

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA FIJADORA DE
NITRÓGENO EN DOS BIOTIPOS DE PASTO MIEL

por

José Ignacio AGUERRE ZÚÑIGA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2012

Tesis aprobada por:

Director: -----

Lic. Andrea Rodriguez Blanco

Ing. Agr. Pablo Speranza Gastaldi

Ing. Agr. Pilar Irisarri

Fecha: 12 de agosto de 2012

Autor: -----

José Ignacio Aguerre Zúñiga

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por tener esta oportunidad en mi vida y lograr terminar esta etapa para dar comienzo a la siguiente.

También quiero agradecer a todas aquellas personas que estuvieron junto a mí, brindando todo su apoyo para que pudiera terminar este trabajo, especialmente a mi señora por su amor y ayuda aún en los momentos más difíciles. Por su amor y atención mi agradecimiento a todos ellos.

Al equipo del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía por todo su apoyo brindado.

A mis tutores de tesis por tener la paciencia suficiente para escucharme cuando lo necesité y ayudarme a terminar este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 EL NITRÓGENO.....	3
2.1.1 <u>El Nitrógeno para las plantas</u>	3
2.2 EL CICLO DEL N.....	3
2.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N (FBN).....	5
2.3.1 <u>La nitrogenasa</u>	5
2.3.2 <u>Los microorganismos diazotróficos</u>	8
2.3.3 <u>Factores que afectan la FBN</u>	9
2.3.4 <u>Métodos para estudiar la FBN</u>	10
2.4 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N ASOCIADA A GRAMÍNEAS... 2.4.1 <u>El N en los pastizales nativos Uruguayos</u>	12 14
2.5 PASPALUM DILATATUM.....	14
3 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
3.1 MUESTREO.....	16
3.2 RECuento DE DIAZOTROFOS.....	17
3.3 AISLAMIENTO DE DIAZOTROFOS.....	18
3.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	18
3.5 OBTENCIÓN DE ADN.....	19
3.6 AMPLIACIÓN DEL GEN <i>nifH</i>	19
3.7 AMPLIFICACIÓN DEL 16s rDNA.....	20
3.8 POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	20 20
3.9 SECUENCIACIÓN DEL 16S rDNA.....	21
3.10 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS.....	21
4 <u>RESULTADOS</u>	22
4.1 RECuento DE DIAZOTROFOS.....	22

4.2	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DIAZOTROFOS.....	24
4.3	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>nifH</i>	29
4.4	AMPLIFICACIÓN DEL 16S rDNA.....	31
4.5	RESTRICCIONES DEL 16s rDNA.....	31
4.6	SECUENCIACIÓN DEL 16S rDNA.....	34
5	<u>DISCUSIÓN</u>	41
5.1	RECuento DE DIAZOTROFOS.....	41
5.2	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA...	44
5.3	AMPLIFICACIÓN DEL GEN NIFH.....	46
5.4	IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS.....	46
6	<u>CONCLUSIONES</u>	50
7	<u>RESUMEN</u>	51
8	<u>SUMMARY</u>	53
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	54
10.	<u>ANEXOS</u>	65

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Densidad de diazotrofos en suelo rizosférico y endófitos de raíz de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i> y <i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>Flavescens</i>	22
2. Probabilidad de los análisis de varianza (p) entre poblaciones de diazotrofos de suelo rizosférico y endófitos de raíz mediante número más probable en medios semisólidos sin N combinado.....	23
3. Probabilidad de los análisis de varianza (p) entre poblaciones de diazotrofos de suelo rizosférico mediante recuentos de viables en placa en medios sólidos sin N combinado.....	23
4. Porcentaje de gránulos de suelo rizosférico de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> que desarrollaron crecimiento bacteriano en su entorno.....	24
5. Número de aislamientos de diazotrofos obtenidos de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i> y <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> en distintos medios de cultivo.....	25
6. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico, raíz y rizoma de ambas subespecies de <i>P. dilatatum</i> según la morfologías en medio TY.....	26
7. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico de ambas subespecies de <i>P. dilatatum</i> según la morfología de las colonias en medio LG.....	28
8. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico de ambas subespecies de <i>P. dilatatum</i> según la morfología de las colonias en medios Ashby manitol y sacarosa.....	29
9. Aislamientos identificados como nifH positivos.....	30

10. Perfiles de restricción del gen 16S rDNA de aislamientos obtenidos de plantas de <i>Paspalum dilatatum</i> subespecie <i>dilatatum</i> y subespecie <i>flavescens</i>	32
11. Distribución de perfiles de restricción del 16S rDNA entre aislamientos provenientes de distintas zonas de las plantas de <i>P. dilatatum</i>	34
12. Identificación de los diazotrofos mediante secuenciación del 16S rDNA	35
13. Especies identificadas en diazotrofos aislados de suelo, raíz y rizoma de <i>P. dilatatum</i>	37
14. Resumen de los resultados de identificación	38

Figura No.

1. El ciclo del N	5
2. Ubicación de las zonas de muestreo en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía.....	16
3. Crecimiento bacteriano entorno a gránulos de suelo rizosférico en tres medios sin N combinado, Ashby. Sacarosa (A), A. manitol (B) y LG (C).....	24
4. Crecimiento y morfologías de diazotrofos aislados de suelo rizosférico en medio TY.....	26
5. Crecimiento y morfología de diazotrofos aislados de suelo rizosférico en medio LG. En la foto se identifica un aislamiento que acidifican el medio (abajo).....	27
6. Crecimiento y morfología de diazotrofos aislados de suelo rizosférico en medios A. sacarosa y A. manitol.....	28

7. Productos de la amplificación del gen nifH en gel de agarosa 1%....	30
8. Productos de la amplificación del gen 16S rDNA en gel de agarosa 1%.	31
9. Restricción del 16S rDNA en gel de agarosa 3%.....	32

1 INTRODUCCIÓN

El nitrógeno constituye unos de los elementos más importantes para el desarrollo vegetal. Frecuentemente se presenta como limitante del crecimiento vegetal ya que es removido en cantidades superiores a los demás nutrientes y además su nivel en suelo es generalmente bajo (Frioni, 2006). La mayor parte del N del suelo se encuentra en forma orgánica (98%), el cual no es asimilable por las plantas. La conversión del N orgánico en NH_4^+ , es un proceso conocido como amonificación. Este NH_4^+ puede ser absorbido por las plantas (asimilación), o en suelos y aguas ser oxidado a NO_2^- y este a NO_3^- por diferentes microorganismos. El NO_3^- constituye la principal fuente de N combinado que las plantas absorben del suelo. El N_2 atmosférico no puede ser utilizado como tal por las plantas ni animales para producir moléculas organonitrogenadas. Sólo un grupo minoritario de procariotas, conocidos como diazotrofos o fijadores de N_2 , pueden reducir el N_2 a NH_4^+ mediante el proceso conocido como fijación biológica de N (FBN) (Monza y Márquez, 2004).

La FBN es una propiedad exclusiva de ciertos procariotas. Hasta el momento ningún organismo eucariota es capaz de fijar N. El proceso de FBN consiste en la reducción de N_2 a amonio, y el amonio es convertido a formas orgánicas, por el complejo de enzimas GS/GOGAT. La reacción de fijación de N es altamente demandante de energía, con un costo de 16 ATP por cada molécula de N_2 reducida. Entre los microorganismos involucrados en la FBN se encuentran: bacterias, cianobacterias, actinomicetes y archeobacterias, los cuales pueden fijar N en vida libre o formando asociaciones con organismos pertenecientes al Dominio Eucaria. El caso más conocido de asociación simbiótica es la relación *Rhizobium* y leguminosas. Sin embargo la FBN no es un proceso exclusivo de las leguminosas. Existen diversos estudios que detectan FBN en varias gramíneas y determinan las especies de diazotrofos que se encuentran asociadas a ellas. Day et al. (1975) determinaron la actividad de la nitrogenasa (medida en nmol de C_2H_4 g^{-1} de las raíces secas h^{-1}) en distintas gramíneas tropicales. Los valores más elevados para cada especie fueron: 754 para *Pennisetum purpureum*, 750 para *Brachiaria mutica*, 341 para *Digitaria decumbens*, 299 para *Panicum maximum*, 283 para *Paspalum notatum*, 269 para *Cynodon dactylon*, 41 para *Melinis minutiflora* and 29 para *Hyparrhenia rufa*. En *Paspalum notatum* Boddey et al. (1983) observaron que el cv. Batatais presentaba entre un 8 y 25% del N de la planta originado por FBN. Asimismo evidenciaron diferencias entre cultivares con diferentes niveles de ploidía dado que el cv. Batatais (tetraploide) presentó una mayor proporción de N con origen en la fijación biológica que el cv. Pensacola (diploide) y que *Paspalum maritimum*.

