*:Induced Systemic Resistance*) mediada por bacterias, se refiere a la capacidad de algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que por lo general habitan en la rizósfera, para incrementar la respuesta defensiva de la planta huésped frente a una posible infección por patógenos (Weller et al., 2012). La ISR es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (*del inglés SAR: Systemic Acquired Resistance*). La respuesta SAR, propia de las plantas, se manifiesta cuando estas logran activar de manera exitosa sus mecanismos de defensa frente a la infección primaria por un patógeno. La misma produce una reacción de hipersensibilidad que se visualiza como una lesión necrótica local de tejido marrón y seco. Como SAR, ISR es una respuesta también efectiva frente a diferentes patógenos, pero difiere de SAR en que al ser inducida por PGPB no causa síntomas visibles en la planta huésped (Compant et al., 2005). La ISR puede ser inducida por diferentes bacterias en varias especies vegetales, pero el éxito de la respuesta está basado en una interacción específica entre la especie bacteriana inductora y la planta huésped. Varios componentes bacterianos han sido propuestos como desencadenantes de ISR, como por ejemplo flagelos, sideróforos, lipopolisacáridos, pero no hay evidencia concreta de que exista una señal bacteriana específica que desencadene una respuesta ISR. Recientemente, se ha reportado que algunos compuestos orgánicos volátiles podrían ser los responsables de tal señal (Compant et al., 2005). La ISR desencadenada por la presencia de PGPB fortifica la pared celular de las células vegetales y altera las respuestas fisiológicas y metabólicas de la planta, llevando al aumento de la síntesis de químicos involucrados en la defensa de la misma antes

de que esta interactué con algún patógeno y/o un factor de stress abiótico (Compant et al., 2005).

El control biológico de las enfermedades de las plantas ofrece una oportunidad única para promover prácticas de producción sustentables a través de una explotación racional de los recursos naturales, reduciendo el uso de pesticidas y puede ser una alternativa promisoria dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Las *Pseudomonas* fluorescentes, por sus características, serían un posible agente de control biológico eficiente.

1.6 Utilización de inoculantes bacterianos para el control de plagas

La inoculación de plantas, con microorganismos, para aumentar el rendimiento de los cultivos tiene más de un siglo de existencia. Esta práctica se ha ido esparciendo, aumentando así la cantidad de productos de este tipo que son comercializados para distintos cultivos (Bashan et al., 2013; Trabelsi & Mhamdi 2013).

Las estrategias para seleccionar antagonistas con elevado potencial para el desarrollo de un inoculante bacteriano comercial implican una apropiada selección del patosistema, del método de aislamiento del agente y de la forma de caracterizar y evaluar su eficacia (Quagliotto, 2006). Otras consideraciones críticas son, la formulación del inoculante, así como su método de aplicación. La formulación del inoculante tiene como principal objetivo evitar el descenso de la población microbiana que será introducida, al menos por el tiempo que le lleve realizar su efecto promotor, por lo que debe ofrecer a las bacterias un microambiente que les permita sobrellevar la competencia con las bacterias residentes, las cuales en general, están mejor adaptadas a sobrevivir en el ecosistema por largos períodos de tiempo. Es de gran importancia que el método de aplicación del inoculante sea compatible con las tareas agrícolas de rutina (Bashan et al., 2013)

El uso de inoculantes bacterianos requiere la liberación de un gran número de células bacterianas viables y buenas competidoras al ecosistema del suelo. Es posible que esta acción cause una perturbación en el equilibrio de dicho ecosistema. Es crítico entonces, obtener información sobre la persistencia, la diseminación y la actividad de las bacterias introducidas, como medio para evaluar tanto la eficacia del inoculante, como el impacto que genera en la comunidad microbiana (Trabelsi & Mhamdi 2013).

Existen reportes de que la inoculación con microorganismos biocontroladores perturbaría el balance ecológico original de la comunidad bacteriana del suelo y/o rizósfera, pero comúnmente se observa una recuperación progresiva de la configuración original de la comunidad. En el caso de los biofertilizantes y los fotoestimuladores el efecto es más pronunciado y se mantiene por más tiempo que el producido por los biocontroladores (tabla 2, Trabelsi & Mhamdi 2013).

En general, la población de rizobacterias introducidas como inoculante desciende gradualmente luego que es liberada en el suelo. Esto puede deberse tanto a estrés abiótico como a interacciones negativas con los microorganismos residentes. Los cambios que se producen en la composición de la comunidad podrían ser negativos, en el caso de que se perdieran algunas especies nativas importantes, afectando al rendimiento de los cultivos subsecuentes. También podría ocurrir que una modificación en la comunidad bacteriana causada por la introducción de bacterias exógenas sea amortiguada por la resiliencia del sistema, que es la capacidad del sistema de recuperarse a una perturbación. Otra posibilidad es que la pérdida de ciertas especies bacterianas en el ecosistema, no afecte la funcionalidad del mismo debido a la redundancia bacteriana, ya que, algunas especies diferentes de bacterias pueden realizar las mismas funciones (Fischer et al., 2010; Troxler et al., 2012; Trabelsi & Mhamdi 2013)

Tabla 2 - Recopilación de artículos que describen el impacto de la introducción de un inoculante microbiano en la estructura de la comunidad microbiana asociada a la planta hospedera (Trabelsi & Mhamdi 2013).

Tipo de inóculo	Especie	Técnica	Principales resultados	Referencia
Rizobio	*S. meliloti* L33	SSCP	La diversidad bacteriana en la rizósfera de *Medicago sativa* fue afectada. La cantidad de miembros de las γ-proteobacterias disminuyó y el de α-proteobacterias aumentó	(Schwieger & Tebbe 2000)
	Mezcla de *Ensifer*	DGGE	Se observó un aumento en la diversidad debido a cambio de estación y no debido a la inoculación. DGGE brindó poca información sobre la comunidad bacteriana.	(Herrmann et al. 2012)
	S. meliloti M401/M403	TGGE	La persistencia de ciertas γ-proteobacteria fue afectada en la rizósfera de alfalfa. TGGE resultó bueno para identificar cambios dependientes de M403.	(Dillewijn et al. 2002)
	R. gallicum 8a3 *E. meliloti* 4H41	T-RFLP	Cambios significativos en la estructura y diversidad bacteriana en el suelo del poroto común. Aumento de α- y γ-proteobacteria, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. La inoculación dual fue menos efectiva que la individual.	(Trabelsi et al. 2012; Trabelsi et al. 2011)
	S. meliloti S26/OS6	qPCR	Se vieron afectadas las bacterias involucradas en la ciclación del nitrógeno de acuerdo a la abundancia de genes *nifH* en fase de floración tardía. Se observó un aumento de copias del gen *amoA* durante la floración.	(Huić Babić et al. 2008)
Azospirillum	*A. brasilense* Cd/Sp245	DGGE, RISA	No se observaron efectos importantes sobre las comunidades bacterianas del maíz en dos suelos y sistemas productivos diferentes	(Lerner et al. 2006)
	A. lipoferum CRT1	RISA	La inoculación de maíz aumentó la variabilidad entre muestras de las comunidades bacterianas para plantas	(Baudoin et al. 2009)

			individuales. No se modificó el número total de bacterias rizosféricas	
	A. brasilense 40M/42M	CLPPs	Se observaron cambios en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas asociadas con las raíces del arroz.	(García de Salamone et al. 2010)
AMF	*G. intraradices*	DGGE	La inoculación afectó la comunidad bacteriana rizosférica de la arveja. Cuatro de cinco bandas específicas fueron suprimidas. Previo a la floración, los AMF disminuyeron la tasa respiratoria de la rizósfera y el nº de protozoarios, pero no afectaron el nº de bacterias. Durante la floración los AFM estimularon la tasa respiratoria y disminuyeron el efecto sobre protozoarios.	(Wamberg et al. 2003)
	G. mosseae *G. intraradices*	DGGE	La inoculación modificó significativamente la composición bacteriana de la rizósfera de tomate. Las dos AFM mostraron comunidades bacterianas similares, pero se vieron efectos específicos dependientes de especies.	(Lioussanne et al. 2010)
Agentes biocontroladores	*P. fluorescens* 2P24	T-RFLP DGGE	La inoculación generó un efecto transitorio en la comunidad fúngica de rizósfera de pepino. Tanto por DGGE como por T-RFLP los resultados fueron similares.	(Gao et al. 2012)
	P. chlororaphis IDV1 *P. putida* RA2	FAME	La inoculación indujo cambios en los perfiles de FAME de la fracción cultivable, y en la comunidad microbiana total del maíz. La comunidad rizosférica pasó de ser predominantemente Gram (+) a ser mayormente Gram (-).	(Kozdrój et al. 2004)
Coinoculación de microorganismos	*Pseudomonas* spp. AMF	DGGE	La inoculación generó un cambio significativo en la comunidad bacteriana. El consorcio PGPM generó un impacto mayor que los AMF. Un efecto sinérgico de la coinoculación fue observado.	(Roesti et al. 2006)
	B. subtilis 101 *A. brasilense* Sp245	DGGE	La inoculación del agente biocontrolador no mostró efecto significativos en las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera de tomate. La combinación de ambas rizobacterias no mostró efectos sinérgicos en la biomasa de las plantas respecto a la aplicación por separado.	(Felici et al. 2008)
	A. brasilense *P. fluorescens*	T-RFLP CLPPs	La inoculación no mostró efectos significativos en las comunidades cultivables ni en los perfiles nifH T-RFLP de las bacterias diazotrópicas asociadas a la raíz del arroz. Se observó un efecto sinérgico en la coinoculación.	(García de Salamone et al. 2012)

1.7 Métodos de estudio de las comunidades microbianas

Los microorganismos del suelo cumplen funciones de gran importancia dentro de los ciclos biogeoquímicos y en la descomposición de la materia orgánica. Además, tienen una gran influencia sobre los ecosistemas que están por encima y por debajo del suelo. Éstos contribuyen a la nutrición y bienestar de las plantas, así como a la estructura y fertilidad del suelo (Bing-Ru, et al., 2006; Kirk et al., 2004). Es necesario comprender mejor las funciones que cumplen las comunidades microbianas que habitan en el suelo y cómo las consecuencias de los cambios del mismo, ya sea por las prácticas agrícolas, el clima u otros factores tanto abióticos como bióticos, influyen sobre las comunidades de microorganismos. Este conocimiento se encuentra principalmente limitado por la heterogeneidad del suelo y por una falta de noción general sobre la microbiota del mismo (Hirsch et al., 2013). La inmensa diversidad fenotípica y genotípica encontrada en las comunidades microbianas del suelo, hacen que éstas sean sumamente difíciles de estudiar. Una de las razones se debe a nuestra incapacidad para imitar los medios en los que las bacterias conviven, haciendo que solamente sea posible cultivar a una minoría de los microorganismos del suelo por técnicas de cultivo en el laboratorio. Se estima que alrededor del 1 % del total de bacterias que se pueden visualizar por conteo directo es capaz de crecer en el laboratorio (Kirk et al., 2004). En áreas donde abundan los nutrientes como la rizósfera, es posible que se pueda cultivar hasta un 10% del total de las bacterias presentes (Hirsch et al., 2010).

Para el estudio de las comunidades microbianas existen varios métodos, estos pueden ser separados en técnicas bioquímicas y técnicas moleculares. Dentro de las técnicas bioquímicas se encuentra el cultivo en placa y el perfilado fisiológico de la comunidad por utilización de un único sustrato. La ventaja de estos métodos es que son baratos, rápidos y brindan información sobre los microorganismos heterotróficos activos de la comunidad. La limitación que presentan es que dependen del cultivo de microorganismos en el laboratorio. Dentro de las

desventajas de cultivar microorganismos en el laboratorio esta la dificultad de separar las bacterias de las partículas de suelo o de biofilms, seleccionar un medio de cultivo correcto y las condiciones de crecimiento a las que serán cultivados (pH, temperatura, humedad, luz) y la incapacidad de cultivar grandes cantidades de microorganismos, ya sea debido a la inhibición por contacto entre colonias o debido al esparcimiento de las mismas. Otro de los métodos bioquímicos es el análisis de metil estéres de ácidos grasos (del inglés: FAME, *fatty acids methil esther analysis*). Este análisis tiene la ventaja que puede prescindir del cultivo de microorganismos. Una de sus limitaciones es que la composición de ácidos grasos en las células puede variar según la temperatura y nutrición. Además varios microorganismos que no están relacionados taxonómicamente pueden compartir el mismo perfil de ácidos grasos (Kirk et al., 2004).

Las técnicas moleculares están basadas en la utilización de ácidos nucleicos como material de estudio para clasificar a las comunidades microbianas. Estos métodos permiten superar alguna de las limitaciones de los métodos basados en cultivos en el laboratorio y a su vez proporcionan una medida de la diversidad y de la composición de las comunidades bacterianas del suelo, brindando información sobre los microorganismos cultivables como los no cultivables de la comunidad (Kuske et al., 2002). Dentro de estos métodos se encuentran aquellos basados en la reasociación o hibridación del ADN, como la comparación del contenido guanina + citosina, hibridación ADN-ADN, mRNA-ADN, hibridación con sondas fluorescentes (FISH, del inglés: *fluorescent in-situ hibridization*) y microarreglos. Otras técnicas moleculares, están basadas en el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *polymerase chain reaction*). Dentro de los métodos basados en la técnica de PCR, están el DGGE (del inglés, *denaturing gradient gel electrophoresis*), TGGE (del inglés, *temperature gradient gel electrophoresis*), RISA (del inglés, *ribosomal intergenic spacer analysis*), ARISA (del inglés, *automated ribosomal intergenic spacer analysis*), RFLP (del inglés, restriction fragment

length polymorphism), T-RFLP (del inglés, *terminal restriction fragment polymorphism*), SSCP (del inglés, *single strand conformation polymorphism*) (Kirk et al., 2004) (Tabla 3) y la secuenciación masiva del DNA del suelo.

Tabla 3 - Métodos moleculares de estudio de las comunidades microbianas (tomado de Kirk et al., 2004).

Método	Ventajas	Desventajas	Referencias
%GC (porcentaje GC)	No incluye técnica de PCR. Todo el ADN extraído es analizado, incluye a los miembros "raros"de la comunidad. Es un método cuantitativo.	Requiere grandes cantidades de ADN. Depende de la eficiencia de lisis celular y de extracción de ADN. Bajo nivel de resolución.	Nusslein & Tiedje, 1999. Tiedje et al., 1999.
Reasociación e hibridación de ácidos nucleicos (AN)	Todo el ADN extraído es utilizado. No incluye técnica de PCR. Se puede realizar in situ. Permite analizar tanto ADN como ARN.	Depende de la eficiencia de lisis celular y de la extracción de ADN. Las copias de los AN deben estar en grandes números para ser detectadas. Bajo nivel de sensibilidad.	Torsvik et al., 1990. Cho & Tiedje, 2001.
Microarreglos e hibridación de ADN	Mismas ventajas que hibridación de AN. Se pueden analizar una gran cantidad de genes. Si se incluyen fragmentos largos de ADN o genes, aumenta la sensibilidad del método.	Solo detecta las especies más abundantes. Depende del cultivo de los microorganismos a estudiar. Solo es preciso en sistemas con baja diversidad.	Hubert et al., 1999; Cho & Tiedje, 2001; Green & Voordouw, 2003
Electroforesis en gradiente desnaturalizante o de temperatura en gel de poliacrilamida (DGGE/TGGE)	Se puede analizar un gran número de muestras de forma simultánea. Confiable, reproducible y rápido.	Incluye técnica de PCR. Depende de la eficiencia de lisis celular y de la extracción del ADN. El manejo de la muestra puede influenciar sobre la composición de la comunidad. Una banda puede representar a más de una especie. Solo detecta las especies más dominantes de la comunidad.	Muyzer et al., 1993; Duinevel et al., 2001; Maarit-Niemi et al., 2001
Polimorfismo conformacional de la monohebra	Mismas ventajas que DGGE/TGGE. No se utiliza grampa GC, ni tampoco gradiente electroforético.	Sesgos de la técnica de PCR. Algunas monohebras forman más de una conformación estable.	Lee et al., 1996; Tiedje et al., 1999
Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado(ARDRA); polimorfismo de restricción en el largo del fragmento (RFLP)	Permite detectar cambios estructurales en la comunidad microbiana	Sesgos de la técnica de PCR. Ocasionalmente muestran patrones de bandas muy complejos	Liu et al., 1997; Tiedje et al., 1999

Polimorfismo restricción terminal en el largo del fragmento (TRFLP)	Patrones de bandas más sencillos de analizar que en la técnica de RFLP. Se pueden analizar grandes números de muestras. Reproducible. Permite comparar diferencias entre las comunidades microbianas.	Depende de la eficiencia de la lisis celular y de la extracción del ADN. Sesgos debidos a la técnica de PCR. El tipo de enzima Taq utilizada puede aumentar la variabilidad. La elección de los primers universales y de las enzimas de restricción puede influenciar en el fingerprinting de la comunidad.	Tiedje et al., 1999; Dunbar et al., 2000; Osborn et al., 2000.
Anáisis del espaciador intergénico ribosomal (RISA); Análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA)	Genera perfiles de comunidades microbianas altamente reproducibles	Requiere grandes cantidades de ADN	Fisher & Triplet, 1999

La ventaja que tienen los métodos basados en la técnica de PCR es que permitirían amplificar el ADN de los organismos que están en baja proporción en la comunidad. En general, se amplifica y analiza alguna región del gen que codifica para el ARNr 16S, ya que está presente en todos los microorganismos y tiene regiones definidas que permiten clasificarlo taxonómicamente. Además, no está sujeto a transferencia horizontal entre microorganismos (Kirk et al., 2004).

Una de las técnicas de *fingerprinting* habitualmente usada en ecología microbiana es la técnica de DGGE. Este método fue originalmente desarrollado para detectar mutaciones puntuales. En 1993, Muyzer adaptó el método para estudiar la diversidad genética de las comunidades microbianas. Este método consiste en la electroforesis de fragmentos de ADN, por ejemplo del gen del ARNr 16S amplificados previamente por PCR, en geles de poliacrilamida que contienen una concentración creciente de una solución desnaturalizante. Los fragmentos de ADN son del mismo tamaño pero la diferencia radica en la composición de bases nucleotídicas del fragmento. Esta diferencia de secuencias nucleotídicas entre los fragmentos de ADN amplificado permite que estos se separen y se diferencien en el gel. La separación de los fragmentos a lo largo del gel de poliacrilamida se basa en la motilidad electroforética de la molécula de ADN. Cuando la molécula de ADN llega a una concentración desnaturalizante que hace que pase de su estado de doble hebra a estar parcialmente separada, ésta prácticamente

se detiene en el gel (Hirsch et al., 2010). Para que al menos una parte del fragmento de ADN amplificado permanezca en estado de doble hebra, el extremo terminal 5'del cebador *forward* contiene un capuchón G-C, de 35-40 pares de bases. Esto evita que el fragmento se separe por completo y se escape del gel. Teóricamente este método permitiría reconocer diferencias de por lo menos un par de bases (Kirk et al., 2004). El DGGE tiene como ventaja que es un método confiable, reproducible, rápido y de cierta forma barato, porque permite el análisis de muchas muestras a la misma vez. Esta característica permite seguir los cambios en la comunidad microbiana a lo largo del tiempo o en diferentes condiciones ambientales. Es un método cuantitativo, ya que se puede usar la presencia e intensidad de las bandas individuales en los geles para calcular índices de diversidad y realizar análisis de agrupamiento de los patrones de bandeo. Dentro de las desventajas del método están los sesgos introducidos por la técnica de PCR, dificultades en la manipulación de la muestra, lo que podría influenciar en el patrón de bandas de la comunidad microbiana y la variabilidad en el método de extracción de ADN (Kirk et al., 2004).

2. Antecedentes

El laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE desarrolla una extensa línea de investigación dedicada a la caracterización de *Pseudomonas* fluorescentes nativas que favorecen el crecimiento de cultivos forrajeros. Se han aislado y caracterizado cepas capaces de promover el crecimiento de lotus y alfalfa (Bagnasco et al., 1998; De La Fuente et al., 2002; De La Fuente et al., 2004; Quagliotto et al., 2009; Höfte & Altier 2010). A partir de un estudio en el que se aislaron 702 cepas de *Pseudomonas* flourescentes nativas de la rizósfera de alfalfa, se seleccionaron aquellas que presentaron características más promisorias como PGPRs. Entre dichas cepas se seleccionó una, la cepa C119 que fue identificada como *Pseudomonas fluorescens*, con la cual se realizaron estudios en plantas. Ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas, donde se inocularon plantas de alfalfa con dicha cepa, mostraron que era capaz de promover el crecimiento de la alfalfa y además de controlar el *damping-off* causado por un aislamiento fuertemente patogénico de *P. debaryanum* agregado al suelo (Yanes et al., 2012).

OBJETIVO

Determinar los efectos directos e indirectos en la promoción del crecimiento de la alfalfa por la cepa Pseudomonas fluorescens C119 y el impacto de su inoculación sobre la comunidad bacteriana presente en la rizósfera.

Objetivos específicos

1. Evaluar, los posibles mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal de la cepa *P. fluorescens* C119.

2. Evaluar la capacidad protectora contra enfermedades de implantación y de promoción del crecimiento vegetal de la cepa *P. flourescens* C119 sobre la alfalfa en ensayos de campo.

3. Evaluar el impacto de la inoculación de la cepa P. *fluorescens* C119 sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa.

3. Estrategia de trabajo

En este trabajo se estudió la capacidad promotora del crecimiento vegetal de la cepa *P. fluorescens* C119. En una primera instancia, dicha cepa fue sometida a distintos ensayos de laboratorio para evaluar los posibles mecanismos promotores del crecimiento vegetal que podría llegar a presentar. Luego se procedió a realizar un ensayo de campo. En el mismo se evaluó la capacidad promotora del crecimiento vegetal que la cepa C119 podría ejercer sobre la alfalfa. Esta cepa fue introducida en el ensayo mediante la bacterización de las semillas de alfalfa previo a ser sembradas. En este procedimiento se utilizó una formulación de turba como la que es utilizada para inocular rizobios en las leguminosas. En el ensayo de campo se evaluaron dos tratamientos, uno en el cual las semillas fueron inoculadas con la cepa C119 y la cepa comercial de rizobio *Sinorhizobium meliloti* U45 y un tratamiento control en el cual las semillas se inocularon solamente con la cepa comercial de rizobio. Para evaluar la efectividad promotora de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* C119 en el campo, se cuantificó la colonización y persistencia de la cepa en las raíces. Entre los dos tratamientos se comparó la diferencia del número de plantas sanas y el peso y composición de la biomasa vegetal. Por otro lado, fue evaluado el posible impacto en la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa por la introducción de la cepa C119, utilizando la técnica de DGGE, mediante la comparación de la estructura de la comunidad bacteriana entre los dos tratamientos.

4. Materiales y Métodos

4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa utilizada en el presente trabajo fue la cepa *P. fluorescens* C119. Dicha cepa fue seleccionada a partir de una colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas de la rizósfera de plantas de alfalfa como posible microorganismo promotor del crecimiento vegetal (Yanes, et al., 2012). Se utilizaron además cepas de *P. fluorescens* de referencia, hongos fitopatógenos y cepas de *Esterichia coli* (Tabla 4)

Tabla 4 - Microorganismos utilizados en este trabajo. (1) Estación experimental INIA – Las Brujas, Canelones, Uruguay. (2) Estación experimental Agropecuaria Balcarce, INTA – Balcarce, Argentina. (3) Unidad de investigación de enfermedades de raíces y control biológico. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service (USDA – ARS). Washington State University. Pullman, EEUU.

Cepa	Origen/Características	Fuente/Referencia
Pseudomonas fluorescens		
UP-148	*Lotus corniculatus*. Colonia, Uruguay	Bagnasco et al., 1998
2-79	Trigo. Washington, EEUU	Weller & Cook, 1983
C119	*Medicago sativa L*. Tacuarembó, Uruguay	Yanes, 2007
αT688	*Medicago sativa L*. Tacuarembó, Uruguay	Yanes, 2007
Esterichia coli		
Epi 300	Copy control fosmid library production kit	Epicentre, Biotechnologies, US
Epi 300 (CSD23)	Clon productor de celulasas, obtenido de una librería genómica de microorganismos del rumen bovino	Inés Loaces, comunicación personal
Fitopatógenos		
Pythium debaryanum	*Medicago sativa L*, Uruguay	INIA[1] – Las Brujas
Rizoctonia solani	*Solanum lycopersicum* (Tomate), Argentina	INTA[2]-
Alternaria sp.	*Solanum lycopersicum* (Tomate), Uruguay	Departamento de Biología Molecular, IIBCE
Fusarium sp.	*Pisum sativum* (Arveja), EEUU	Facultad de Química – UdelaR.

Los medios de cultivo utilizados para crecer las cepas bacterianas fueron: King´s B (KB; King et al., 1954), GE (Proyecto PDT 74) y Luria Broth (LB; Bertani, 1953). Para realizar los recuentos en placa se utilizaron placas de medio KB sólido, adicionado con ácido nalidíxico 30µg/ml (Nal^{30}), Ampicilina 50µg/ml (Amp^{50}) y Cicloheximida 100µg/ml ($Chex^{100}$). La composición de los medios de cultivo utilizados se describe en el apéndice II. Los cultivos bacterianos en medio sólido se incubaron en estufa a 30°C, mientras que los cultivos en medio líquido se incubaron en agitador rotatorio a 200 rpm y 30°C. Los hongos fitopatógenos se incubaron en medio Potato Dextrose Agar (PDA, Difco®) a 25°C. Posteriormente, los cultivos fueron almacenados a 4°C.

4.2 Evaluación de las características de promoción del crecimiento vegetal

4.2.1 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal

Detección de la producción de ácido indolacético (AIA)

Para determinar la producción de AIA la cepa fue crecida en medio KB líquido suplementado con L-triptófano 5mM. Luego de una incubación de 48 hrs, se tomó 1mL de sobrenadante de cultivo y se lo mezcló con un volumen igual de reactivo de Salkowski (150mL de H_2SO_4 concentrado, 250mL de H_2O desionizada, 7.5mL de $FeCl_3.6H_2O$ 0.5mM) (Gordon & Weber, 1951). Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. La presencia de AIA se verificó por el viraje de color de amarillo a rojo. Como controles positivo y negativo se utilizaron las cepas *P. fluorescens* αT688 (Yanes, 2007) y la cepa *P. fluorescens* UP-148, respectivamente.

Detección de la solubilización de fosfato inorgánico ($Ca_3(PO_4)_2$)

En placas de medio NBrip (Nautiyal et al., 1999), que contiene fosfato tricálcico *($Ca_3(PO_4)_2$)* como única fuente de fósforo, se inocularon 10 µL de cultivo de la cepa *P. fluorescens* C119, proveniente de un cultivo líquido en medio KB incubado por 24 horas. Estas placas fueron incubadas por 7 días a 30°C. La capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico se evidenció por

la formación de halos transparentes alrededor del inóculo bacteriano. Se utilizó como control positivo a la cepa *P. fluorescens* T512 (Yanes, 2007)

Mineralización de fosfato orgánico (fitato)

Se evaluó la capacidad de la cepa *P. fluorescens* C119 de crecer utilizando fitato como única fuente de fósforo (Ramírez et al., 2010). Esta cepa fue inoculada en medios definidos, conteniendo las mismas concentraciones minerales que el medio mínimo de Spizizen (SMM) (Spizizen, 1958) pero diferentes fuentes de fósforo: uno de ellos, conteniendo fitato, otro, sin ninguna fuente de fósforo disponible, tomado como control negativo, y uno conteniendo K_2HPO_4 y KH_2PO_4 como control positivo. Se comparó de forma cualitativa el crecimiento de la cepa *P. fluorescens* C119 entre los tres medios. Se consideró positiva para la producción de fitasas si su crecimiento, en el medio conteniendo fitato, era igual o mayor al crecimiento alcanzado por la cepa inoculada en el medio conteniendo sales de fósforo como fuente del mismo. Por otro lado se consideró negativa para la producción de fitasas en el caso de que su crecimiento fuera igual o menor al crecimiento en el medio sin ninguna fuente disponible de fósforo.

4.2.2 Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal

Ensayos de antagonismo in vitro

La actividad antagónica de la cepa *P. fluorescens* C119 frente a 4 fitopatógenos distintos, (*P. debaryanum*, *R. solani*, *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp.), fue evaluada *in vitro* mediante el método de cultivo dual en placa descripto por Geels & Schippers (1983). Se inoculó la cepa *P. fluorescens* C119 en tres lugares cerca del borde de la placa de petri, en medio GE (Quagliotto, 2006). En el centro de la placa se colocó un disco de micelio joven de cada patógeno. Estos ensayos se realizaron por duplicado. Las placas fueron incubadas, a 25°C, hasta que las placas control, conteniendo únicamente el patógeno, fueron cubiertas completamente por micelio de

los mismos (entre 7 y 10 días). En ese momento, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno por la cepa *P. fluorescens* C119. Se tomó como 100% de crecimiento el área que el patógeno cubrió en la placa control.

Producción de HCN (ácido cianhídrico)

Para confirmar la producción de HCN se creció la cepa *P. fluorescens* C119 en placas de KB suplementado con glicina (4.4 g/L) y $FeCl_3$ (100µM). Se incubó por 24 hrs a 30°C. Luego se colocó en las tapas de las placas un disco impregnado en ácido pícrico 0.5% y Na_2CO_3 2%. Las placas fueron selladas con Parafilm® y se incubaron por 24 hrs a 30°C. La producción de HCN fue verificada por el viraje de color del papel de filtro de amarillo a rojo (Bakker & Schippers, 1987). Como control negativo se utilizó la cepa *P. fluorescens* 2-79, como control positivo se utilizó la cepa C119, ya que previamente se había visto que era capaz de producir HCN (Yanes, 2007).