En el caso de *P. dilatatum*, no existe información confirmada y dados los esfuerzos que se han realizado en la región para utilizar este recurso fitogenético, resulta particularmente relevante conocer las posibles asociaciones de esta especie con fijadores de nitrógeno. Esto podría implicar un importante redimensionamiento de la utilización

de este recurso fitogenético. *Paspalum dilatatum* incluye varios biotipos de diferentes niveles de ploidía, sistemas reproductivos y adaptaciones ecológicas (Speranza, 2009), varios de los cuales se están utilizando en los programas de domesticación regionales. En base a los antecedentes disponibles para otras especies del género, se plantea el estudio de las asociaciones con microorganismos fijadores de nitrógeno rizosféricos y endófitos de los dos biotipos de *Paspalum dilatatum* presentes en el sur del Uruguay: el biotipo sexual *P. dilatatum* ssp. *flavescens* y el biotipo apomíctico común *P. dilatatum* ssp. *dilatatum*.

1.1 OBJETIVOS GENERALES

- Comprobar la existencia de diazotrofos en dos biotipos de *Paspalum dilatatum* y caracterizarlos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el número de bacterias diazotrofas rizosféricas y endófitas en los biotipos *P. dilatatum* ssp. *flavescens* y *P. dilatatum* ssp. *dilatatum*.
- Aislar bacterias fijadoras de N₂ rizosféricas y endófitas de ambos biotipos.
- Caracterizar e identificar las bacterias diazotrofas asociadas a los biotipos en estudio.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL NITRÓGENO

2.1.1 El nitrógeno para las plantas

El nitrógeno (N), después del agua, es el nutriente más importante para el desarrollo de las plantas debido a su importancia en la formación de las principales biomoléculas de los organismos vivos; si a esto añadimos que los suelos suelen ser más deficientes en N disponible que en cualquier otro elemento, no resulta extraño que sea el N, junto con el fósforo y el potasio, el elemento clave en la nutrición mineral de las plantas. Las plantas requieren N como componente importante de las proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y otras moléculas orgánicas importantes. Se distribuye en la planta en tres grupos: el primero que significa más del 50% se halla en compuestos de elevado peso molecular como las proteínas y los ácidos nucleicos; el segundo en formas de N orgánico soluble, esto es aminoácidos, amidas, aminas; y el tercero es el N inorgánico, siendo la mayoría del mismo los iones nitrato y amonio. El contenido total de N con respecto al peso seco de la planta oscila entre el 1,5 y el 5% (Campbell et al. 2005, Azcón-Bieto y Talón 2008, Bhattacharjee et al. 2008)

El nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son las formas iónicas preferentes de absorción de N por las plantas, son tomados a través de transportadores específicos localizados en la membrana de células epidérmicas de la raíz; también a través de amoníaco (gas), que se introduce en la planta a través de los estomas. Indirectamente las plantas también pueden tomar el N_2 atmosférico mediante la fijación biológica de N, en asociación con bacterias diazotróficas. Los procesos de ingreso del amoníaco (gas) a través de los estomas y la fijación biológica de N_2 terminan convirtiéndose en amonio una vez dentro de la planta (Monza y Márquez 2004, Azcón-Bieto y Talón 2008)

2.2 EL CICLO DEL N

El N es un nutriente limitante en la mayoría de los ambientes, siendo el dinitrógeno (N_2) que representa un 79% de la atmósfera, la mayor reserva de N en la biosfera y por ende para los suelos. A nivel global la mayor reserva de N la constituyen las rocas primarias (98% de todo el N), le sigue la atmósfera, luego las rocas sedimentarias, los sedimentos marinos y el reservorio más pequeño lo constituye el suelo de la litósfera y de las rocas sedimentarias. El N_2 no puede ser asimilado directamente por las plantas, pero puede estar disponible a través de la fijación biológica de N (FBN), proceso que solo ciertas células procariotas como algunas eubacterias, cianobacterias, arqueobacterias y actinomicetes pueden llevar a cabo (Frioni 2005, Dalton y Kramer 2006, Franche et al. 2008).

La mayor parte del N del suelo se encuentra en forma orgánica (98%), en los

restos de animales, vegetales y microorganismos, formando parte, entre otras moléculas, de aminoácidos, fosfolípidos, coenzimas y ácidos nucleicos. El N orgánico no es asimilable por las plantas. Es entonces que toma importancia el proceso microbiano de mineralización del N en el suelo, dado que es un proceso variable y dependiente de las condiciones ambientales es muy difícil determinar el potencial nutritivo del N en el suelo, más aun teniendo en cuenta los procesos de pérdida de N como la desnitrificación y lixiviación. La transferencia de N inorgánico desde el medio a la biomasa, y desde esta nuevamente a formas de N inorgánico, conforma lo que se conoce como el ciclo del N, que vincula sus diferentes reservorios y estados de oxidación (Monza y Márquez 2004, Azcón-Bieto y Talón 2008).

El ciclo del N se puede resumir según Monza y Márquez (2004) en los siguientes puntos.

- La conversión del N orgánico en NH_4^+ , proceso conocido como amonificación, ocurre por la actividad de diferentes bacterias y hongos que actúan a distintas temperaturas y pH. En un sentido amplio, este proceso forma parte de la mineralización, que corresponde al paso de diferentes moléculas orgánicas a formas inorgánicas.
- El NH_4^+ puede ser absorbido por las plantas (asimilación), o en suelos y aguas ser oxidado a NO_2^- y este a NO_3^- por diferentes microorganismos, proceso conocido como nitrificación. El NO_3^- constituye la principal fuente de N combinado que las plantas absorben del suelo. A su vez, en condiciones limitantes de O_2 , microorganismos pueden reducir NO_3^- empleándolo como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Este proceso conocido como desnitrificación, es responsable de la salida de N de los ecosistemas como N_2 , u otras formas gaseosas como el óxido nítrico (NO) o el óxido nitroso (N_2O).
- El N_2 no puede ser utilizado como tal por las plantas ni animales para producir moléculas organonitrogenadas. Sólo un grupo minoritario de procariontes, conocidos como diazotrofos o fijadores de N_2 , pueden reducir el N_2 a NH_4^+ mediante el proceso conocido como fijación biológica de N (FBN).

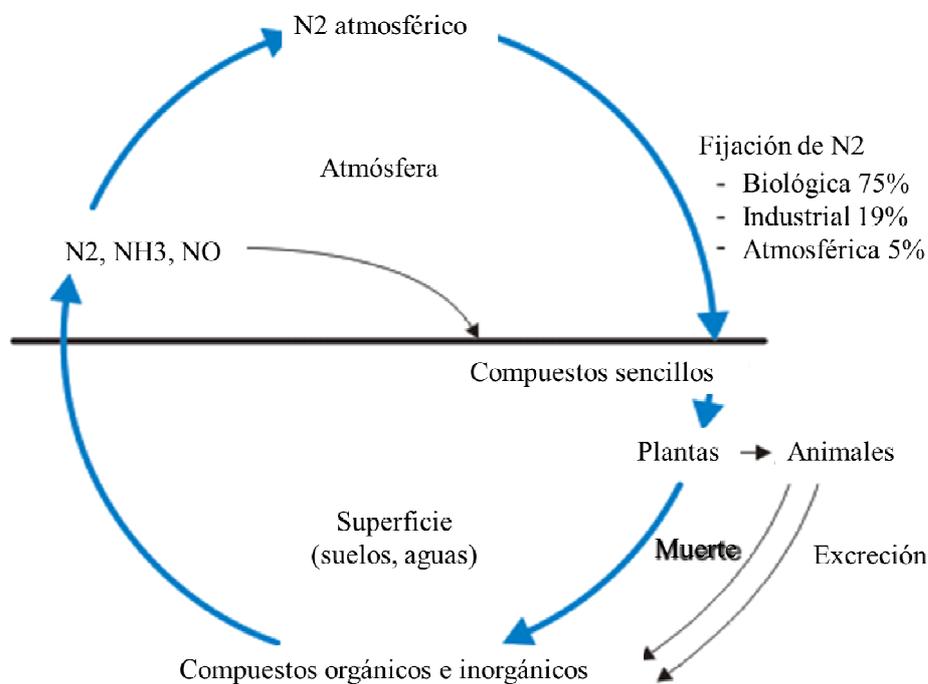
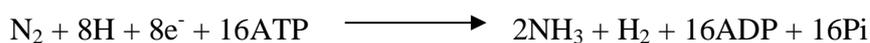


Figura No. 1. El ciclo del N

2.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N (FBN)

La utilización del gas N (N₂) como fuente de N es llamada fijación biológica del N y es una propiedad exclusiva de ciertos procariontes. Hasta el momento ningún organismo eucariota es capaz de fijar N₂. Estos microorganismos pueden ser tanto aerobios como anaerobios y se encuentran en ambientes muy diversos como el suelo, océanos, sedimentos marinos y en asociación con los vegetales (Karl et al., 1997). El proceso FBN consiste en la reducción de N₂ a amonio, y el amonio es convertido a formas orgánicas, por el complejo de enzimas GS/GOGAT. La reacción de fijación de N₂ es altamente demandante de energía, con un costo de 16 ATP por cada molécula de N₂ reducida. Si a esta cantidad de ATP le sumamos el costo de energía para aumentar lo suficiente el potencial redox de la nitrogenasa el costo total se encuentra en torno a los 25 moles de ATP por molécula de N₂ fijada (Dalton y Kramer 2006, Bhattacharjee et al. 2008).