Detección de celulasas

La actividad celulolítica fue evaluada mediante el crecimiento de la cepa *P. fluorescens* C119 en placas de medio LB suplementado con CMC (carboximetilcelulosa) al 0.2%. Se inocularon dichas placas con 10µL de un cultivo líquido de la cepa *P. fluorescens* C119 crecido por 48 hrs. Dichas placas fueron incubadas durante 7 días a 30°C. Posteriormente, las colonias sobre el agar fueron removidas y las placas teñidas con rojo congo 5% durante 20 minutos. La actividad celulolítica se evidenció por la formación de un halo de color naranja donde había degradación de celulosa (Beguin et al., 1983). Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* Cds 23 y como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* Epi 300.

4.3 Ensayos de protección de enfermedad y promoción del crecimiento vegetal en alfalfa por la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 en condiciones de campo

4.3.1 Preparación del inoculante

La preparación del inoculante se realizó en base a un protocolo previamente desarrollado por nuestro laboratorio. Se utilizó un cultivo bacteriano de la cepa C119, previamente crecido en medio KB líquido por 48 horas a 30°C y agitación constante de 200rpm, para preparar el inoculante de turba. Se inocularon dos bolsas de polipropileno de baja densidad (tamaño de poro de 40µM) conteniendo 130 g de turba estéril, mediante inyección de 100mL del cultivo en condiciones asépticas. Las bolsas fueron selladas y homogeneizadas manualmente durante 20 minutos. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente por 30 días.

4.3.2 Sobrevivencia en turba

Se realizó un recuento el día antes a realizar los ensayos de campo (30 días post inoculación de la turba). Se tomó asépticamente 1g de turba inoculada y se suspendió en 100 mL de pirofosfato de sodio ($Na_4P_2O_7$) 0.1% estéril. Se realizaron 6 diluciones seriadas al décimo, de las cuales se sembraron, por triplicado, gotas de 10µL en placas de KB Nal^{30}. Los recuentos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron por 24 horas a 30°C.

4.3.3 Bacterización de las semillas de alfalfa utilizando turba como soporte

Se realizó la bacterización de las semillas de alfalfa, un día antes de que se comenzara con el ensayo de campo. Las semillas de alfalfa recibieron dos tratamientos antes de la siembra. Por un lado, se preparó una mezcla del inoculante de turba conteniendo partes iguales de la cepa *P. fluorescens* C119 (50g/kg de semilla) y el inoculante comercial *Sinorhizobium meliloti* U45 (50g/kg de semilla) brindado por Lage & Cia. Por otro lado, se inocularon semillas únicamente con rizobio comercial diluido con turba estéril, también en partes iguales, para obtener una

densidad de inóculo similar a la del tratamiento con *P. fluorescens* C119. Este último fue utilizado como tratamiento control. A estas mezclas, se les agregó una solución adherente de metilcelulosa al 1.5%, según las especificaciones del fabricante y se mezclaron con semillas de alfalfa del cultivar Chaná, en una proporción 50g de inoculante por kg de semillas.

4.3.4 Recuentos bacterianos en semillas de alfalfa bacterizadas

Para cuantificar el número de bacterias adheridas a las semillas de alfalfa se realizaron recuentos de UFC/semilla. Estos recuentos se realizaron el mismo día en que las semillas fueron bacerizadas. Se colocaron 10 semillas bacterizadas en 10 mL de $Na_4P_2O_7$ al 0.1% estéril adicionado con tween al 2.5%, y se agitaron vigorosamente en vortex por 10 minutos. Se realizaron 3 diluciones seriadas al décimo y se sembraron, por triplicado, gotas de 10µL en placas de KB Nal[30]. Las placas fueron incubadas por 24 horas a 30°C.

4.3.5 Ensayos en condiciones de campo

El ensayo de campo se realizó durante la temporada otoño-invierno 2012. Se llevó a cabo en un predio (figura 2) brindado por un productor agropecuario, con historia previa de siembra de alfalfa. Se hizo un muestreo de la composición del suelo del predio, en el cual se extrajo 5cm de suelo superficial en diez puntos distribuidos a lo largo del área de siembra. Esta muestra compuesta se envió a analizar en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de INIA-La Estanzuela.

Figura 2 - Predio donde se realizó el ensayo de campo.

El diseño experimental del ensayo consistió en parcelas distribuidas al azar con cuatro repeticiones para cada uno de los dos tratamientos. Cada unidad experimental consistió en siete hileras de dos metros de largo cada una (100 semillas/m) separadas entre ellas por 30 cm. Las parcelas fueron separadas por dos metros entre ellas (figura 3).

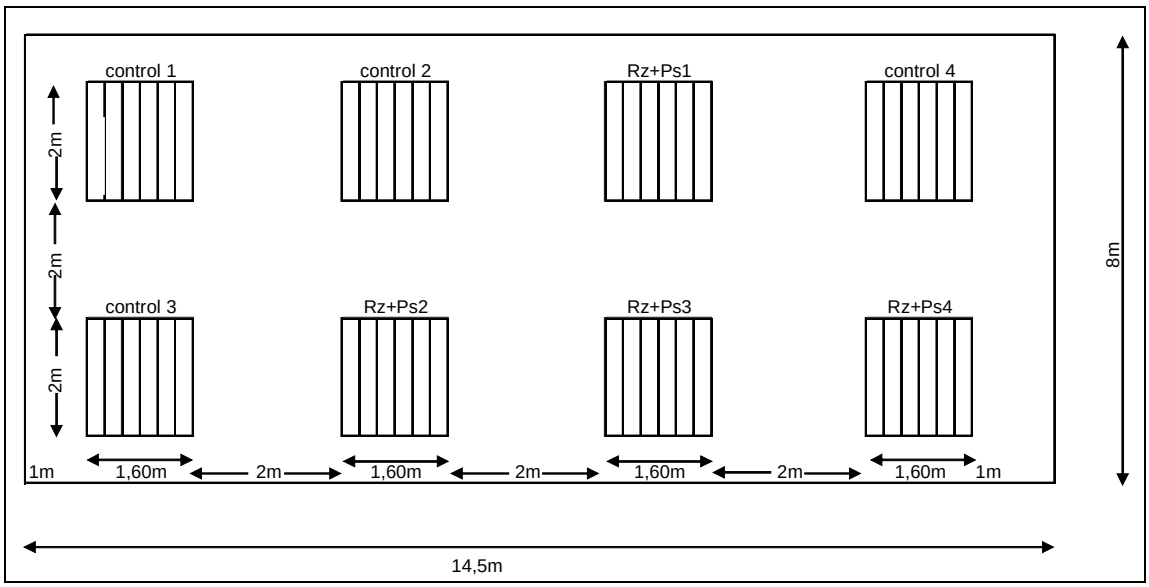

Figura 3 - Esquema del diseño experimental del ensayo de campo realizado. Referencias: control: Parcelas donde se plantaron semillas inoculadas con el tratamiento control. Rz+Ps: Parcelas donde se plantaron semillas inoculadas con la cepa C119 + el rizobio comercial. Los números indican el número de parcela.

Recuento de plantas de alfalfa

Para determinar el promedio de plantas de alfalfa emergidas para cada tratamiento, se contaron el total de las plantas de las tres hileras centrales de cada parcela a los 21 días post siembra. La sobrevivencia de las plantas se monitorizó realizando recuentos a los días 42, 82 y 121. En los cuatro muestreos se contaron las plantas de las tres hileras centrales y se promedió el número de plantas sobrevivientes para cada tratamiento.

Colonización de la raíz de alfalfa por la cepa P. fluorescens C119

Para evaluar la capacidad colonizadora de la raíz de alfalfa por la cepa *P. fluorescens* C119, se tomaron raíces de plantas de alfalfa, de las dos hileras de los bordes de las parcelas, provenientes del tratamiento de las plantas inoculadas con la cepa *P. fluorescens* C119 y el rizobio comercial (10 plantas por repetición). Se siguió la colonización de las raíces por la cepa 119 a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra. Se realizó un pool con las raíces de las plantas cosechadas. Éstas fueron suspendidas en 10 mL de $Na_4P_2O_7$ y agitadas vigorosamente en vortex durante diez minutos. Luego se realizaron diluciones seriadas y se sembraron gotas de 10µL en placas de KB Nal^{30} Amp^{50} $Chex^{100}$, las cuales fueron incubadas por 24horas a 30°C. Los recuentos se realizaron por triplicado. Finalmente se secaron las raíces y se pesaron las raíces. Se calculó el número de UFC/g de raíz.

Peso seco de la biomasa aérea

A los 121 días post siembra se evaluó el peso seco de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa que provenían de las semillas bacterizadas con la cepa *P. fluorescens* C119 y el rizobio comercial y se lo comparó con el peso seco de las plantas del tratamiento control. Se cortó la parte aérea de las plantas de alfalfa, que se encontraban en las tres líneas centrales de la unidad experimental, de ambos tratamientos y se las seco en estufa a 60°C durante 96 horas.

Luego fue pesada en balanza de precisión. Los resultados se informaron como porcentaje del peso de la biomasa aérea de cada planta. Se tomó como 100 % el promedio del peso de la biomasa aérea de las plantas del tratamiento control.

Evaluación del contenido de fósforo y nitrógeno de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa

El contenido de fósforo y nitrógeno presentes en la biomasa aérea de las plantas de alfalfa se analizó en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Agua de INIA La Estanzuela. El análisis se realizó para plantas provenientes de los dos tratamientos. Para ello se utilizaron plantas elegidas al azar de las dos hileras más externas de cada parcela.

4.4 Impacto de la inoculación de *P. fluorescens*C119 en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa

4.4.1 Extracción de ADN de la rizósfera de alfalfa

Se extrajo el ADN total de la comunidad bacteriana presente en la rizósfera de las plantas de alfalfa tratadas con la cepa *P. fluorescens* C119 y el rizobio comercial y de las plantas pertenecientes al tratamiento control.

Se cosecharon 10 plantas a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra para obtener suelo rizosférico, según el método descripto por Smalla et al., 2001. Se suspendieron las raíces de alfalfa de las 10 plantas en 9mL de Na_4P2O_7. Éstas fueron agitadas vigorosamente en vortex durante cinco minutos. Se retiraron las raíces y se centrifugó el tubo conteniendo el suelo desprendido de las raíces a 500g por cinco minutos. El sobrenadante fue colectado en un tubo estéril. Este procedimiento fue repetido tres veces. Luego se combinaron los sobrenadantes obtenidos en tubo estéril, el cual se centrifugó a 10000g durante 30 minutos. El pellet fue guardado a -80°C para su posterior procesamiento. Se obtuvieron un total de 32 muestras.

El ADN total de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa fue obtenido a partir del pellet guardado. La extracción del ADN fue realizada utilizando el sistema Power-soil (MoBio) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1.0X (100 v durante 1 hora).

4.4.2 Amplificación del gen de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano

A partir del ADN total obtenido de la rizósfera de las plantas de alfalfa, se amplificó por PCR, un fragmento del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Para realizar la reacción de PCR, se utilizaron los siguientes cebadores universales para el dominio Bacteria, el cebador *forward* F968-GC, que contiene en el extremo 5'terminal una región rica en GC y el cebador *reverse* R1378 (Heuer et al., 1997). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50µl conteniendo 1X de buffer de reacción, MgCl2 2,5mM, dNTPs 0,2mM, 0,2µM de cada cebador, 0,1mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), formamida 1%, 2,5U de Taq polimerasa, y 1µl de una dilución 1/10 de cada muestra. Para la reacción de PCR se utilizó el siguiente ciclado: temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 2 min; un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 min, un ciclo de hibridación a 55°C durante 1 min y un ciclo de extensión a 72°C durante 2 min. Los ciclos se repitieron 35 veces y se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 1% en TAE 1.0X, a 100v, durante 45 minutos. Como control positivo se utilizó el ADN genómico de la cepa C119.

4.4.3 Análisis de la comunidad bacteriana rizosférica

Los productos de PCR obtenidos se analizaron por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) en un equipo C.B.S. Scientific, en buffer TAE (Tris-acetato, EDTA; pH 7.5) 0,5 X a 60°C. Los geles de poliacrilamida contenían un 6% de acrilamida y un gradiente de agentes desnaturalizantes de 40-65% (100% de agentes desnaturalizantes: urea 7M y formamida 40%

(v/v), previamente desionizada con la resina AG® 501-X8 de Bio-Rad). La corrida electroforética se llevó a cabo a 70V durante 16 horas (Peixoto et al., 2002). El marcador de peso molecular usado fue el Gene Ruler 1Kb plus DNA Ladder (de 75 a 20000 pares de bases) de Thermo Scientific. Los geles se revelaron con SYBR green durante 1 hora y se visualizaron bajo luz UV utilizando el equipo Multi-purpose image scanner Fuji Film Fla-9000. El análisis de los perfiles de bandas de ADN se realizó mediante el programa Gel Compar II Versión 6.5 de Applied Maths (http://www.applied-maths.com/gelcompar-ii). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson's para determinar la distancia métrica y el algoritmo UPGMA para construir los dendogramas.

4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para el número de plantas, el peso seco y el contenido de N y P de las mismas se analizaron mediante el programa Statistica 5.0. Se examinó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos en que la distribución de los datos era normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento como factor) y el test LSD (del inglés, *Fisher's Least Significant Difference*). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney.

Para analizar posibles diferencias en los perfiles de las comunidades bacterianas de la rizósfera se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA: principal components analysis) utilizando el programa PAST (Hammer et al., 2001).

5. Resultados

5.1 Evaluación de los posibles mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y de la actividad antagónica de la cepa C119

5.1.1 Ensayos de antagonismo in vitro

Se estudiaron algunos de los posibles mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal presentes en la cepa *P. fluorescens* C119, antes de comenzar los ensayos de campo. Inicialmente se analizó la capacidad de la cepa C119 de antagonizar *in vitro* diferentes fitopatógenos: *P. debaryanum*, *R. solani*, *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp. (Tabla 5).

Tabla 5 - Porcentaje de inhibición del crecimiento de diferentes fitopatógenos por a *P. fluorescens* C119. Se midió el área de crecimiento fúngico y se comparó con un control sin antagonista.

Organismo blanco	% inhibición
Pythium debaryanum	65,6
***Alternaria* sp.**	42,8
***Fusarium* sp.**	33,8
Rizoctonia solani	40

5.1.2 Análisis de los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal

Se analizó la capacidad de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 de producir AIA *in vitro.* En las condiciones proporcionadas por este ensayo (ver punto 4.2.1 en la sección "Materiales y Métodos) no se observa viraje de color de amarillo a rojo, que aparece si hay AIA en el sobrenadante (figura 4).

Figura 4 - Producción de AIA. No se observó producción de AIA por la cepa *P. fluorescens* C119. Se utilizó como control positivo a la cepa *P. fluorescens* αT688 y como control negativo a la cepa P. fluorescens UP-148.

La solubilización de fosfato inorgánico puede ser uno de los medios por los cuales las bacterias rizosféricas promueven el crecimiento vegetal. Se evaluó la capacidad solubilizadora de fosfato de la cepa *P. fluorescens* C119 mediante el cultivo de la misma en un medio conteniendo $Ca_3(PO_4)_2$ de forma cualitativa. Se observó que la cepa *P. fluorescens* C119 es positiva para dicho ensayo, ya que se formó un halo transparente por debajo y alrededor de la colonia (figura 5). Como control positivo se utilizó la cepa *P. fluorescens* αT512 (Yanes, 2007).