2.3.1 La nitrogenasa

El proceso de reducción es catalizado por el complejo enzima nitrogenasa, que consiste en dos proteínas separadas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. Ambas poseen hierro, además la dinitrogenasa contiene molibdeno. El hierro y

molibdeno en la dinitrogenasa son contenidos en el cofactor conocido como Fe-Mo-co, donde ocurre la reducción del N₂ (Madigan et al. 2000, Mayz-Figueroa 2004). De manera general, las nitrogenasas están formadas por dos componentes: Componente I o proteína Fe-M, donde el metal (M) puede ser molibdeno, vanadio o hierro y componente II o proteína sólo hierro. El componente I es un tetrámero a₂b₂ constituido por 30 átomos de hierro y dos del metal correspondiente, distribuidos en dos tipos de cúmulos: los empaques cúbicos o tipo ‘‘P’’ (8Fe, 7S²⁻) y el cofactor Fe-M. La proteína sólo hierro es sensible al oxígeno, contiene únicamente cúmulos tipo 4Fe4S, así como dos sitios de enlace MgATP (Chan y Jongsun, 1993). Para formar la enzima nitrogenasa activa se requiere una molécula del componente I o proteína Fe-M, y dos moléculas del componente II o proteína sólo hierro (Ruiz et al., 2008).

Algunas bacterias fijadoras de N pueden presentar nitrogenasa sin molibdeno en ciertas condiciones de crecimiento. *Azotobacter vinelandii*, una bacteria aeróbica del suelo, fue el diazotrofo que demostró tener tres tipos de nitrogenasas: la clásica nitrogenasa conteniendo molibdeno, la nitrogenasa que contiene vanadio y la nitrogenasa con hierro. Estas son las denominadas nitrogenasas alternativas, que contienen vanadio y hierro o solo hierro en lugar del molibdeno (Maynard et al. 1994, Madigan et al. 2000).

La FBN es altamente reductiva en la naturaleza, y el proceso es inhibido por el oxígeno debido a que tanto la dinitrogenasa pero especialmente la dinitrogenasa reductasa, son rápidamente e irreversiblemente inactivadas por el O₂. Por lo cual aunque en las bacterias aeróbicas la FBN ocurre en presencia del O₂, la nitrogenasa es protegida de la inactivación del O₂ mediante varios mecanismos. En *Azotobacter* la nitrogenasa es protegida de la inactivación del oxígeno por aumento de la tasa respiratoria, que le permite mantener niveles bajos de O₂ en el citoplasma. Además esta bacteria presenta dos tipos adicionales de protección frente al O₂: la producción de capas de polisacárido extracelular que dificulta la entrada del O₂ a la célula, y un mecanismo de protección conformacional; este mecanismo consiste en la unión de una proteína específica a la nitrogenasa en presencia de concentraciones altas de oxígeno, como resultado la enzima es protegida por inactivación reversible (Madigan et al. 2000, Monza y Márquez 2004).

Frioni (2006) menciona los métodos para proteger la nitrogenasa frente al O₂ observados en diversos diazotrofos. Se pueden detallar de la siguiente manera:

- Polímeros extracelulares: Cápsulas y capas mucosas limitan el flujo de oxígeno a la célula.
- Microarofilia: diazotrofos aerobios migran hacia regiones de baja presión de O₂ donde pueden expresar la nitrogenasa.
- Protección respiratoria: una intensificación del proceso respiratorio

permite la reducción del O₂ a concentraciones inocuas para la enzima.

- Protección conformacional: *Azotobacter* posee este mecanismo relacionado a modificaciones bioquímicas de la enzima (se combina equimolecularmente con una tercera SFe-proteína en presencia de iones Mg).
- Inhibición reversible: un mecanismo alternativo propuesto para *Klebsiella* y *Rhodopseudomonas* está relacionado en la competencia entre dos sistemas enzimáticos, nitrogenasa y cadena respiratoria por una reserva común de poder reductor.
- Separación espacial de la nitrogenasa: en células especializadas como los heterocistos en cianobacterias o las vesículas de *Frankia*, la separación de la actividad nitrogenasa puede ser temporal o espacial. En cianobacterias sin heterocistos los procesos son secuenciales: durante el día se produce la fotólisis del agua y se genera ATP y en períodos oscuros se activa la nitrogenasa y la respiración mantiene el nivel de O₂ adecuado. Por lo tanto la fijación en especies que desarrollan heterocistos se puede realizar en presencia de O₂.
- Barreras a la difusión: los nódulos de leguminosas y actinorrizas ofrecen varios mecanismos de protección, pero la barrera mecánica de las células de la corteza del nódulo limita la entrada de oxígeno a la zona bacteriana. Sistemas membranosos internos de muchos diazotrofos, del tipo de los mesosomas, limitan la llegada del oxígeno a la enzima.

Döbereiner et al. (1972) encontró que la presión parcial de oxígeno afectó la FBN en *Paspalum notatum*. Ni las condiciones de aerobiosis total ni anaerobiosis total produjeron el máximo, sino que dicho punto se encontró a una presión de 0.04 atm de O₂. La anaerobiosis completa aportó una muy baja reducción de acetileno, sugiriendo que los anaerobios facultativos u obligados son de poca importancia en el total de fijación biológica de N₂.

Los genes involucrados colectivamente en la síntesis de la nitrogenasa y en el proceso catalítico de la FBN son denominados genes *nif*. Los genes accesorios son denominados *fix* y son también necesarios para el funcionamiento y regulación de la nitrogenasa en las bacterias aeróbicas y microaerofílicas. La expresión de los genes *nif* está regulada negativamente por la disponibilidad de NO₃⁻, NH₄⁺ o aminoácidos en el ambiente (Bottomley y Mylord, 2007). A su vez muchas de las proteínas relacionadas con los genes *nif* son desnaturalizadas por el O₂. El gen *nifH* codifica particularmente para una subunidad de la enzima nitrogenasa reductasa que une dos moléculas de

MgATP y reduce la nitrogenasa por una única transferencia de electrón.

2.3.2 Los microorganismos diazotróficos

Entre los microorganismos involucrados en la FBN se encuentran: bacterias, cianobacterias, actinomicetes y archeobacterias, los cuales pueden fijar N₂ en vida libre o formando asociaciones con organismos pertenecientes al Dominio Eucaria. Las bacterias fijadoras de N₂ son un componente importante del suelo y requieren una fuente de energía química si no son fotosintéticas. Las bacterias aeróbicas dependen del oxígeno, humedad, y materia orgánica, las anaeróbicas son predominantes en suelos anegados donde existen las condiciones de humedad y materia orgánica pero el suministro de oxígeno está restringido (Mayz-Figueroa, 2004).

De acuerdo con Franche et al. (2009), una amplia diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno tienen la capacidad de colonizar la rizósfera e interactuar con plantas. Leguminosas y actinorrizas pueden obtener su nitrógeno mediante la asociación con *Rhizobia* o *Frankia* mediante la diferenciación de un órgano especializado, el nódulo. Muchas leguminosas pueden establecer una relación simbiótica con bacterias nodulares, colectivamente referidas como rizobios. Los rizobios son bacterias Gram negativas y pertenecen a la larga división *Proteobacteria*. El género *Frankia* comprende bacterias Gram positivas pertenecientes a la familia *Franliaceae* en el orden *Actinomycetales*.

La FBN por bacterias asociativas se define comúnmente como fijación de N por bacterias de vida libre bajo la directa influencia del hospedero. Estas bacterias asociativas entablan una relación protooperativa con una planta hospedera. En esta relación hay un intercambio de nutrientes entre los integrantes de la misma pero sin que exista o se forme una estructura radicular especializada (Dalton y Kramer, 2006). Las bacterias denominadas asociativas pueden ser también endófitas, las cuales son beneficiosas para la planta dado que suministran N a la planta hospedera mediante la FBN y por la producción de sustancias promotoras de crecimiento. Si bien cada mecanismo por separado es beneficioso, comúnmente ocurren a la vez. Los endófitos son definidos como aquellas bacterias que colonizan saludablemente el tejido de la planta sin causar síntomas visibles o producir daños a la planta. Estos endófitos pueden colonizar un elevado número de plantas, pero no siempre son detectados en los estudios (Dalton y Kramer 2006, Bhattacharjee et al. 2008).

Otra manera de clasificar los diazotrofos es presentada por Bottomley y Mylord (2007). Los procariotas diazotróficos pueden dividirse en aquellos que llevan a cabo la FBN en una relación simbiótica o comensalista con un eucariota y aquellos que fijan N₂ en un estado de vida libre. Las secreciones radicales y otras deposiciones son la mayor fuente de carbono para las bacterias diazotróficas asociadas con las raíces. Estas bacterias se encuentran también en espacios intercelulares de la corteza de la raíz. Se ha

dicho que estas bacterias pueden aportar entre el 5 y 30 % del N total acumulado por las plantas. En algunos casos particulares como los resultados encontrados en caña de azúcar por Urquiaga et al., citados por Bottomley y Mylord (2007) el porcentaje de N total proveniente de la fijación biológica puede llegar al 60%. Según Bottomley y Mylord (2007), es extremadamente difícil determinar la fijación biológica de N₂ para un ambiente por parte de los diazotrofos de vida libre, aún en ambientes en que se puede utilizar la técnica de reducción de acetileno.