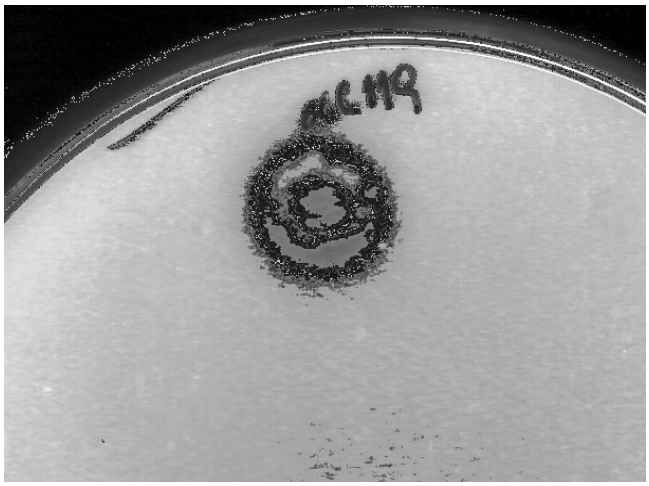

Figura 5 - Solubilización de fosfato inorgánico. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia indicaría que la bacteria es capaz de solubilizar fosfato tricálcico.

Por otro lado se evaluó la capacidad e la cepa de mineralizar fosfato orgánico en forma de fitato, para ello, se creció a la cepa *P. fluorescens* C119 en un medio conteniendo fitato como única fuente de fósforo y se comparó su crecimiento con un control negativo sin fuente de fósforo y un control positivo utilizando una fuente de fósforo soluble (KH_2PO_4/K_2HPO_4). Si consideramos las condiciones planteadas para el ensayo (ver punto 4.2.1 "*Mineralización de fosfato orgánico"*) aunque C119 presenta cierto crecimiento en el medio con fitato, no se puede aseverar que la cepa *P. fluorescens* C119 sea capaz de utilizarlo como fuente de fósforo (figura 6), ya que el ensayo no se realizó en presencia de controles, como se explicará más adelante en el punto 6.1 de la sección "Discusión".

Figura 6 - Mineralización de fosfato orgánico, A: *P. fluorescens* C119 crecida en medio SMM con fuente de fósforo KH_2PO_4/K_2HPO_4. B: *P. fluorescens* C119 crecida en medio SMM sin ninguna fuente de fósforo. C: *P. fluorescens* C119 crecida en medio SMM con fitato como fuente de fósforo.

5.1.3 Análisis de los mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal.

La producción de HCN (ácido cianhídrico) por parte de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 se evidenció por el viraje de color de un papel de filtro impregnado con ácido pícrico y carbonato de sodio (Na_2CO_3), de amarillo a naranja (figura 7).

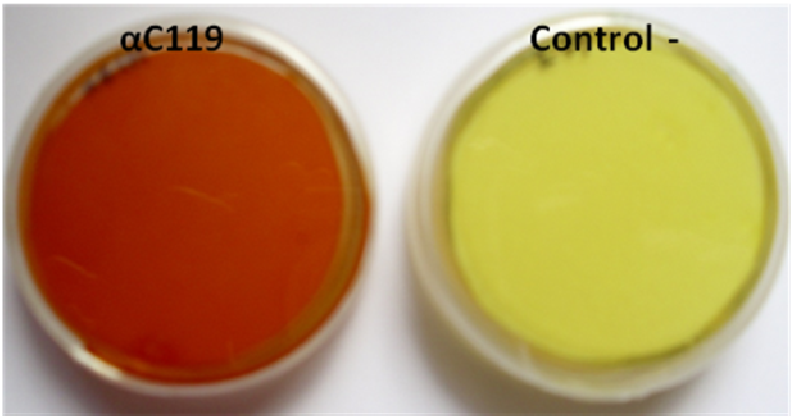

Figura 7 - Producción de HCN. A la derecha se encuentra el control negativo (*P. fluorescens* 2-79) y a la izquierda se encuentra la placa conteniendo a la cepa *P. fluorescens* C119, la prescencia de HCN se evidencia por el viraje de color de amarillo a rojo.

Otro mecanismo posible de biocontrol es la hidrólisis de polisacáridos comúnmente encontrados en las paredes de los hongos fitopatógenos, como la celulosa y los β-1,3-glucanos. En este trabajo se evaluó la producción de celulasas por la cepa *P. fluorescens* C119 mediante crecimiento en un medio base suplementado con CMC (carboximetilcelulosa). La

cepa C119 no mostró actividad celulolítica en las condiciones de este ensayo (datos no mostrados).

5.2 Ensayos en condiciones de campo: evaluación de la protección frente a enfermedad y promoción del crecimiento vegetal en alfalfa por la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119

5.2.1 Condiciones iniciales del ensayo de campo

Las características del suelo donde se realizó el ensayo se detallan en la tabla 6.

Tabla 6 - Características fisicoquímicas y textura del suelo utilizado para el ensayo de alfalfa. P (BrayI): fósforo por método de BrayI; C. Org: Carbono orgánico; CE: conductividad eléctrica; A. tit: acidez titulable; $ClCpH_7$: bases + acidez titulable; % Sat: % de saturación.

P(Bryal) µg P/g	pH (H_2O)	C org %	N %	Fe mg/kg	Textura (familia textural)			
					%Arena	%Limmo	%Arcilla	Clasificación
28,0	5,0	2,17	0,2	101,0	27	41	32	*Franca*

CE (mmhos/cm 25ºC)	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	K (meq/100g)	Na (meq/100g)	A.tit (meq/100g)	$ClCpH_7$ (meq/100g)	Bases T. (meq/100g)	%Sat Bases
0,5	10,1	3,6	0,38	0,25	4,9	19,2	14,3	74,5

Se analizó por triplicado el número de UFC/g de turba del inoculante formulado para la bacterización de semillas de alfalfa con la cepa *P. fluorescens* C119. La cepa se encontró en un promedio de 7,07 x 10^8 UFC/g de turba (30 días de preparado).También se analizó la adherencia de la cepa *P. fluorescens* C119 a las semillas de alfalfa. Se encontró, que en promedio había en el orden de 2,43 x 10^3 UFC/semilla.

5.2.2 Emergencia e implantación de la alfalfa

La sobrevivencia de las plantas de alfalfa se monitorizó contando el número de plantas de alfalfa presentes en cada parcela a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra. Se realizó el promedio de las plantas presentes en cada parcela para cada uno de los tratamientos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en el número de plantas para el mismo tiempo de muestreo.

Se comparó el promedio de las plantas emergidas al principio (21 días post siembra) y al final del ensayo (121 días post siembra) y se observa una diferencia significativa en el número de las plantas que sobrevivieron a lo largo del tiempo que duró el estudio. Las plantas que fueron tratadas con la cepa C119 tuvieron una sobrevivencia significativamente mayor que las que fueron tratadas solamente con el rizobio comercial (figura 8)

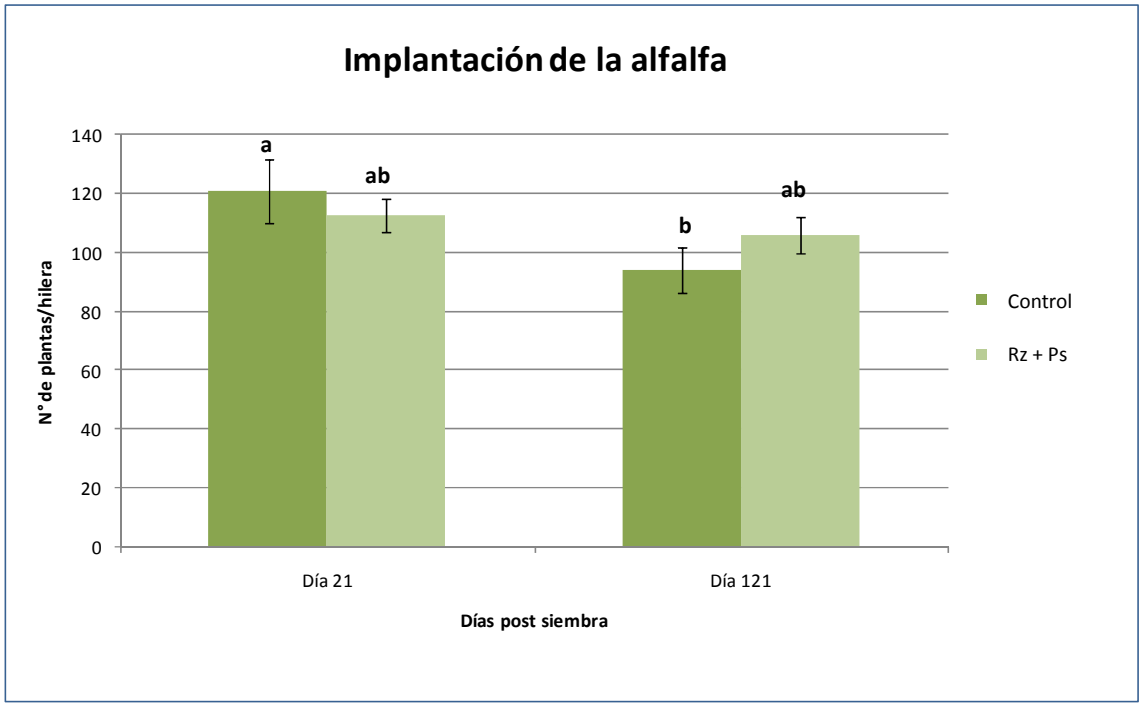

Figura 8 - Número de plantas de alfalfa que sobrevivieron a lo largo del ensayo. Referencias: Control: plantas solamente inoculadas con rizobio comercial; Rz + Ps: plantas inoculadas con el rizobio comercial + la cepa C119.

5.2.3 Colonización de la raíz

Se tomaron muestras en diferentes momentos del ensayo para determinar la presencia de la cepa en la raíz de la alfalfa. Se observó que a los pocos días de comenzado el ensayo (21 días post siembra) ésta alcanzó recuentos del orden de 10^6 UFC/g de raíz, lo cual se mantuvo durante los siguientes muestreos, a los 42, 82 y 121 días post siembra (figura 9).

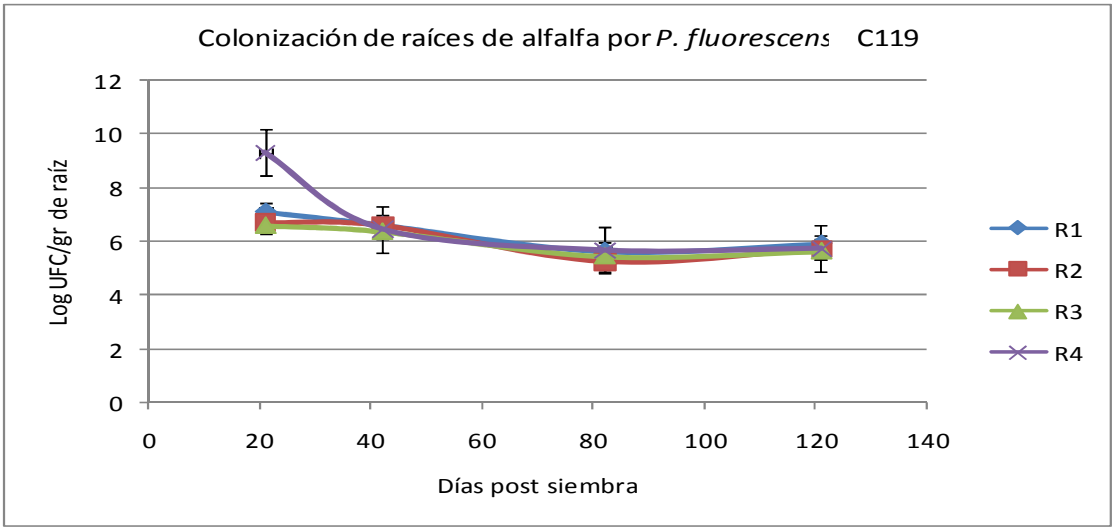

Figura 9 - Gráfico de la colonización de la raíz de alfalfa por la cepa *P. flourescens* C119. Se muestra como ésta se mantuvo en recuentos del orden de 10^6 UFC/g de raíz durante los 121 días de ensayo. Referencias: R: Número de repetición.

5.2.4 Análisis de la promoción del crecimiento vegetal

Peso seco de la biomasa aérea

Se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas de alfalfa cosechadas a los 121 días. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos, observándose un aumento del 41% en la biomasa seca en las plantas inoculadas con *P. fluorescens* C119 y el rizobio comercial con respecto al control (figura 10). Cadaplanta del tratamiento control peso en promedio 3,2 g, mientras que las plantas inoculadas con el rizobio comercial y la cepa C119 pesaron en promedio 4,5 g.

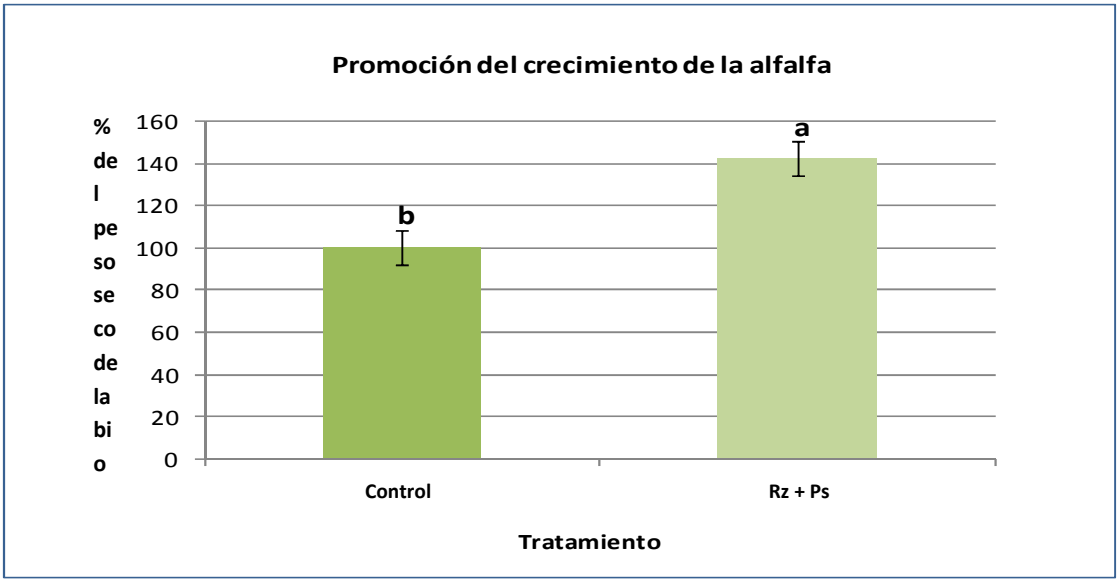

Figura 10 - Porcentaje del peso seco de la biomasa aérea de las plantas de alfalfa. Las plantas tratadas con *P. fluorescens* C119 tuvieron un peso seco de 41% mayor que las plantas solamente tratadas con el inoculante de rizobio comercial. Se utilizó como 100 % el peso promedio de las plantas del tratamiento control. Referencias: Control: plantas inoculadas solo con el rizobio comercial; Rz + Ps: Plantas inoculadas con el rizobio comercial + la cepa C119.