Existen bacterias que favorecen a las plantas con una estimulación del crecimiento o la prevención de enfermedades. Estas bacterias son llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). Entre las BPCV se encuentran los microorganismos diazotrofos los cuales establecen una asociación sinérgica con las plantas. Klucas, citado por Dalton y Kramer (2006) señala que las plantas reciben excesos de N de los microorganismos y estos pueden utilizar compuestos derivados del carbono provenientes de las plantas como combustible para la fijación de N₂. En esta relación ambas partes son beneficiadas, pero su ocurrencia es más casual que cooperativa. En las gramíneas, la composición cuantitativa y cualitativa de los microorganismos en la rizósfera varía entre especies e incluso entre genotipos de la misma especie, lo cual se atribuye principalmente a las variaciones intrínsecas de cada planta en particular, en términos de la cantidad y calidad de los exudados radicales. Además de las características de la planta, la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera está controlada por los efectos que ejercen las propiedades del suelo sobre las interacciones de las raíces con los microorganismos (Rengel, 1997).

2.3.3 Factores que afectan la FBN

Además de la presión de O₂, la actividad de la enzima nitrogenasa y las poblaciones de microorganismos diazotrofos se ven afectadas por diferentes factores bióticos y abióticos. Estos factores explican las variaciones detectadas en FBN para una determinada especie y el estudio de los mismos es vital para lograr mejores resultados en aquellos casos en la que FBN tiene un rol fundamental en lo productivo y por lo tanto económico.

Day et al. (1975) en varias gramíneas forrajeras tropicales determinaron que la actividad nitrogenasa variaba considerablemente de acuerdo a la estación climática y fue máxima en el período de activo crecimiento vegetativo.

Otro de los factores que se ha determinado que afecta la actividad nitrogenasa es la fertilización nitrogenada. En *Paspalum notatum* para muestras de suelo intactas 10 ppm de NH₄⁺ inhibían la actividad de la nitrogenasa en 2 horas y 10 ppm de NO₃⁻ dentro de las 4 h. Pero después de una semana estos efectos eran insignificantes (Day et al., 1975). En el campo, la actividad de la nitrogenasa en las raíces de *Pennisetum purpureum* y *Digitaria decumbens* no se vio afectada, dos semanas después de

aplicaciones de 20 kg N ha⁻¹ como NH₄NO₃. Incluso después de ocho aplicaciones similares (Day et al., 1975).

Las diferencias de genotipo dentro de una misma especie afecta a la población de diazotrofos asociados a la misma. De acuerdo con Döbereiner et al. (1972), en el campo la especie *Azotobacter paspali* se encuentra establecida permanentemente en la rizósfera de los cultivares tetraploides de *Paspalum notatum*, pero no así en los cultivares diploides o en otras especies de *Paspalum*, aun cuando se inoculan artificialmente. En el mismo estudio el cultivar Batatais (tetraploide) difirió significativamente fijando más N que el cultivar Pensacola (diploide). Behling y Boddey (1987), en estudios realizados en *Panicum maximum*, también encontraron diferencias entre biotipos, sugiriendo que la mejora genética en esta especie debería de considerar la diferencia en la capacidad de fijar N.

Dobereiner et al. (1972) señalan que en las raíces de *Paspalum notatum* la actividad de la nitrogenasa esta indirectamente relacionada con la fotosíntesis. Dado que esta especie una vez que está establecida domina la pastura en luz directa, pero es fácilmente sustituida en la sombra. Döbereiner y Campello, citados por Döbereiner (1972), indican que el sombreado de una pastura de *Paspalum notatum* establecida disminuyó el número de *Azotobacter paspali* asociadas y que dado que la fotorespiración es despreciable en estas especies C₄, una mayor cantidad de fotosintatos se derivarán al crecimiento y exudación radicular, y serían responsables por la estimulación de la rizósfera hacia los organismos fijadores de vida libre.

Asimismo Döbereiner et al. (1972), encontraron que el agregado de azúcar estimulaba la actividad nitrogenasa y el suelo sin azúcar permanecía inactivo, sugiriendo que *A. Paspali* en el suelo está limitada por la disponibilidad de carbono. Sin embargo esta actividad aparentó no afectar la multiplicación de *A. Paspali*, dado que los números de las microcolonias fueron similares antes y después de la incubación con azúcar.

2.3.4 Métodos para estudiar la FBN

Los métodos más usados para medir la fijación biológica del N₂ son: la cuantificación del N total mediante el método de Kjeldahl, el método de reducción de acetileno y las técnicas isotópicas que emplean N¹⁵.

Zuberer (1998) señalan que es posible estimar la FBN a través de la comparación del N total en plantas creciendo con y sin bacterias fijadoras de N₂. Sin embargo señala que este método se puede utilizar únicamente en aquellos sistemas en que la fijación de N₂ es realmente alta.

La nitrogenasa puede reducir otros sustratos además del N₂ y esta ha sido la base de la reducción del acetileno, el cual mide la fijación de N₂ indirectamente

(Martínez-Romero, 2006). La sensibilidad de este método permite la detección de niveles realmente bajos de actividad nitrogenasa; de hecho, la sensibilidad de esta técnica facilitó la determinación de la fijación de N_2 asociada a gramíneas. Basándose en la energía para reducir una molécula de acetileno y una de N_2 la reducción de cuatro moléculas de acetileno equivale a la reducción de una molécula de N_2 . Sin embargo en la práctica esta relación ha mostrado variar entre 1.5/1 a 25/1, dependiendo del sistema de medida. La mayoría de los investigadores asumen un ratio de 3/1 o 4/1 (Zuberer, 1998).

Sin embargo algunas nitrogenasas no poseen la capacidad de reducir el acetileno (Ribbe, 1997). En estudios realizados por Achouak et al. (1999) en trigo y maíz con la bacteria *Paenibacillus* se registró un aumento total del N medido mediante Kjeldahl, pero no se observó reducción de acetileno.

Giller (1987), señala que la técnica de ARA puede sobreestimar la fijación de N_2 debido a: 1) producción de etileno el cual no proviene de acetileno, 2) oxidación de etileno por otras bacterias de suelo, 3) escasez de N durante un período prolongado debido a la inhibición de la nitrogenasa por el acetileno y 4) fallas para calibrar la relación de equivalencia entre la reducción de acetileno y la del N_2 .

Zuberer (1998), cita tres tipos de métodos basados en el uso del isótopo ^{15}N : 1) medición de la incorporación de $^{15}N_2$ (dinitrógeno etiquetado) dentro de la planta, 2) dilución isotópica, en el cual el contenido de ^{15}N en los tejidos de la planta es medido y la relación ^{15}N a ^{14}N es calculada y 3) abundancia natural del ^{15}N en suelos o plantas.

La técnica de abundancia natural de ^{15}N se basa en el hecho de que la mayoría de los suelos presentan ligeras diferencias en la abundancia de ^{15}N en comparación con el N presente en la atmósfera. La proporción de átomos de ^{15}N en el N_2 total de la atmósfera es de 0.3663% átomos ^{15}N . Para determinar la proporción de N derivado de el aire a través de FBN (% Ndfa), es necesario medir: (a) la abundancia ^{15}N en el N de la planta bajo estudio, (b) la abundancia ^{15}N derivado del N que la planta toma en el suelo, y (c) la abundancia ^{15}N de la N en esta planta derivado de la FBN. El enriquecimiento en ^{15}N por un sistema suelo/planta en una atmósfera enriquecida con $^{15}N_2$ puede considerarse una prueba definitiva de que ocurre FBN en ese sistema y por consiguiente asociación con diazotrofos. Sin embargo, debido a que la exposición al gas requiere control completo del entorno cerrado (pCO_2 , pO_2 , intensidad de luz, temperatura, etc), es prácticamente imposible aplicar esta técnica en el campo. El principio de esta técnica es el mismo que el de la abundancia natural del nitrógeno con la excepción que que los suelos enriquecidos con ^{15}N oscilan entre 0,1 y 1 atm porcentual por encima de la abundancia natural. Los suelos son enriquecidos con ^{15}N por el agregado de fertilizante con ^{15}N (Boddey et al., 2008)

Por otro lado, Rothballer et al. (2009) describe tres métodos comúnmente

utilizados para detectar e identificar bacterias en asociación con las plantas: 1) esterilización superficial del tejido del hospedero y aislamiento de los microorganismos en medios de cultivo adecuados, 2) amplificación mediante PCR del gen 16SrDNA u otro gen marcador, en el caso de fijadores de N₂ podría utilizarse el gen *nifH* y 3) detección in situ con pruebas específicas como las inmunológicas.

El aislamiento de bacterias desde las raíces de forrajeras o cultivos cerealeros condujo a la identificación de dos grupos: los colonizadores rizosféricos y los endofíticos. Como la mayoría de estas cepas fueron aisladas de la superficie esterilizada de muestras de raíz, se sugiere que algunas bacterias están protegidas de los agentes esterilizantes, pero puede también reflejar la colonización de los tejidos de la raíz (Franche et al., 2008).

Para cada bacteria a ser cultivada para cualquier propósito es necesario proveer el ambiente bioquímico y biofísico apropiado. El ambiente bioquímico (nutricional) se hace disponible como medio de cultivo. Los medios de cultivo son empleados para el aislamiento y mantenimiento de cultivos puros de bacterias y también son utilizados para la identificación de bacterias de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas. Los medios líquidos son utilizados para el crecimiento de lotes de cultivos puros mientras que los medios sólidos son ampliamente utilizados para el aislamiento de cultivos puros, para la estimación de poblaciones de bacterias viables, y una variedad de otros propósitos (Kenneth, 2000). Las bacterias fijadoras de N₂ son comúnmente aisladas en medios selectivos sin N combinado. Sin embargo, Martínez-Romero (2006) señala que trazas de N en el medio podría permitir el crecimiento de otras bacterias oligotróficas y hongos, por lo que se hace necesario algún otro método que confirme la capacidad de fijar N₂ de los microorganismos aislados. Existen microorganismos capaces de fijar N₂ en determinadas condiciones que pueden no ser las mismas que se proveen en el laboratorio, por ejemplo las distintas presiones parciales de O₂ a las que pueden fijar N₂ sin que se produzca la inactivación de la nitrogenasa. También algunas bacterias pueden fijar N₂ en la ausencia total del O₂, por ejemplo las bacterias del género *Clostridium*.

2.4 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE N₂ EN GRAMÍNEAS

La FBN no es un proceso exclusivo de las leguminosas. Existen diversos estudios que detectan FBN en varias gramíneas como arroz, maíz, caña de azúcar, paspalum y determinan las especies de diazotrofos que se encuentran asociadas a ellas (Wright y Weaver 1981, Dalton y Kramer 2006, Roech et al. 2006, Jha et al. 2009). Day et al. (1975) determinaron la actividad de la nitrogenasa (medida medida en nmol de C₂H₄ g⁻¹ de las raíces secas h⁻¹) en distintas gramíneas tropicales. Los valores más elevados para cada especie fueron: 754 para *Pennisetum purpureum*, 750 para *Brachiaria mutica*, 341 para *Digitaria decumbens*, 299 para *Panicum maximum*, 283 para *Paspalum notatum*, 269 para *Cynodon dactylon*, 41 para *Melinis minutiflora* and 29

para *Hyparrhenia rufa*.

May y Attiwill (2003), señalan que valores conservativos de fijación biológica de N en no-leguminosas son de 20-30 kg N/ha por año, pero valores aún más altos han sido estimados. Como ejemplo se señala que el cultivo de caña de azúcar se ha llevado a cabo por más de 100 años en algunas áreas de Brasil sin o muy baja fertilización nitrogenada y que la remoción total de la cosecha no declinó los niveles de N del suelo, sugiriendo que la fijación de N₂ podría ser la fuente de una parte substancial del N usado por el cultivo (Dalton y Kramer, 2006).

Dalton y Kramer (2006) señalan que la asociación de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* con caña de azúcar permite obtener altos rendimientos por muchos años sin ser necesaria la fertilización nitrogenada. Urquiaga, citado por Martínez-Romero (2006), indica que la media estimada de N₂ fijado por dos híbridos de caña de azúcar varió entre 170-210 kg N fijado/ha. El mismo autor concluye afirmando que la corrección de las deficiencias en micronutrientes de los suelos aparenta ser la llave para promover la fijación de N₂ en caña de azúcar.

En *Paspalum notatum* cv. Batatais se determinó que entre un 8 y 25% del N de la planta fue originado por FBN (Boddey et al., 1983). A su vez los mismos autores señalan que el cv. Batatais presentó una mayor proporción de N con origen en la FBN que el cv. Pensacola y que *Paspalum maritimum*.

En la especie *Paspalum notatum* se observó que el suelo presentó una actividad fijadora de N₂ 100 veces menor que la que presenta el suelo adherido a la raíz (Döbereiner et al., 1972). El suave lavado de las raíces disminuyó la actividad nitrogenasa levemente, aunque se removieron alrededor de la mitad de las células de *Azotobacter paspali*, indicando que las células próximas a la superficie de la raíz son las de mayor actividad nitrogenasa. El número de bacterias de *Azotobacter paspali* fue menor en la rizósfera que en la superficie radicular. Por otro lado, la misma autora evidenció que las raíces de *Paspalum notatum* cv Batatais con actividad nitrogenasa tenían una prominente capa de mucílago y en asociación con dicha capa se desarrollaron colonias de bacterias. La autora propone que esta capa puede estar otorgando las condiciones adecuadas para la fijación de N₂ y también protege las células de ser lavadas de las raíces. Estas características del mucílago o bacterias fijadoras fueron encontradas en el cultivar Batatais de *Paspalum notatum*.

Según Martínez-Romero (2006) la FBN en no-leguminosas estaría limitada en mayor medida por la planta que por la bacteria, citando el trabajo de Christiansen-Weniger en que plantas tolerantes al aluminio poseen una mejor capacidad de mantener la fijación de N por parte de bacterias que las plantas no tolerantes, debiéndose a la excreción de compuestos carbonados que son adecuados para mantener la fijación por

parte de las bacterias.

2.4.1 El N en los pastizales nativos uruguayos

Es conocida la deficiencia de algunos nutrientes minerales en los suelos del país, especialmente N y fósforo, condicionando el potencial de crecimiento del campo natural. Al ser las gramíneas el componente principal de estas pasturas, el N se presenta como uno de los elementos de mayor significancia. A su vez, como consecuencia de esto se han desarrollado vegetaciones estivales con especies más eficientes en el uso del N. Esto último probablemente explica un aumento en la estacionalidad del campo natural en los estudios en que se fertiliza con N. Expresando en otras palabras, hay una mayor producción total anual del campo natural, pero más concentrada aun en la estación estival (Ayala y Carámbula, 1994).

2.5 *PASPALUM DILATATUM*

Paspalum dilatatum Poir. Es una gramínea nativa, cuya presencia en pasturas y pastizales es altamente deseable porque es una de las pocas especies de crecimiento predominantemente estival y con alto valor forrajero (Cornaglia, 2003). Rosengurtt, citado por Carámbula (2007) señala que es una gramínea que no solo aparece en campos vírgenes, sino que su presencia es común en rastrojos, ya que es una de las gramíneas que demora más en desaparecer en las degeneraciones pratenses. Aunque no la califica como una gramínea agresiva. De acuerdo con Speranza (2005) *Paspalum dilatatum* Poir. es una gramínea nativa de las praderas templadas de Sudamérica. Y aunque ha sido una de las primeras gramíneas de ciclo estival que se han utilizado como forrajeras, subsisten diversas limitantes para su uso, principalmente, su baja producción de semilla y susceptibilidad al hongo *Claviceps paspali*.

Los miembros del grupo Dilatata han sido clasificados en varias categorías taxonómicas formales e informales, específicas e inespecíficas llamadas “biotipos”. El biotipo más común y disperso de *P. dilatatum* (*P. dilatatum* ssp. *dilatatum*) es un complejo híbrido pentaploide apomítico (Speranza, 2009)

Speranza (2005) señala que el grupo Dilatata incluye cinco biotipos sexuales de fórmula genómica IIJJ (*P. urvillei* Steud., *P. dasypleurum* Kunze ex Desv., *P. dilatatum* ssp. *flavescens* Roseng. Arr. et Izag. y los biotipos Virasoro y Vacaria de *P. dilatatum*). Son biotipos tetraploides sexuales que se encuentran geográfica, genética y morfológicamente bien diferenciados y probablemente todos ellos merezcan rango específico. El grupo también incluye un biotipo pentaploide apomítico, *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* de fórmula genómica IIJJX, y varios otros biotipos apomíticos monoclonales de diferentes niveles de ploidía, la mayor parte de los cuales son probablemente derivados del pentaploide.

Paspalum dilatatum puede instalarse tanto en primavera como en otoño, siempre que la siembra se realice temprano. Es una especie que demora en germinar varias semanas, siempre que las condiciones ambientales sean favorables, con un crecimiento inicial lento. En las mejores condiciones las plántulas demoran 4 meses en adquirir vigor. Pero si bien su velocidad de implantación es lenta, la capacidad de persistencia es excepcional. Se la califica como una especie de gran productividad que cubre fácilmente la deficiencia estival generalizada de forraje de la mayoría de las mezclas convencionales, ofreciendo una entrega más homogénea a lo largo del año. Sin embargo debido a que la gran mayoría de las pasturas sembradas son ubicadas formando parte de rotaciones con cultivos (2-4 años), y a que el *Paspalum* presenta un lapso extenso (2 años o más) para ofrecer su plena producción de materia seca, el verdadero rol de esta especie se aprecia realmente en las áreas ganaderas y lecheras. Las especies como *Paspalum*, donde prácticamente el ciclo vegetativo se confunde con el reproductivo, un manejo que elimine las macollas reproductivas, asegura un proceso de macollaje continuo que permite una mejor persistencia y una mayor calidad de la materia seca (Carámbula, 2007). A su vez, Benech, citado por Carámbula (2007), observó en dos biotipos de *Paspalum dilatatum* de hábitos de crecimiento contrastantes (erecto y decumbente), que los cortes más bajos rendían más y que el forraje era de mayor digestibilidad. Lawson et al. (2003), señala que *Paspalum* es menos afectada por inundaciones y tolera mejor largos períodos de irrigación que trébol blanco y raigrás perenne, además responde bien al agregado de fertilizante nitrogenado.