Análisis de los contenidos de fósforo y nitrógeno de la biomasa aérea

Se analizó el contenido de fósforo y nitrógeno de la parte aérea de las plantas de alfalfa. Aunque se evidenció que tanto el contenido de fósforo, como el de nitrógeno, eran mayores en las plantas tratadas con la cepa *P. fluorescens* C119 que en las tratadas únicamente con el rizobio comercial. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 11).

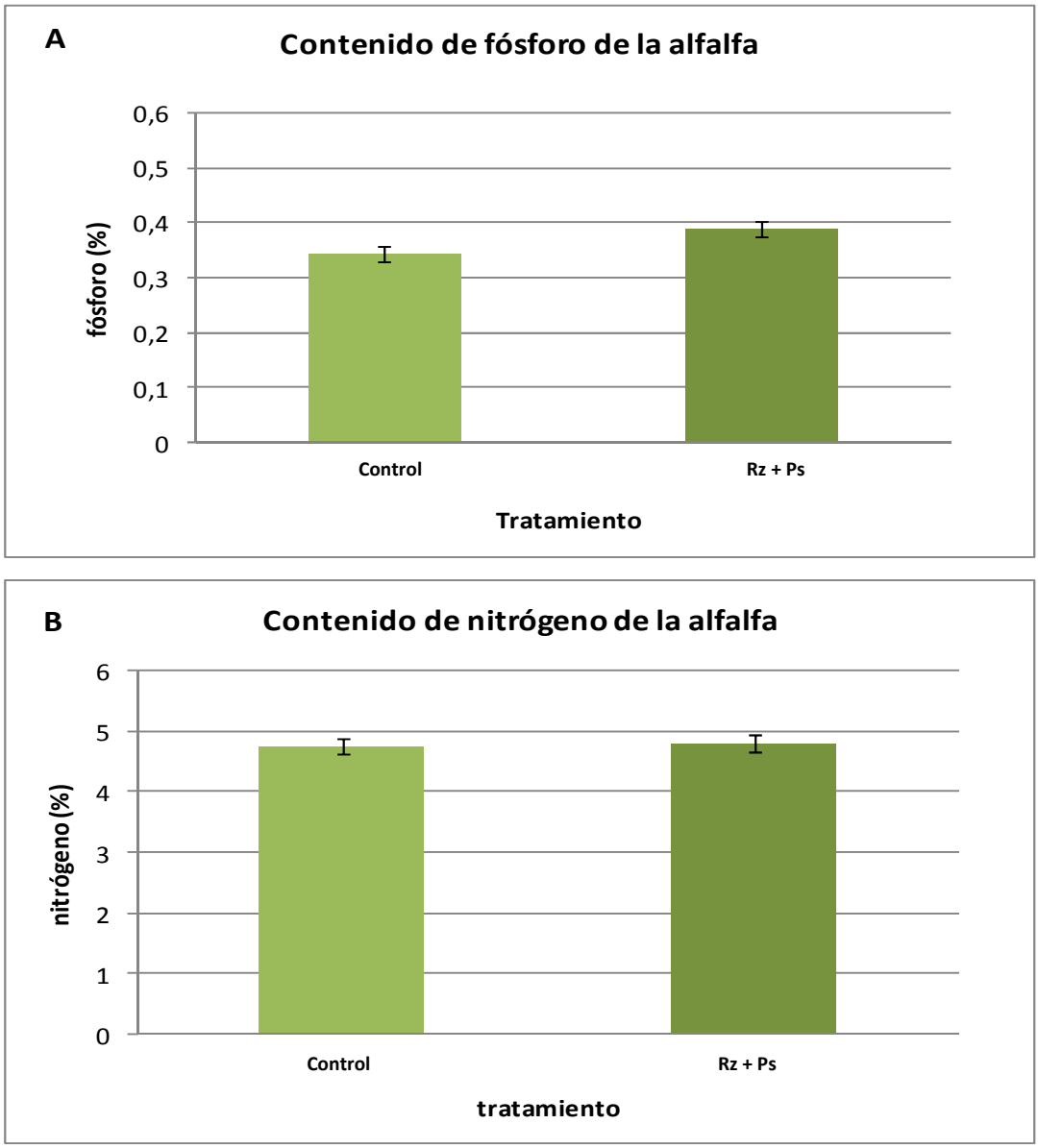

Figura 11 - Gráfico del contenido de fósforo (% del contenido de fósforo por g de biomasa aérea) y nitrógeno (% del contenido de nitrógeno por g de biomasa aérea). Se indica el error estándar de cada medida. Referencias: Control: plantas inoculadas solo con el rizobio comercial; Rz + Ps: Plantas inoculadas con el rizobio comercial + la cepa C119.

5.3 Impacto en la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa

5.3.1 Extracción de DNA de la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa

A partir del DNA genómico total extraído de las muestras de suelo rizósferico de alfalfa, colectadas a los 21, 42, 82 y 121 días post siembra, se amplificó por PCR un fragmento del gen 16S rARN y se analizó mediante DGGE.

Se corroboró que el ADN extraído de las 32 muestra fuera de alto peso molecular (figura 12), de concentración y pureza adecuadas para utilizar en las reacciones de PCR siguientes requeridas por la técnica de DGGE.

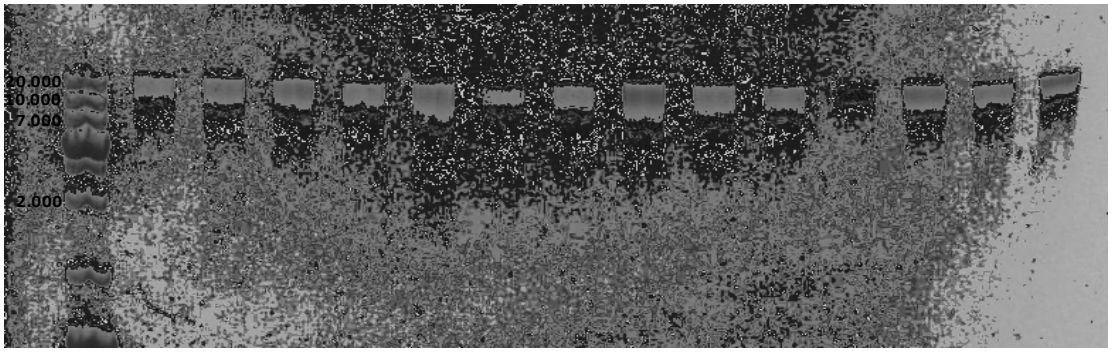

Figura 12 - Electroforesis en gel de agarosa de algunas de las extracciones de ADN total a partir de muestras de rizósfera. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder -Thermo Scientific- (75-20000 pb).

5.3.2 Amplificación por PCR del gen del ARNr 16S

A partir del ADN extraído se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores universales para el dominio bacteria (F968-GC y R1378). Estos amplifican la región V6 del gen del ARNr 16S, que es la región de mayor variabilidad dentro del mismo, permitiendo de esta forma optimizar el análisis de la comunidad bacteriana (Brons & van Elsas 2008). Dichos cebadores se unen a las bases 968-984 y 1378-1401 del gen (posiciones correspondientes al gen del ARNr de *Escherichia coli*). La única banda obtenida a partir de esta reacción fue de 450 pares de bases

(Araújo et al. 2002), de los cuales 410 pb corresponden al amplicón de interés y 40 pb a la grampa GC (figura 13).

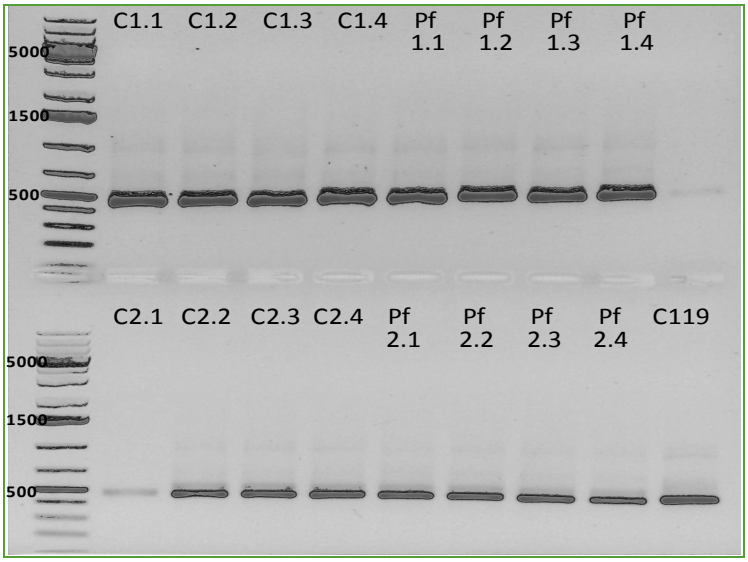

Figura 13 - Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para un fragmento del gen del ARNr 16S de *Eubacteria* obtenido del ADN total de suelo rizosférico de los muestreos 1 (21 días post siembra) y 2 (42 días post siembra). Se indican los amplificados provenientes de muestras inoculadas con la cepa C119 y de muestras del control. (Arriba: carriles 2 al 9: primer muestreo; Abajo: carriles 2 al 8: segundo muestreo; carril 10 amplificación a partir de ADNg de C119). C: control; Pf: coinoculación rizobio + *Pseudomonas.*

5.3.3 Análisis de la comunidad microbiana por DGGE

Los productos de PCR obtenidos se sembraron en los geles de poliacrilamida, para proseguir con el análisis por DGGE. De cada producto de PCR, se sembraron 10 µl, excepto para la muestra Rz+Ps del muestreo 1 (21 días post siembra), de la cual se sembró el doble de producto de PCR, ya que la concentración de ADN era menor que la de las otras muestras. Los patrones visualizados en los geles de DGGE (figura 14) mostraron un gran número de bandas para todas las muestras excepto para el control 1 del segundo muestreo (C2.1), que presentó pocas bandas tenues.

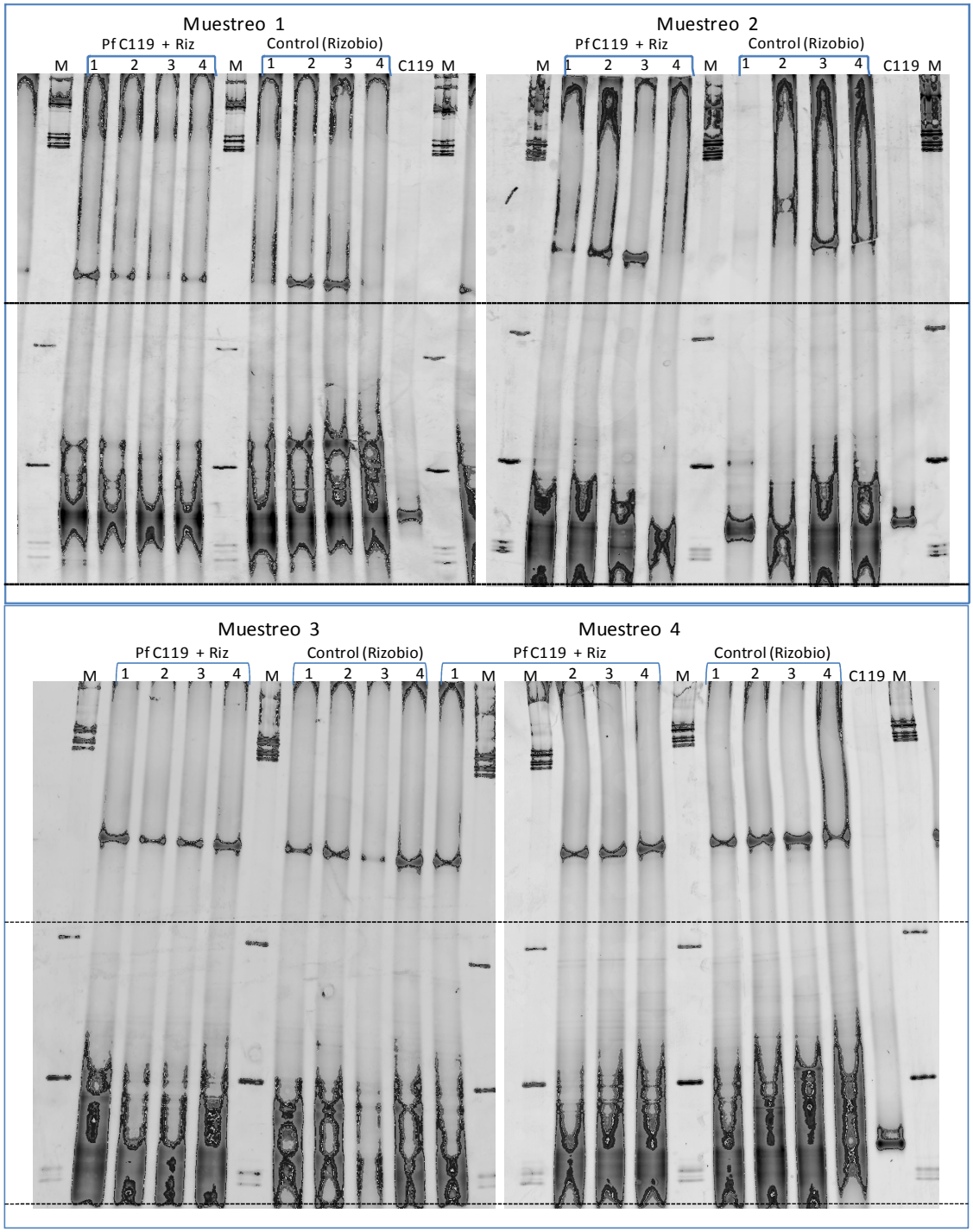

Figura 14 - Gel de DGGE de los productos de amplificación del fragmento del gen codificante para el ARNr 16S. Perfiles de bandas obtenidos por PCR a partir del ADN genómico total presente en la rizósfera de alfalfa para los dos tratamientos: control (inoculado únicamente con rizobio) y la inoculación con la cepa C119 + el rizobio. Se muestran resultados para las cuatro repeticiones de los dos tratamientos. Muestreo 1: 21 días post siembra; Muestreo 2: 42 días post siembra; Muestreo 3:82 días post siembra; Muestreo 4: 121 días post siembra. M: marcador de migración; C119: banda obtenida de la amplificación del 16SrDNA a partir de ADN genómico de la cepa C119. Con dos líneas de trazos se indica el área que se tuvo en cuenta para el análisis.