Carámbula (2007), señala que su período productivo comienza en octubre y continúa hasta mayo, cuando comienzan las heladas. El mismo autor cita a García, sobre los inconvenientes para expandir esta especie asociados al bajo porcentaje de germinación debido al bajo porcentaje de semillas llenas. A su vez el mismo autor señala que esto se debe a problemas en la forma de producción de semillas, a efectos de ataque de *Claviceps paspali* y a condiciones ambientales durante la floración. Según Formoso (2003), en la década del 80 se realizaron experimentos de implantación, control de malezas y mezclas forrajeras. El principal problema de esta especie a resolver era la producción de semillas, tema que tecnológicamente fue solucionado, no obstante la cosecha se dificultaba por la miel, la cosechadora se pegoteaba y por tanto los productores se desinteresaron en multiplicarlo y no hubo disponibilidad de semilla. En INIA a pesar de estos problemas, se multiplicó semilla del cultivar Estanzuela Chirú.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTREO

El muestreo se realizó el día 15 de noviembre de 2010 en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía, ubicado en las cercanías de Progreso, Canelones (34°36'46" S; 53°13'16" W).

Las plantas de *P. dilatatum* se identificaron por su morfología y se diferenciaron las subespecies por el color de sus anteras, de color violeta en *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* y de color amarillo en *P. dilatatum* ssp. *flavescens*.

Se delimitaron tres zonas de campo natural, separadas 20 metros aproximadamente entre sí, con presencia de ambas subespecies (Figura No. 2). En cada zona se tomó una planta de cada subespecies con suelo rizosférico. Se obtuvieron un total de 6 plantas, 3 de cada subespecie.

Las plantas se trasladaron hasta el laboratorio de microbiología de la Facultad de Agronomía donde al día siguiente se procedió al acondicionamiento de las muestras de suelo rizosférico, raíces y rizoma.

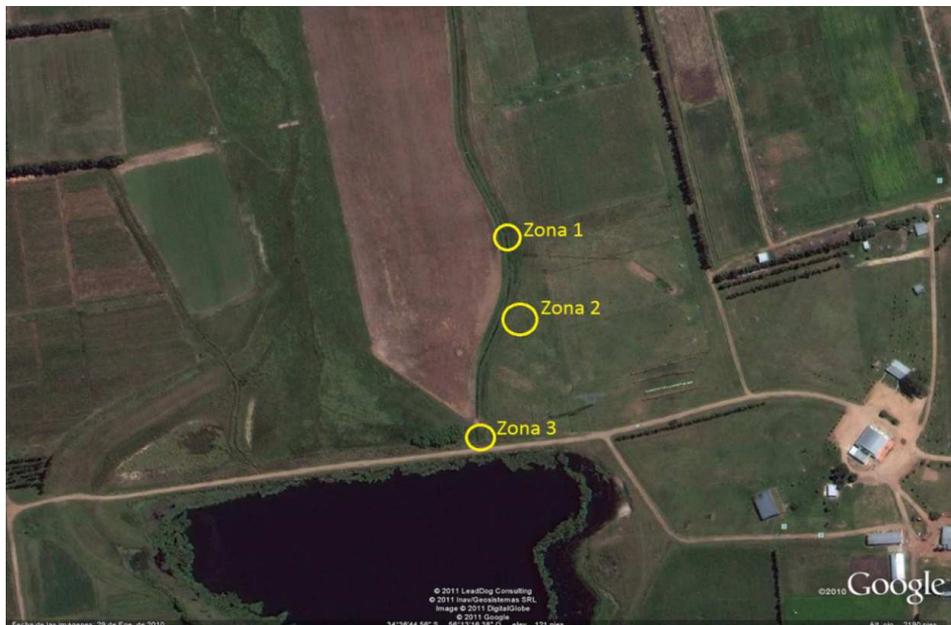


Figura No. 2. Ubicación de las zonas de muestreo en el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía.

3.2 RECUENTO DE DIAZOTROFOS

La cuantificación de la población de diazotrofos presentes en suelo rizosférico se realizó empleando los métodos de número más probable (NMP), recuento de viables en placa y crecimiento de diazotrofos entorno a gránulos de suelo. Para la cuantificación de diazotrofos endófitos de raíz se utilizó únicamente el método de NMP. Se emplearon medios selectivos sin N combinado; para realizar NMP se utilizaron los medios semisólidos jNFb y LGi y para el recuento de viables en placa y siembra de gránulos de suelo en medios sólidos se usaron los medios LG, Ashby Manitol y Ashby Sacarosa. El detalle de la composición los medios aparece en el anexo No. 1.

El suelo rizosférico se colectó tomando el suelo que quedaba adherido a las raíces de las plantas de *P. dilatatum*. Se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril, la dilución 10^{-1} se realizó agregando 1 g de suelo rizosférico en 9 ml de agua destilada estéril. Se sembraron 100 μ l con tres repeticiones de las diluciones -3; -4; -5 en los medios semisólidos jNFb y LGi para el NMP y 100 μ l con tres repeticiones en los medios sólidos LG, Ashby Manitol y Ashby Sacarosa para realizar conteo de viables en placa. Los viales y placas se incubaron en estufa a 28°C durante 7 días y se observó el crecimiento microbiano. Los frascos con crecimiento visible y cambio de pH fueron considerados positivos y se calculó el NMP de diazotrofos por gramo de suelo empleando las tablas de Mac Grady (Döbereiner et al., 1995). En las placas de medio sólidos se contaron las colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonias ufc por gramo de suelo.

Además, se sembraron gránulos de suelo en los mismos tres medios sólidos sin N combinado usados para estimar la población de diazotrofos en suelo rizosférico. Se colocaron 10 gránulos de 3mm de diámetro aproximadamente en cada placa, con 3 repeticiones. Se incubó en estufa a 28 C durante 7 días y se determinó el porcentaje de gránulos que evidenció crecimiento en su entorno.

Los rizomas y las raíces se lavaron con agua corriente y se realizó una desinfección superficial en alcohol 70% (3 minutos), seguido de hipoclorito de sodio 5% (3 minutos) y 3 enjuagues en agua destilada estéril. La dilución 10^{-1} de raíces se realizó pesando 1 gramo de raíces desinfectadas superficialmente y macerándolas en 9ml de NaCl 0.9%. Se sembraron 100 μ l con tres repeticiones de las diluciones -4; -5; -6 en los medios semisólidos jNFb y LGi. Se incubó en estufa a 28° C durante 7 días y se observó crecimiento. El NMP fue calculado de igual manera que para los diazotrofos de suelo rizosférico.

No se realizaron recuentos de rizoma dado que su firme estructura impidió que fuese macerado homogéneamente para realizar NMP. Pero para realizar aislamientos de endófitos se sembraron trozos pelados y desinfectados (1 minuto en alcohol 70%; 1 minutos en hipoclorito 5% y 3 enjuagues en agua destilada estéril) en los mismo medios

semisólidos sin N combinado.

Análisis estadístico: el NMP y las ufc de diazotrofos por gramo de material fresco (raíz, o suelo) fue transformado a log NMP. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de Fisher ($\alpha = 0.05$).

3.3 AISLAMIENTO DE DIAZOTROFOS

A partir del crecimiento evidenciado en las diluciones de NMP se obtienen aislamientos, tanto en raíz como en suelo, el conteo en placa de diluciones de suelo, las colonias desarrolladas en torno a los gránulos y el crecimiento en medios semisólidos a partir de los trozos de rizoma. Los aislamientos se realizaron a partir del crecimiento bacteriano evidenciado en los distintos medios sin N utilizados para los recuentos. Para realizar aislamientos de diazotrofos rizosféricos se seleccionaron las colonias morfológicamente distintas formadas en la superficie de los medios sólidos y se sembraron nuevamente en los mismos medios sin N para verificar la capacidad de fijar N_2 .

Para obtener aislamientos de diazotrofos de gránulos de suelo se realizaron siembras por agotamiento a partir del crecimiento bacteriano observado alrededor de los gránulos en los mismos medios sólidos sin N combinado. Luego de 120 horas de incubación a 28 C grados se obtuvieron colonias aisladas que fueron nuevamente repicadas en medio sin N para verificar su capacidad de fijar N_2 .

Para poder aislar los diazotrofos que se desarrollaron en medios semisólidos sin N se tomó con un anza el crecimiento en medios semisólidos y se sembró por agotamiento en medio TY con N (Anexo 2). Las colonias aisladas se repicaron nuevamente en el mismo medio sólido para la obtención de cultivos puros.

Los cultivos puros se conservaron por duplicado en medio TY líquido en glicerol al 50 % a -20 °C y a -80 °C.

3.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los aislamientos fueron caracterizados de acuerdo al aspecto de sus colonias (tamaño, brillo, color, producción de pigmentos, crecimiento mucoso, forma y cambio de pH del medio).

Los aislamientos provenientes de medios semisólidos se sembraron en medio TY para verificar su morfología, y posteriormente se sembraron en medios selectivos sin N para confirmar su capacidad de crecer en medio sin N.

Los aislamientos provenientes de medios sólidos sin N se sembraron en los mismos medios sin N para evaluar sus características morfológicas y comprobar que

efectivamente crecían en medios sin N.

3.5 OBTENCIÓN DE ADN

A partir de los cultivos puros de los aislamientos seleccionados se realizó un lisado de las células. Empleando la punta de un tip estéril se resuspendió una pequeña cantidad de cada colonia crecida en medio TY en 25 µl de solución de lisis (0,05% NaOH, 0,25% SDS). Esta solución se llevó a 95 °C por 10 minutos, luego se agregaron 225 µl de agua milli Q estéril y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue conservado a -20°C y utilizado como molde en las reacciones de PCR.

3.6 AMPLIACIÓN DEL GEN *nifH*

En aquellos aislamientos capaces de crecer en medio sin N en repetidas ocasiones se realizó la amplificación del gen *nifH* con el objetivo de contar con una herramienta más que permita afirmar que poseen la capacidad de fijar N. Se seleccionó un grupo de aislamientos teniendo en cuenta las características morfológicas de manera que cada tipo morfológico estuviera presente en los estudios posteriores.

Se utilizó la técnica de PCR-anidada (nested PCR) que consta de dos reacciones secuenciales, utilizando como templado para la segunda reacción, el producto obtenido en la primera reacción. En la primera amplificación se utilizaron los primers degenerados *nifH*19 (5'-GCIWYTYTAYGGIAARGGIG-3') (Ueda et al., 1995) y *nifH*3 (5'-ATR TTR TTN GCN GCR TA-3') (Zani et al., 2000). La degeneración de los primers esta dada por estándares convencionales donde: K: G/T; M: A/C; R: A/G; S: C/G; W: A/T; Y: C/T; V: A/C/G; N: A/C/G/T; B: C/G/T. En la segunda amplificación se utilizaron los siguientes primers degenerados: *nifH* 11(5'-GAYCCNAARGCNGACTC-3') y *nifH* 22 (5'-ADWGCCATCATYTCRCC-3') (Yeager et al., 2005).

La primera reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl con 2 µl de sobrenadante del lisado y 12 µl de master mix con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de Thermo Buffer, 4mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 mM de cada primer, 1 mg/ml de BSA y 0,8 U de taq polimerasa (SBS). Se realizó un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto ADN molde y como control positivo se utilizó una cepa *nifH* positiva. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos seguido por 20 ciclos de: 45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación a 48 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C. Para incrementar la eficiencia de la amplificación se incorporó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Con el producto de la primera amplificación se realizó una segunda amplificación utilizando los primers *nifH*11 y *nifH*22. La reacción de amplificación se

llevó a cabo en volumen final de 25 μ l con 2 μ l de cada producto de la primer PCR y 23 μ l de master mix con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de thermo buffer, 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,8 μ M de cada primer, 1mg/ml de BSA y 0,8 U de Taq polimerasa (SBS). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de a 95°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos de: 45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de hibridación a 54 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C. Para incrementar la eficiencia de la amplificación se incorporó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente 360 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V por media hora en solución TBE 0,5X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV.

3.7 AMPLIFICACIÓN DEL 16S rDNA

Para caracterizar e identificar las cepas seleccionadas se amplificó el gen que codifica la subunidad 16S utilizando los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Eden et al., 1991) y 1491R. (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, con 2 μ l de lisado y 23 μ l de master mix, con las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de thermo buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 de cada desoxirribo nucleótido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,2 mM de cada primer, 1 mg/ml de BSA y 1 U de Taq ADN polimerasa (SBS). Se realizó un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción excepto ADN molde. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de a 95°C durante 5 minutos seguido por 35 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 56 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C. Para incrementar la eficiencia de la amplificación se incorporó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de amplificación, fragmentos de aproximadamente 1500 pb, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis fueron 90 V durante 45 minutos en solución TBE 0,5X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV.

3.8 POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Los fragmentos amplificados del gen 16S rDNA de cada aislamiento fueron digeridos con dos enzimas de restricción *Msp* I y *Hha* I (Fermentas). Las digestiones se realizaron con 20 μ l del producto de amplificación, buffer Tango 1X (Fermentas) y 2U de cada enzima. La mezcla se incubó a 37 °C por 5 horas. Luego del tiempo de

incubación los productos obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 3%. Las condiciones de la electroforesis fueron 75V durante tres horas en solución TBE 0,5X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV.

3.9 SECUENCIACIÓN DEL 16S rDNA

Para la secuenciación del gen 16S rDNA se eligieron cepas representativas de cada perfil de restricción. El producto de PCR sin purificar se cuantificó mediante la comparación visual con los fragmentos del marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas) en gel de agarosa 1%.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Corp S.A. (Corea).

3.10 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias se editaron con el programa FINCH TV, obteniéndose secuencias de 750 a 900 pb. Se utilizó Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para el alineamiento de las secuencias obtenidas. Esta herramienta comprende una serie de programas diseñados para explorar todas las bases de datos de secuencias disponibles e identificar aquellas secuencias similares al blanco indicado. En este caso la base de datos utilizada fue la de NCBI.

4 RESULTADOS

4.1 RECUESTO DE DIAZOTROFOS

Con el fin de determinar el número de microorganismos fijadores de nitrógeno, se realizó un recuento de viables en placa para las poblaciones de suelo rizosférico y número más probable (NMP) para suelo rizosférico y endófitos de raíz. El número de diazotrofos asociados a plantas de ambas subespecies de *Paspalum dilatatum* presentó diferencias significativas únicamente mediante el método de NMP en las poblaciones de diazotrofos endófitos de raíz empleando el medio LGi; la subespecie *flavescens* presentó una mayor concentración de diazotrofos (Cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Densidad de diazotrofos en suelo rizosférico y endófitos de raíz de plantas de *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* y *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*

	log 10 del número de diazotrofos/g de muestra					Raíz	
	Suelo						
	LG ^a	A.Manitol ^a	A.Sacarosa ^a	jNFb ^b	LGi ^b	jNFb ^b	LGi ^b
<i>P. dil. ssp. Dilatatum</i>	7.10 a	7.07 a	7.16 a	5.82 a	6.15 a	6.14 a	5.64 b
<i>P. dil. ssp. Flavescens</i>	7.15 a	7.24 a	7.19 a	5.95 a	5.65 a	6.25 a	6.48 a

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (Fisher P<0.05). ^aMedios sólidos sin N combinado (recuento en placa). ^bMedios semisólidos sin N combinado (recuento mediante NMP).

El número de diazotrofos presentes en suelo determinado mediante recuento de viables en placas varió entre 1,2 y 1,7 x10⁷ ufc/g suelo. Mientras que los valores obtenidos mediante el método de número más probable se encontraron entre 4.5 x10⁵ y 1,4 x10⁶ diazotrofos/g de suelo. La densidad de diazotrofos en suelo determinada por recuento de viables en placa fue mayor que la observada a través del método de número más probable. Por otro lado las poblaciones de endófitos de raíz determinadas por número más probable variaron entre 4,4 x10⁵ y 3,0 x10⁶ diazotrofos/g de raíz. El recuento mediante el método de NMP demostró que las densidades de diazotrofos son similares en muestras de suelo y raíz (Cuadro No. 1).

Por otra parte se compararon estadísticamente los valores de densidades obtenidos con el fin de detectar diferencias entre las poblaciones de suelo rizosférico y las de endófitos de raíz detectadas en un mismo medio, así como también diferencias entre medios sin N combinado con el objetivo de observar preferencias por un medio de cultivo sobre otro. La comparación entre poblaciones de diazotrofos que crecieron en medios semisólidos sin N demostró que únicamente existieron diferencias significativas dentro de la subespecie *dilatatum* en los recuentos de raíz y suelo mediante número más probable en el medio LGi (Cuadro No. 2). El medio LGi permitió detectar una mayor

población de diazotrofos en suelo rizosférico que en las raíces de las plantas de *P. dilatatum* subespecie *dilatatum*. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre la concentración de diazotrofos presentes en suelo y raíz detectados en el medio jNFb para ninguna de las dos subespecies.

También se realizó un análisis estadístico para comparar las poblaciones de diazotrofos detectadas en los dos medios semisólidos sin N combinado (Cuadro No. 2). Este análisis demostró que no existieron diferencias significativas causadas por los medios de cultivos en las poblaciones de suelo rizosférico ni en las de endófitos de raíz.

Cuadro No. 2. Significancia del análisis de varianza entre poblaciones de diazotrofos de suelo rizosférico y endófitos de raíz mediante número más probable en medios semisólidos sin N combinado.

	jNFb raíz		LGi suelo	
	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>
jNFb suelo	0.5592	0.6018	0.1161	0.6005
LGi raíz	0.3766	0.6696	0.0217	0.1755

$p < a$ 0.05 indica diferencia significativa. Los análisis son entre medios o entre muestras (raíz o suelo) dentro de una misma subespecie.

La comparación estadística entre las poblaciones de diazotrofos en medios sólidos sin N no mostró diferencias significativas (Cuadro No. 3); indicando que son similares las densidades de microorganismos diazotróficos rizosféricos que pueden crecer en estos 3 medios sólidos sin N.

Cuadro No. 3. Significancia del análisis de varianza entre poblaciones de diazotrofos de suelo rizosférico mediante recuentos de viables en placa en medios sólidos sin N combinado.