Los geles se analizaron con el programa Gel Compar II tomando en cuenta las zonas donde se presentaron las bandas más nítidas. Se realizó un análisis de agrupamiento de las muestras en forma de dendograma con el patrón de bandas obtenido (figura 15). Se observaron dos grandes grupos de perfiles bien diferenciados. Un grupo estaba compuesto por las muestras obtenidas el día 21 (M1: muestreo 1) y el otro grupo por las restantes muestras, habiendo entre ambos menos de un 40% de similitud. Las plantas obtenidas en el M1 presentaron comunidadaes bacterianas similares para los dos tratamientos, con un 88% de similitud entre ellos. El otro grupo conformado por el resto de las muestras también presentó patrones de bandas muy similares entre sí para los tratamientos con la cepa C119. En general, los perfiles de las comunidades bacterianas se agruparon de acuerdo al momento del muestreo. Para analizar posibles diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana de los dos tratamientos, se extrajo la matriz de datos correspondiente al perfil de bandas de cada muestra mediante el programa Gel Compar. Con dicha matriz se realizó un análisis de componentes principales utilizando el programa estadístico PAST. De esta forma se puedo observar que la estructura de las comunidades bacterianas fue modificándose a lo largo del ensayo, sin observarse diferencias entre tratamientos. Los dos últimos muestreos presentaron estructuras muy similares (figura 16).

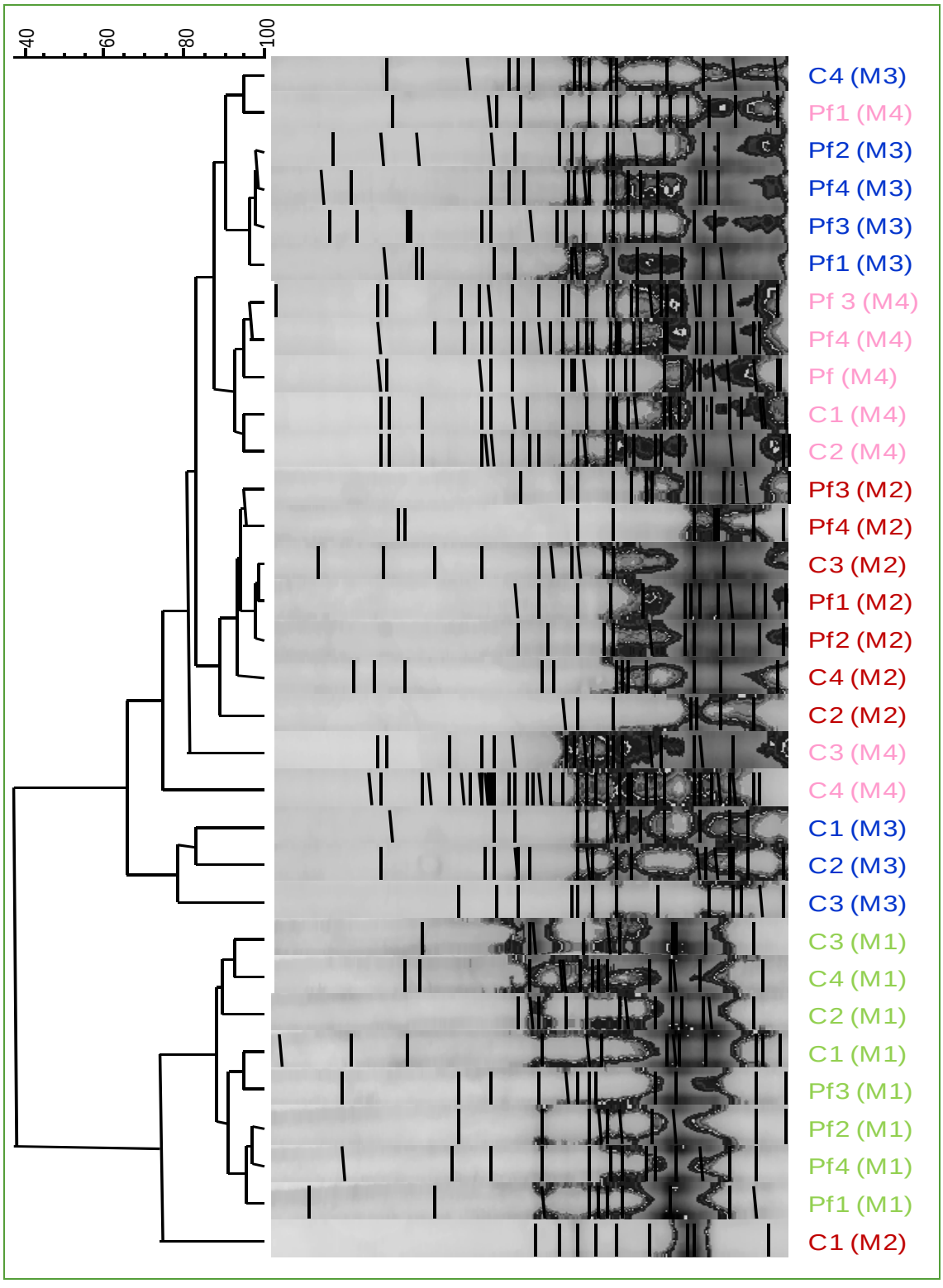

Figura 15 - Dendograma obtenido a partir del análisis por DGGE de la comunidad bacteriana del suelo rizósferico de alfalfa. Se indica con Pf a las plantas inoculadas con la cepa *P. fluorescens* C119 y con C a las plantas correspondientes al tratamiento control. Con números se indica la repetición y con la M se indica el número de muestreo.

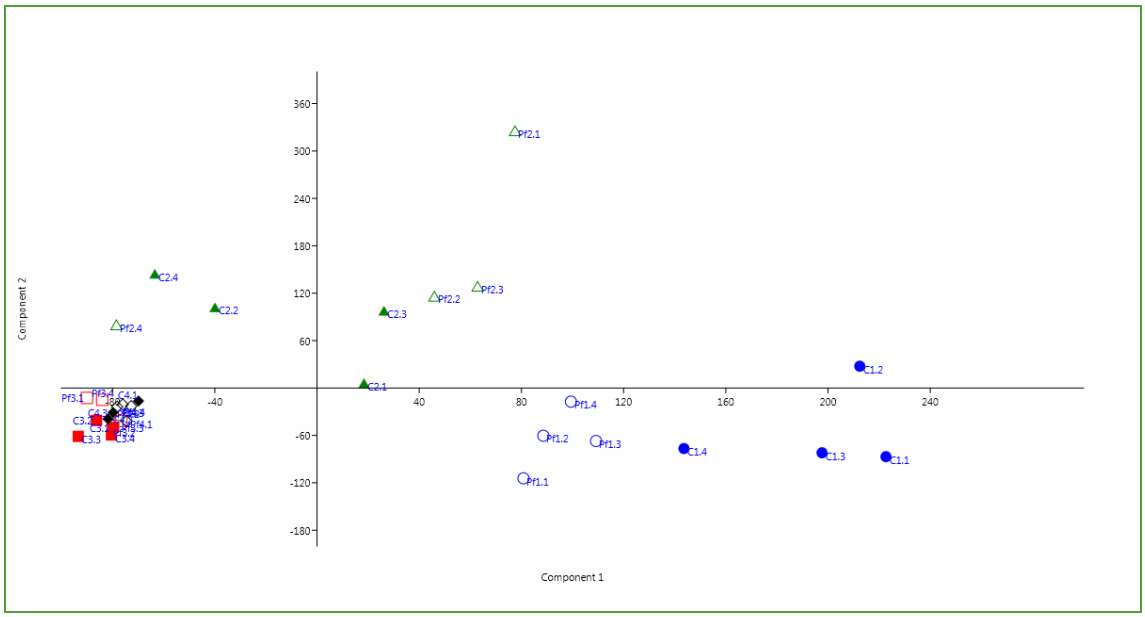

Figura 16 - Análisis de componentes principales de perfiles de bandas obtenidos por DGGE. El color verde representa el muestreo 1, el color azul representa el muestreo 2, el color rojo representa el muestreo 3 y el color negro representa el muestreo 4. Los datos correspondientes al control se indican con una C y lo correspondientes al tratamiento con C119 con Pf. Se observa que el muestreo 1 se diferencia del resto de los muestreos. Lo mismo sucede para el muestreo 2 y los muestreos 3 y 4 no se diferencian ente sí. El componente 1 explica el 26,1% de la varianza observada mientras que el componente 2 explica el 20,7%.

6. Discusión

6.1 Mecanismos de promoción directa del crecimiento vegetal y biocontrol presentes en la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119

La cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 fue seleccionada de un grupo de 702 *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de la rizósfera de alfalfa provenientes de alfalfares de distintos puntos del país. La cepa C119 proviene de un alfalfar en el departamento de Colonia, que ya tenía 3 años de establecido. Ensayos preliminares demostraron que esta cepa era capaz de proteger a la alfalfa del *damping-off* causado por *P. debaryanum* y promover un aumento de la biomasa vegetal en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y humedad. (Yanes et al., 2012).

Según Dwievedi & Johri, (2003), la selección de cepas para su utilización como agentes de control biológico requiere un análisis de los posibles metabolitos secundarios que son capaces de producir, ya que su síntesis está regulada según factores bióticos y abióticos. Trabajos previos habían descartado que la cepa C119 pudiera producir algunos de los antibióticos más estudiados en *Pseudomonas* fluorescentes, como ser fenazina, pirrolnitrina, pioluteorina y diacetil-fluoroglucinol (Yanes, 2007). Sin embargo algunos mecanismos no habían sido analizados, como por ejemplo algunas enzimas líticas o habían dado resultados dudosos como la producción de AIA. Por lo tanto, se procedió a realizar ensayos para corroborar la capacidad de esta cepa de producir algunos metabolitos secundarios que están involucrados de manera directa o indirecta en la promoción del crecimiento vegetal. También se realizaron ensayos de antagonismo contra diferentes fitopatógenos para determinar si era capaz de antagonizar hongos de diferentes tipos.

Los mecanismos más conocidos de promoción del crecimiento vegetal presentes en *Pseudomonas* fluorescentes son la solubilización del fosfato inorgánico presente en el suelo

(Rodríguez & Fraga, 1999) y la producción de ácido indolacético (Patten & Glick, 2002). Los ensayos *in vitro* permitieron demostrar que la cepa C119 era capaz de solubilizar fosfato tricálcico mientras que por otro lado se ratificó que no era capaz de producir AIA (figuras 5 y 4, respectivamente). La capacidad de la cepa *P. fluorescens* C119 para mineralizar fosfato orgánico también fue analizada. El fosfato orgánico constituye el 50% del fosfato del suelo que no está disponible para la absorción directa por las plantas, de este 50% la mayoría, corresponde a lo que se conoce como fitatos (Richardson & Hadobas, 1997). Por ello se realizó un ensayo *in vitro* para determinar si la cepa C119 era capaz de mineralizar fosfato orgánico y utilizarlo como única fuente de fósforo (figura 6). En este ensayo la cepa fue crecida en un medio mínimo suplementado con fitato. Se comparó el crecimiento de la cepa con fitato como única fuente de fósforo con el crecimiento de la cepa en una placa donde se utilizó el mismo medio de cultivo suplementado con un buffer fosfato (KH_2PO_4 + K_2HPO_4 en partes iguales) y el crecimiento de la misma en una placa sin fuente de fósforo agregada. Se observó que cuando el fitato fue la única fuente de fósforo en el medio de cultivo, la cepa C119 presenta un mayor crecimiento (o desarrollo de las colonias) respecto a la cepa crecida en ausencia de fuente de fósforo, pero menor que el crecimiento observado en presencia de fuentes de fosfato solubles (Crecimiento placa con fósforo soluble > crecimiento placa con fitato > crecimiento placa sin fosforo). Sin embargo, no podemos afirmar que la cepa produce fitasas, ya que habría que verificar que el crecimiento observado no se deba al pasaje de fósforo libre del cultivo en el que fue crecida anteriormente o a la presencia de trazas de fósforo en el fitato de sodio utilizado, o a ambas posibilidades sumadas. Sería recomendable realizar el ensayo en presencia de controles, como por ejemplo una cepa bacteriana cuya producción de fitasas esté confirmada y un control negativo consistente en una cepa incapaz de utilizar fitato como fuente de fósforo. Por otra parte también se podrían realizar ensayos que confirmaran la

presencia de genes que codifican para este tipo de enzimas en la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119, como por ejemplo PCR con cebadores específicos para fitasas bacterianas.

Se confirmó la capacidad de la cepa C119 para antagonizar *in vitro* a un aislamiento de *P. debaryanum* fitopatógeno. La cepa fue capaz de inhibir su crecimiento en un 65,6 % comparado con la placa control. También fue capaz de antagonizar a otros patógenos comunes del suelo (*Rizoctonia solani, Alternaria sp.*y *Fusarium sp.*), aunque en menor medida. En general, las condiciones de crecimiento restringidas, como escasez de nutrientes, y altas densidades poblacionales favorecen el metabolismo secundario en los microorganismos con lo cual se estimula la síntesis de compuestos antifúngicos (Haas & Défago, 2005). Se confirmó que la cepa C119 es capaz de producir HCN, un compuesto volátil supresor de patógenos, ampliamente reportado en *Pseudomonas* fluorescentes (Nowak –Thompson et al., 1994; Voisard et al., 1989; Pierson & Weller, 1994; Haas & Keel, 2003; Walsh et al., 2001; Lugtemberg et al., 2002). Trabajos previos demostraron además que la cepa C119 presenta actividad proteolítica extracelular (Yanes, 2007) y es capaz de producir un lipopéptido cíclico con efecto inhibidor sobre el crecimiento del *P. debaryanum* (Yanes et al., 2012).

Los factores ambientales influyen de gran forma sobre el comportamiento de los microorganismos, por lo que los resultados de los ensayos *in vitro* o en condiciones controladas no siempre concuerdan con los resultados obtenidos en ambientes tan variables como la rizósfera de plantas que crecen en condiciones de campo (Yanes, 2007). Por ello es de importancia someter a la cepa a ensayos de campo para corroborar su potencial como PGPR.

6.2 Promoción del crecimiento vegetal y protección de enfermedad de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 sobre la alfalfa (*Medicago sativa L*) en condiciones de campo.

La mayoría de los trabajos sobre aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en alfalfa han sido realizados en condiciones controladas, este hecho se debe a que en los ensayos realizados en el campo es difícil controlar todos los factores complejos que pueden interferir con el estudio (Guiñazú et al., 2010; Villacieros et al., 2003; Younesi et al., 2013; Setten et al., 2013). El presente trabajo de campo se realizó en el mes de marzo de 2012 y duró un total de 121 días. Se evaluó la capacidad protectora de la cepa C119, su capacidad colonizadora y si era capaz de promover el crecimiento vegetal en plantas de alfalfa.

6.2.1 Evaluación de la técnica de inoculación

Las semillas de alfalfa fueron inoculadas utilizando una formulación a base de turba. Según Bashan y colaboradores (2013) la formulación de un inoculante debe cumplir con las siguientes características: 1) sostener el crecimiento del microorganismo, 2) mantener un número de células viables en buenas condiciones fisiológicas y durante un período de tiempo prolongado y 3) proporcionar un número adecuado de células al momento de la bacterización de las semillas. A partir de los recuentos bacterianos obtenidos, tanto en turba como en las semillas inoculadas con la cepa C119 podríamos afirmar que la formulación de turba cumple con los requisitos para ser un buen soporte a la hora de inocular semillas de alfalfa con la cepa C119. Los resultados obtenidos mostraron una densidad de bacterias concordante con la densidad reportada por otros autores que también utilizaron inoculantes a base de turba en semillas de alfalfa (Guiñazú et al., 2010). Como la inoculación en base de turba es una tecnología ampliamente utilizada en el sector agropecuario para inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas, este antecedente y el hecho de que el co-cultivo de ambos microorganismos

no afecta de ninguna manera el crecimiento ni la sobreviviencia de los mismos (Villacieros et al., 2003; De La Fuente et al., 2002) permitiría avanzar en las técnicas de inoculantes de segunda generación, utilizando los dos microorganismos en un solo inoculante (Villancieros, et al., 2003).

6.2.2 Capacidad biocontroladora y promotora del crecimiento vegetal de la cepa C119

Los patógenos oportunistas como *Phytium debaryanum* atacan a las plántulas en desarrollo, en condiciones ambientales de húmedad y bajas temperaturas (Altier et. al., 2000). Estas condiciones climáticas no se presentaron en los primeros días del ensayo, por lo que el efecto biocontrolador de la cepa C119 no fue evidenciado por la falta de condiciones para el desarrollo de la enfermedad. No existieron diferencias significativas entre el número de plantas emergidas para los dos tratamientos a los 21 días post siembra. El porcentaje de germinación fue bajo para los dos tratamientos (datos no mostrados). Es probable que este hecho se deba a la falta de agua y el bajo pH del suelo (pH=5) y no a la presencia de patógenos oportunistas. A los 121 días post siembra se observó que el número de plantas tratadas con la cepa C119 se mantuvo relativamente similar al de plantas emergidas los primeros días del ensayo, mientras que el número de plantas del tratamiento control disminuyó significativamente. Por otra parte, al evaluar la biomasa aérea de las plantas de ambos tratamientos se observó que las plantas inoculadas con C119 mostraron un incremento del 40% con respecto a las plantas del tratamiento control. La presencia de la cepa C119 en las raíces de alfalfa generó un efecto beneficioso hacia las plantas. Dadas las condiciones del ensayo este efecto pudo deberse a una disminución del estrés sufrido por las plantas dado por la falta de agua y al pH ácido del suelo, por lo que las plantas que lograron germinar en mejor estado fisiológico persistieron durante todo el ensayo. Además el mejor estado fisiológico pudo ayudar a que estas plantas resistieran de mejor manera posibles ataques de patógenos

que las plantas más debilitadas. La alfalfa está dentro de la categoría de leguminosas muy sensibles a la acidez. Como se mencionó anteriormente, el suelo del ensayo poseía pH 5, por debajo del ideal para cultivar alfalfa (que es de pH 6 – 6,5), lo cual es crítico para el cultivo (Rebuffo, Risso & Restaino, 2000). El pH bajo genera una reducción del rendimiento final de la alfalfa de aproximadamente 40% (Casanova & Cerveñansky 2004). Existen reportes de que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son capaces de proteger a las plantas hospederas frente a diferentes estreses ambientales como sequía, heladas, heridas, salinidad, metales tóxicos, entre otros (Grover et al., 2011). Por ejemplo, la co-inoculación de una cepa de *P. fluorescens* y *R. meliloti* en plantas de alfalfa sometidas a estrés salino severo, aumentó la biomasa vegetal y mejoró la nodulación que había sido completamente inhibida por la concentración de sodio en el suelo (Younesi et al., 2013). Varios estudios han reportado la capacidad de las *Pseudomonas sp.* de proteger a diferentes especies vegetales frente al stress hídrico. Por ejemplo, se observó que *Pseudomonas fluorescens* es capaz de aumentar la producción de biomasa vegetal y la producción de ajmalicina (alcaloide antihipertensivo) en condiciones de estrés hídrico en plantas de vinca de Madagascar (*Catheranthus roseus*) (Jaleel et al., 2007). Otro trabajo reportado por Arshad y colaboradores (2008) mostró que los efectos negativos del estrés hídrico sobre plantas de arveja pudieron ser revertidos mediante la inoculación de dos cepas de las especies *P. fluorescens* y *P. putida,* productoras de ACC desaminasa. Las plantas inoculadas presentaban mayor número de chauchas y mejor rendimiento de granos.

Dado los resultados obtenidos en esta tesis y reportes de trabajos anteriores (Yanes et al., 2012) podemos decir que la cepa C119 muestra claros efectos promotores del crecimiento vegetal en la alfalfa, aunque los mecanismos por los cuales ejerce estos efectos no son conocidos. Se observó que no hay diferencias significativas en el contenido de fósforo y nitrógeno entre las plantas inoculadas y las plantas del tratamiento control, por lo que se

descarta que el efecto promotor esté dado, en este ensayo, por la solubilización de fósforo inorgánico o mineralización del fósforo orgánico. También quedaría descartada la posibilidad de que se establezca un efecto sinérgico con el rizobio que permitiera una fijación de nitrógeno más eficiente.

La capacidad protectora de un microorganismo está en gran medida determinada por la forma de colonizar la raíz de su planta hospedero. La apropiación rápida y agresiva de los nichos presentes en la rizósfera por parte de las bacterias benéficas disminuyen la probabilidad de que los fitopatógenos oportunistas, de colonización temprana presentes en el suelo, los ocupen causando enfermedad en las plántulas en desarrollo (Compant et al., 2005; Babu et al., 2011).

Hay varias metodologías para monitorear las bacterias introducidas de manera artificial en ensayos de campo. Dentro de las más utilizadas esta la técnica de marcaje con antibióticos (Ahmad et al., 2010). La cepa C119 es naturalmente resistente al ácido nalidíxico y la ampicilina, por lo que se usaron estos antibióticos para monitorear su presencia en las raíces de alfalfa. La incidencia de bacterias del suelo resistentes a ácido nalidíxico es baja de acuerdo a varios reportes (Reisenfeld et al., 2004) por lo que podía ser utilizada como marcador para identificar la cepa en cuestión una vez liberada al ambiente. Además, luego de cosechar las raíces de alfalfa, se corroboró la presencia *Pseudomonas fluorescens* C119 en las plantas inoculadas mediante la ténica de BOX-PCR (Yanes, 2014, comunicación personal).

Las fallas en las estrategias de control biológico de patógenos del suelo muchas veces se correlacionan con una baja colonización radicular del agente antagonista. La cantidad mínima para que un agente de control biológico tenga efecto sobre un fitopatógeno está alrededor de las 10^5 UFC/g de raíz (Raaijmakers et al., 1995). La cepa *P. fluorescens* C119 permaneció en las raíces en poblaciones de 10^6-10^7 UFC/g de raíz durante todo el ensayo, por lo que podemos

afirmar que la cepa C119 es una buena colonizadora de la rizósfera de alfalfa. *Pythium spp.* se caracteriza por ser un patógeno oportunista que coloniza las raíces de sus planta/s blanco temprano en el desarrollo de las mismas, por lo cual es posible que la competencia por nicho pueda ser uno de los mecanismos por el cual *P. fluorescens* C119 protege a la alfalfa de infecciones por este tipo de fitopatógenos.

El seguimiento de la dinámica poblacional de las PGPRs introducidas en el ambiente es necesario para asegurar que las bacterias benéficas colonizan las raíces de la planta hospedera de manera efectiva y se dispersa lo menos posible hacia otras plantas que no son su blanco de acción principal, para evitar efectos indeseados (Ahmad et al., 2010). *P. fluorescens* C119 no solo fue capaz de colonizar la rizósfera de alfalfa y perdurar en ella sino que además no presentó una dispersión apreciable ya que no fue detectada en las plantas control.

6.3 Impacto de la inoculación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 en la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa

En el proceso de inoculación de cultivos con agentes biológicos se liberan al ambiente grandes densidades de microorganismos viables y altamente eficientes con la finalidad de que la rizósfera de la planta hospedero sea completamente colonizada. Esta acción puede generar una perturbación, al menos pasajera, en el equilibrio de la microflora residente del suelo. Este tipo de cambio en las comunidades microbianas puede traer consigo la pérdida de microorganismos nativos importantes, afectando luego el establecimiento de futuros cultivos. Sin embargo, una modificación en la comunidad bacteriana causada por la inoculación de microorganismos puede ser neutralizada por la resiliencia del ecosistema, que depende del nivel de diversidad de la comunidad residente y las interacciones entre la planta, el suelo y la microbiota. Además, la pérdida de ciertas especies de microorganismos no significa la pérdida de funciones en el ecosistema, debido a la existencia de la redundancia funcional microbiana,

lo que significa que algunas especies de microorganismos diferentes pueden llevar a cabo las mismas funciones (Trabelsi & Mhamdi 2013). Por lo tanto es importante controlar el posible efecto de la introducción de microorganismos sobre el ecosistema del suelo (Gao et al., 2012).

Para analizar el impacto de la inoculación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 sobre la comunidad microbiana residente de la rizósfera de alfalfa se eligió utilizar una técnica de estudio de comunidades microbianas que fuera independiente de cultivo, rápida, confiable y reproducible, como es el DGGE (Muyzer, et al., 1993, Kirk et al., 2004).

En el análisis por DGGE, se observa que para ambos tratamientos, la estructura de la comunidad microbiana de la rizósfera de alfalfa en el primer muestreo (21 días post siembra) y en el segundo (42 días post siembra) es muy diferente a la estructura encontrada en las etapas posteriores del desarrollo de la planta.

En los muestreos posteriores, no se observaron diferencias entre las comunidades microbianas de las plantas tratadas con C119 y las plantas control, ni tampoco diferencias entre los muestreos, es decir que la estructura de la comunidad bacteriana fue modificándose a lo largo del ensayo en igual medida para ambos tratamientos. Podemos decir que las diferencias entre las comunidades microbianas están más relacionadas con el desarrollo intrínseco de la raíz y con factores ambientales que con la introducción de bacterias exógenas.

Sin embargo la técnica de DGGE presenta ciertas limitaciones ya que está basada en la amplificación por PCR, que tiene como principal obstáculo la introducción de sesgos debidos a la amplificación de fragmentos de DNA de las especies dominantes en la muestra y por tanto, los organismos presentes en menor número pasan desapercibidos en el análisis. Otras limitaciones que pueden influenciar en los resultados son la técnica de extracción de DNA, los cebadores elegidos para amplificar, la temperatura de desnaturalización y la enzima Taq polimerasa elegida (Kirk et al., 2004).

El análisis realizado por DGGE se podría complementar, utilizando otro tipo de técnica molecular o bioquímica para analizar comunidades microbianas.

Existen muchos métodos para analizar las comunidades microbianas, cada uno de ellos tiene sus limitaciones y provee al investigador de conclusiones parciales sobre el comportamiento de las mismas. Por otra parte, hasta el momento no es posible evaluar la efectividad de cada método de estudio, por lo que es recomendable que a la hora de analizar comunidades microbianas se combinen diferentes métodos de análisis, de esta forma se obtendrá un conocimiento más amplio y completo de los cambios que ocurren en la estructura y funcionalidad de las mismas (Kirk et al., 2004).

7. Conclusiones y Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos decir que la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 fue capaz de promover el crecimiento de la alfalfa a pesar de que las condiciones ambientales no fueron las más apropiadas para el cultivo. Esta cepa podría tenerse en cuenta para formular un inoculante que promueva el crecimiento vegetal de la alfalfa. La formulación a base de turba parece ser una buena estrategia para introducir a la cepa C119 en la rizósfera de la alfalfa, ya que los recuentos en turba obtenidos fueron sostenidos en el tiempo. La densidad de bacterias adheridas a las semillas inoculadas le permitió a la cepa la colonización exitosa de la rizósfera y la persistencia en la misma durante todo el ensayo de campo. Se observó un aumento del 40% en la biomasa aérea en las plantas inoculadas con la cepa C119 al compararlas con las plantas del tratamiento control, inoculadas únicamente con el rizobio comercial. Por otra parte, en cuanto al impacto generado por la introducción de la cepa C119 en la estructura de la comunidad bacteriana de la raíz de alfalfa, habría que realizar otros ensayos para confirmar si el efecto generado es transitorio y no la estaría afectando a largo plazo. Por estudios de perfilado genómico solamente se encontró a la cepa C119 en la rizósfera de las plantas de alfalfa que habían sido inculadas con ella misma, por lo tanto esta cepa no se dispersaría hacía plantas que no son su blanco de acción (tratamiento control). El presente trabajo se enfocó en el estudio del efecto promotor de la cepa C119 durante la implantación de la alfalfa. Sin embargo, la alfalfa es una especie forrajera de gran persistencia, por lo que habría que analizar el efecto promotor de la cepa C119 durante un período de tiempo más largo y determinar la influencia que tiene sobre el rendimiento del cultivo y calidad del forraje con los diferentes cortes. También sería interesante analizar la persistencia de la cepa en las rizósfera de alfalfa a largo plazo.

8. Bibliografía

Ahmad, F., Husain, F.M. & Ahmad, I., 2011. Rhizosphere and root colonization by bacterial inoculants and their monitoring methods: a critical area in PGPR research. In I. Ahmad, F. Ahmad, & J. Pichtel, eds. *Microbes and Microbial Technology*. New York, NY: Springer New York, pp. 363–391.

Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C. 2006. Biological Control of Plant Diseases: The European Situation. *European Journal of Plant Pathology*. 114(3), pp.329-341.

Altier, N. 1996. Enfermedades de leguminosas forrajeras: diagnóstico, epidemiología y control. Montevideo, INIA. Serie Técnica, 74, pp.87-104.

Altier, N. 2000. Reconocimiento y manejo de enfermedades en alfalfa. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación, 69, pp.125-143.

Arcand, M. M., Schneider, K. D. 2006. Plant- And microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: A review. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias.* 78(4), pp.791-807.

Araújo, W.L. et al., 2002. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), pp.4906–4914.

Arshad, M., Shaharoona, B. & Mahmood, T., 2008. Inoculation with *Pseudomonas* spp. Containing ACC-Deaminase Partially Eliminates the Effects of Drought Stress on Growth, Yield, and Ripening of Pea (*Pisum sativum L.*). *Pedosphere*, 18(5), pp.611–620.

Babu, S., 2011. *Pseudomonas fluorescens*-mediated biocontrolin the post-genomic era: from lap to lab to land. *Biotechnology journal*. 6(5), pp.488–91.

Bagnasco, P. et al., 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11), pp.1317–1322.

Bakker, A.W. & B. Shippers. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, pp.451-457.

Bashan, Y., &G. Holguin. 1997. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (*plant growth-promoting bacteria*) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, pp.1225–1228

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., Hernandez, J-P.2013. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), pp.1-33.

Béguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo red-stained agar replicas. *Analytical biochemistry*, *131*(2), pp.333-336.

Bertani, G., Weigle, J. J. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *Journal of Bacterioogyl*, 65(2), pp.113-121.

Bing-Ru, L. I. U., Guo-Mei, J. I. A., Jian, C. H. E. N., & Gang, W. A. N. G. 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, *16*(1), pp.18-24.

Bloemberg, G., &Lugtenberg, B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, pp.343–350

Bowen, G. D., & Rovira, A. D. 1976. Microbial colonization of plant roots.*Annual review of phytopathology*, *14*(1), pp.121-144.

Brons, J.K. & van Elsas, J.D., 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), pp.2717–27.

Browne P., Rice O., Miller S. H., Burke, J., Dowling, D.N., Morrisey, J.P., O´Gara, F. 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*,43(1), pp.131-138.

Casanova, O. & Cerveñansky, A., 2004. Manejo de la fertilización fosfatada y azufre en la instalación y refertilización de alfalfa. In *XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*.

Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg y B. J. J. Lugtenberg. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, 157, pp.503–523

Compant S., Duffy B., Nowak J., Cle C., Barka E. 2005.MINIREVIEW: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), pp.4951-4959.

De La Fuente, L., Quagliotto, L., Bajsa, N., Fabiano, E., Altier, N., & Arias, A. 2002. Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*(4), pp.545-548.

De La Fuente L., Thomashow L., Weller D., Bajsa, N., Qualiotto, L., Chernin, L., Arias, A. 2004. *Pseudomonas Fluorescens* UP61 Isolated From Birdsfoot Trefoil Rhizosphere Produces Multiple Antibiotics and Exerts a Broad Spectrum of Biocontrol Activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110(7), pp.671-681.

Duffy, B. y G. Défago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied Environmental Microbiology,* 65, pp.2429-2438.

Duffy, B. K., & Défago, G. 2000. Controlling Instability in gacS-gacARegulatory Genes during Inoculant Production of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(8), pp.3142-3150.

Duffy, B., Keel, C., & Défago, G. 2004. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Applied and environmental microbiology*, *70*(3), pp.1836-1842.

Dwivedi D. & Johri, B. N. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science*, 85(12), pp.1693-1703.

Formoso, F. 2000. Manejo de la alfalfa para producción de forraje. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación 69, pp.53-74

Fischer S. E., Jofré E. C., Cordero P. V., Gutiérrez Mañero F. J., Mori G. B. 2010.Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of Genetic and Molecular Microbiology*, 97(3) pp.241-251.

Gao G., Yin D., Chen S., Xia F., Yang J., Quing, L., Wang, W. 2012. Effect of Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on Soil Fungal Community in Cucumber Rhizosphere Using T-RFLP and DGGE. *PLoS ONE*, 7(2) e31806.

Geels, F. P., & Schippers, B.1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift,* 108, pp.193-206.

Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in biotechnology*, *20*(8), pp.338-343.

Glick, B. R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letter,* 251(1) pp.1-7.

Gordon S. A. & Weber R. P. 1951. Colorimetric Estimation of Inodoleacetic Acid. *Plant Physiology*, 26(1), pp.192-195.

Grover M., Ali S. Z., Sandhya V., Rasul A., Venkateswarlu B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), pp.1231-1240.

Guiñazú L. B., Andrés J. A., Papa M. F. D., Pistorio M., Rosas S. B. 2010. Response of alfalfa (*Medicago sativa L.*) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils,* 46(2), pp.185-190.

Haas, D. & Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology,* 41(63), pp.117-153.

Haas D. & Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology,* 3(4), pp.307-319.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontolia Electronica 4.

Handelsman J., Raffael, S., Mester, E. H., Wunderlich, L., Grau C. R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbilogy,* 56 pp.713-718.

Hirsch P. R., Mauchline T. H., Clark I. M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*,42(6),pp.878-887.

Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., Clark, I. M. 2013. Approaches to Microbial Ecology in Soil and the Rhizosphere. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. Vol 1 & 2. 1st ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, pp.45-55.

Höfte, M. & Altier, N. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 161(6), pp.464-471.

Hultberg, M., Alsanius, B., Sundin, P. 2000. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the suppression of damping-off in tomato seedlings. *Biological Control*, *19*(1), pp.1-8.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. 2007.*Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2007; 60, pp.7-11.

Jorquera, M., Martínez, O., Maruyama, F., Marschner, P., de la Luz Mora, M.2008.Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. *Microbes Environments,*23(3), pp.182-191.

Khan, M. S., A Zaidi, A. P. Wani. 2006. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agronomic Sustainable Development* 26, pp.1-15.

Kirk, J. L., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T. 2004. Methods of Studying Soil Microbial Diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), pp.169-188..

King, E.O., M.K. Ward y D.E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine,* 44 (2), pp.301-307.

Kloepper, J. W. &Schroth, M. N. 1978. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Radish. En: *Proceedings* of the*4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Gibert-Clarey, Tours, France. pp. 879-882.

Kumar, A., Prakash, A., Johri, B. N. 2011.*Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystems. In: Maheshwari, D. K., ed. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*. 1st ed. Heidelberg, Germany: Springer - Verlag Berlin Heidelberg; pp.1-431.

Kuske, C. R., Ticknor, L. O., Miller, M. E., Dunbar, M., Davis, J. A., Barns, S. M., Dunbar, J. M., Belnap, J. 2002. Comparison of Soil Bacterial Communities in Rhizospheres of Three Plant Species and the Interspaces in an Arid Grassland. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp.1854-1863.

Lamb, J. F. S., Sheaffer, C. C., Rhodes, L. H., Sulc, R. M., Undersander, D. J., Brummer, E. C. 2006. Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence, and nutritive value. *Crop Science*. 46(2), pp.902-909.

Li, X. & Brummer E. C. 2012. Applied Genetics and Genomics in Alfalfa Breeding. *Agronomy*, 2(1), pp.40-61.

Lim B. L., Yeung P., Cheng C., Hill J. E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME Journal*, 1(4), pp.321-330.

Lugtenberg B. J. J., Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms.*Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), pp.373-383.

Lugtenberg B. & Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, pp. 541-556.
Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R., Taghavi, S., Mezgeay, M., & Van der Lelie, D. 2002. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Science*. 21(6), pp. 583-606.

Malik D. K., Sindhu S. S. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: Effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(1), pp.25-32.

McSpadden Gardener B. B.& Fravel, D. R. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Health Progress*. Online, pp.1-18.

Mavrodi D. V., Mavrodi O. V., Parejko J. A., Weller D. M., Thomashow L. S. 2011. The Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol- and Phenazine-1-Carboxilic Acid-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Protection of Wheat from Soilborne Pathogens. In: Maheshwari DK, ed. *Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management*. 1st ed. Heidelberg, Germany: Springer - Verlag Berlin Heidelberg; 2011:267-283.

Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E, Van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., Raaijmakers, J. M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*. 332(6033), pp.1097-1100.

Meyer, J. M. & Abdallah M. A. 1978. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology*, 107(2), pp.319-328.

Morón A. 2000. Fertilidad de suelos y estado nutricional. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación 69, pp.37-51.

Mullaney EJ&, Ullah AHJ. The term phytase comprises several different classes of enzymes. 2003. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(1):179-184.

Muyzer, G.; de Waal, E. C.; Uitterlinden A. G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3), pp. 695-700.

Nautiyal, C. S. 1999. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170 (1), pp.265-270.

Nowak-Thompson B., Gould S. J., Kraus J, Loper J. E. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Canadian Journal of Microbiology*. 40 (12), pp.1064-1066.

O'Sullivan D. J & O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*. 56 (4), pp.662-676.

Patten C. L., Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (8), pp.3795-3801.

Peixoto, R. S., da Costa, C. H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A., Rosado, A. S. 2002.Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 35(4), pp.316-320.

Pierson, E.A. & Weller, D. M. 1994. Use of mixtures of flourescent pseudomonads to supress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology,* 84 (9) pp.940-947.

Quagliotto L. 2006.*Pseudomonas fluorescens* UP148: agente de control biológico adecuado para la formulación de un inoculante en leguminosas forrajeras.Tesis de Maestría.

Quagliotto, L., Azziz, G., Bajsa, N., Vaz, P., Pérez, C., Ducamp, F., Cadenazzi, M., Altier, N., Arias, A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control*, 51(1):42-50.

Raaijmakers, J. M., Leeman, M., van Oorschot, M. M. P., van der Sluis, I., Schippers, B., Bakker, P. A. H. M. 1995. Dose-Response Relationships in Biological Control of *Fusarium* Wilt of Radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85, pp.1075-1081.

Raaijmakers J. M., de Bruijn I., de Kock M. J. D. 2006. Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (7), pp.699-710.

Ramírez Cuartas, C. A. 2010. Exploring the Relation between Plant Phosphorus Nutrition and Growth Promotion by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* Strains. Tesis de Doctorado.

Rebuffo, M., Risso, F. & Ristaino, E. 2000.Tecnología en alfalfa. Boletín de divulgación INIA 69: 29-36

Ristaino, J. B. & Thomas, W. 1997. Agriculture, Methyl Bromide, and the Ozone Hole: Can We Fill the Gaps? *Plant Disease*,81(9), pp.964-977.

Sachdev, D. P. & Cameotra, S. S. 2013. Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), pp.1005-1016.

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., Bestervelt, L. L. 2012. Microbial Siderophores: a Mini Review. *Journal of Basic Microbiology*, 53 (4), pp.303-317.

Schulze, J. &Drevon J-J. 2005. P-deficiency increases the O2 uptake per N2 reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), pp.1779-1784.

Setten, L., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Fox, A. R., Lisi, C., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Pagano, E., Díaz-Paleo, A., Ayub, N. D. 2013. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions. *PLoS One*, 8(5) pp.1-14.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G. 2001. Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), pp.4742-4751.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp.425-448.

Spizizen, J. 1958. Transformation of Biochemically Deficient Strains of Bacillus Subtilis By Deoxyribonucleate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 44 (10), pp.1072-1078.

Teale, W. D., Paponov I. A., Palme K. 2006.Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), pp.847-859.

Trabelsi, D. & Mhamdi, R. 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Research International*. 2013, pp.1-11.

Troxler, J., Svercel, M., Natsch, A., Zala, M., Keel, C., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. 2012. Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles. *Soil Biology and Biochemestry*, 44(1), pp.122-129.
Turner, B. L., Papházy, M. J., Haygarth, P. M, McKelvie, I. D. Inositol phosphates in the environment. 2002. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1420), pp.449-469.

Vessey, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. 2003.*Plant and Soil*, 255, pp.571-586.

Villacieros, M., Power, B., Lloret, J., Roke, I., Fern, F., Bonilla, I., Whelan, C., Mart, M., Dowling, D. N.,Rivilla, R. 2003.Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant and Soil*, 251, pp. 47-54.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Dèfago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8(2), pp.351-358.

Walsh, U. F., Morrissey, J. P., O'Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology,* 12(3), pp.289-295.

Wang, C., Knill. E., Glick, B. R., Défago, G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(10), pp.898-907.

Weller, D. M., Mavrodi, D. V., Van Pelt, J. A., Pieterse, C. M. J., Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. 2012. Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* Against *Pseudomonas syringae*pv. tomato by 2, 4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens*. *Biological Control*, 102 (4), pp.403-412.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(Special Issue), pp.487-511.

Xiao, K., Kinkel, L. L., Samac, D. A. 2002. Biological Control of *Phytophthora* Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*, 23 (3), pp.285-295.

Yanes, M. L. 2007. Caracterización de una colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas como promotoras del crecimiento de la alfalfa. Tesis de Maestría.

Yanes, M. L., De La Fuente, L., Altier, N., Arias, A. 2012.Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. *Biological Control,* 63(3), pp.287-295.

Younesi, O., Baghbani, A., Namdari, A. 2013.The effects of *Pseudomonas fluorescence* and *Rhizobium meliloti* co-inoculation on nodulation and mineral nutrient contents in alfalfa (*Medicago sativa*) under salinity stress. *International Journal of Agriculture and Crop Science*, 5(14), pp.1500-1507.

Apéndice I

Abreviaturas

%GC	Porcentaje de contenido GC
ACC	Acido 1-carboxi-1-aminociclopropano (del inglés: 1-aminocyclopropane-1carboxilic acid)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido Indol-3-acético
Amp	Ampicilina
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés: Analysis Of Variance)
ARISA	Análisis automatizado del espacio intergénico ribosomal (del inglés: Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (del inglés: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)
ARN	Ácido Ribonucleíco
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
Chex	Cicloheximida
CLPs	Lipopétidos cíclicos (Cyclic Lipopeptides)
CMC	Carboximetilcelulosa
c. s. p.	Cantidad suficiente para
DAPG	2, 4 – Diacetifluoroglucinol
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (del inglés: Denaturing Gradient Gel Electrphoresis)
FAME	Análisis de ácidos grasos de metil-estéres (del inglés: Fatty Acids Methil Esther Analysis)
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FISH	Hibridación fluorescente in-situ (del inglés: Fluorescent in-situ hybriditation)
G	Guanina
G	Gramos
HCN	Ácido cianhídrico (del inglés: Hydrogen cyanide)
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
ISR	Resistencia Sistémica Inducida (del inglés: Induced Systemic Resistance)
KB	Medio King´s B
LB	Medio Luria Broth
LSD	Mínima diferencia significativa (del inglés: Least Significative Difference)
m-ARN	ARN mensajero

Nal	Ácido Nalidixico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)
PDA	Agar papa-dextrosa (del inglés: Potato Dextrose Agar)
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés: Plant Growth Promoting Bacteria)
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (del inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
Phz	Fenazinas
Plt	Pioluteorina
Prn	Pirrolnitrina
r-ARN	ARN ribosomal
RISA	Análisis del espaciador intergénico ribosomal (del inglés: *ribosomal intergenic spacer analysis)*
RFLP	Análisis del polimorfismo de restricción en el largo del fragmento (del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism)
rpm	Revoluciones por minuto
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida (del inglés: Adquired Systemic Resistance)
SMM	Medio mínimo de Spizizen (Spizizen´s Minimum Media)
sp.	Especie
spp.	Especies
SSCP	Polimorfismo confirmacional de la monohebra (del inglés: *single strand conformation polymorphism*)
TAE	Solución de amortiguadora de Tris Acetato EDTA
Taq	Polimerasa de Thermus aquaticus
TGGE	Electrforesis en gel con gradiente de temperatura (del inglés: Temperature Gradient Gel Electrphoresis)
T-RFLP	Análisis de restricción en el largo del fragmento terminal (del inglés: Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism)
U.V	Luz ultravioleta

Apéndice II

Medios de Cultivo

Medio para detectar Fitasas (Ramirez, 2010)

Fitato de Sodio (100 mM)	20 ml
L – Triptófano (5 mg/ml)	10 ml
D – Glucosa (50 v/v)	10 ml
(NH4)2SO4	2 g
Na3C6H5O7.2H2O	1 g
MgSO4.7H2O	0,2 g
CaCl2.2H2O	0,294 g
KCl	15 g
Agar	15 g
KCl	15 g
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	

Medio GE (Quagliotto, 2007)

Extracto de Levadura	11 g
K2HPO4	1,5 g
KH2PO4	1,5 g
Glicerol (50 v/v)	15 ml
MgSO4.7H2O (1M)	10 ml
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	

Medio King´s B (King, et al., 1954)

Proteasa Peptona Nº 3	10 g
K2HPO4	1,5 g
MgSO4	1,5 g

Glicerol (50 v/v)	20 ml
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	

Medio Luria Broth (Bertani et al., 1953)

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	

Medio N-Brip (Nautiyal, 1999)

D – Glucosa	10 g
Ca3(PO4)2	5 g
MgCl2	2,34 g
KCl	0,2 g
(NH4)2SO4	0,1 g
MgCl2.7H2O (15%)	1,670 ml
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	

Medio Potato Dextrose Agar (PDA, Difco®)

Infusión de Papa	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua c. s. p. 1 L	