	LG		Ashby manitol	
	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>
LG			0.8624	0.6870
Ashby Sacarosa	0.5522	0.8180	0.6079	0.8390

$p < a$ 0.05 indica diferencia significativa. Los análisis son entre medios dentro de una misma subespecie.

La estimación de la población de diazotrofos presentes en suelo rizosférico de ambas subespecies mediante el sembrado de gránulos de suelo en la superficie de 3 medios de cultivo sólidos sin N demostró diferencias significativas en el porcentaje de gránulos que desarrollaron colonias únicamente en el medio LG, siendo mayor ese porcentaje en la subespecie *flavescens* (Cuadro No. 4). En los medios LG y Ashby sacarosa el porcentaje de gránulos que desarrollaron crecimiento en su entorno fue alto, indicando una elevada presencia de diazotrofos en suelo rizosférico; mientras que en el medio A. manitol se obtuvo un menor porcentaje de gránulos con crecimiento

microbiano (Cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Porcentaje de gránulos de suelo rizosférico de plantas de *Paspalum dilatatum* que desarrollaron crecimiento bacteriano en su entorno.

	% de gránulos de suelo con crecimiento		
	LG	Ashby Manitol	Ashby Sacarosa
<i>P. dil. ssp. dilatatum</i>	79% b	29% a	88% a
<i>P. dil. ssp. flavescens</i>	93% a	66% a	99% a

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (Fisher $P < 0.05$).

El crecimiento bacteriano observado entorno a los gránulos de suelo en los tres medios sin N presentó en la mayoría de los casos aspecto gomoso y muy rápido crecimiento. En el medio LG se observó el viraje del indicador lo que indica la acidificación del medio (Figura No. 3).

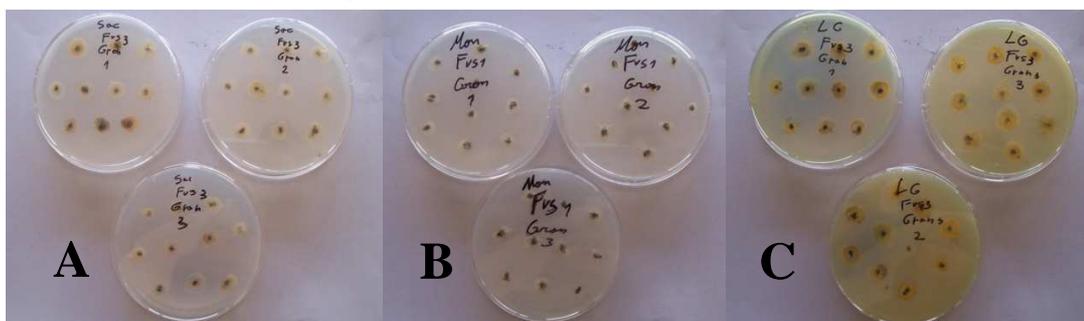


Figura No. 3. Crecimiento bacteriano entorno a gránulos de suelo rizosférico en tres medios sin N combinado, Ashby. Sacarosa (A), A. manitol (B) y LG (C).

4.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DIAZOTROFOS

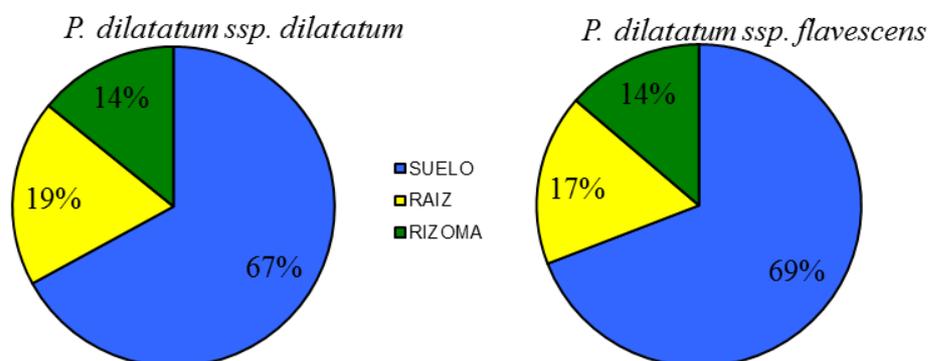
Se obtuvieron aislamientos de diazotrofos de suelo rizosférico, raíz y rizoma de plantas de ambas subespecies de *P. dilatatum* (Cuadro No. 5). Se formó una colección de 601 aislamientos, de los cuales 285 corresponden a la subespecie *dilatatum* y 316 a la subespecie *flavescens*. El número de aislamientos obtenidos en los distintos medios de cultivo utilizados fue similar (Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5. Número de aislamientos de diazotrofos obtenidos de plantas de *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* y *P. dilatatum* ssp. *flavescens* en distintos medios de cultivo.

Muestra	Medio de cultivo	No. de aislamientos obtenidos de:		Total	
		<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>dilatatum</i>	<i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i>		
SUELO	Gránulos	LG	22	30	52
		A. Manitol	13	29	42
		A. Sacarosa	22	32	54
	Diluciones	jNFb	30	30	60
		LGi	17	24	41
		LG	33	28	61
RAÍZ	Diluciones	A. Manitol	34	20	54
		A. Sacarosa	28	24	52
		jNFb	19	27	46
RIZOMA	Trozos	LGi	23	26	49
		jNFb	23	18	41
		LGi	21	28	49
Total			285	316	601

La mayoría de los aislamientos obtenidos de ambas subespecies de *P. dilatatum* provienen de suelo rizosférico, seguido de los de raíz y después rizoma. En ambas subespecies el porcentaje de aislamientos provenientes de suelo supera el 65% (gráfica No. 1). Este resultado se explica por el hecho de que se sembraron gránulos y diluciones de suelo en 5 medios sin N, mientras que las muestras de raíz y rizoma solo se sembraron en 2 medios semisólidos sin N.

Gráfico No. 1. Porcentaje de aislamientos según su origen para ambas subespecies de *Paspalum dilatatum*.



Los aislamientos fueron caracterizados morfológicamente según forma, tamaño, color, brillo de las colonias y producción de pigmentos. Los diazotrofos de rizoma, raíz y suelo que se desarrollaron en medios semisólidos fueron aislados y caracterizado en medio TY (Figura No. 4). En total se obtuvieron 286 aislamientos entre los cuales se distinguieron 15 morfologías, que se denominaron con letras desde la A a la M (Cuadro No. 6).

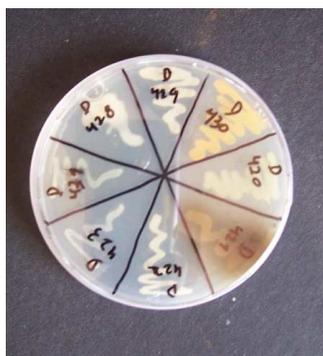


Figura No. 4. Crecimiento y morfología de aislamientos de suelo rizosférico en medio TY.

Cuadro No. 6. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico, raíz y rizoma de ambas subespecies de *P. dilatatum* según la morfologías en medio TY.

Morfología	Número de aislamientos		
	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>	Total
A	9	12	21
B	32	21	53
C	19	31	50
D	2	5	7
E	2	10	12
F	3	-	3
G	10	6	16
H	4	1	5
I	1	1	2
J	1	3	4
K	2	7	9
L	5	5	10
M	42	46	88
N	1	3	4
O	-	2	2

La mayoría de las morfologías se encontraron en ambas subespecies de *P.*

dilatatum, a excepción de las morfologías F y O. La morfología más frecuente fue la M, seguida por las morfologías B y C. La morfología M corresponde a colonias color beige claro, brillantes, medianas y chatas. La morfología B se describe como blanca nítida, muy brillante y pequeña. La C son colonias blancas claras, brillante y mediana.

Los aislamientos de suelo obtenidos en medio LG fueron caracterizados según forma, tamaño, brillo de las colonias y viraje del indicador de pH (Figura No. 5).



Figura No. 5. Crecimiento y morfología de diazotrofos aislados de suelo rizosférico en medio LG. En la foto se identifica un aislamiento que acidifican el medio (abajo).

Entre los 113 aislamientos obtenidos en medio LG se observaron 12 morfologías que se identificaron con números romanos (I-XII) (Cuadro No. 7.). De igual manera que para los aislamientos provenientes de medios semisólidos solo 3 morfologías no se encontraron en ambas subespecies. La morfología más frecuente fue la IV seguido por la morfología II. La morfología IV se describe como transparente, brillante, con crecimiento gomoso, de tamaño mediano y no produce cambio de pH del medio y la morfología II son colonias blancas, brillantes, muy pequeñas que no cambian el pH del medio.

Cuadro No. 7. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico de ambas subespecies de *P. dilatatum* según la morfología de las colonias en medio LG.

Morfología	Número de aislamientos		Total
	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>	
I	1	5	6
II	9	13	22
III	7	2	9
IV	11	17	28
V	10	4	14
VI	1	-	1
VII	5	5	10
VIII	-	1	1
IX	6	2	8
X	2	2	4
XI	4	5	9
XII	1	-	1

Los aislamientos de suelo obtenidos en los medios Ashby sacarosa y manitol fueron caracterizados según forma, tamaño, brillo y producción de pigmentos de las colonias (Figura No. 6).



Figura No. 6. Crecimiento y morfología de diazotrofos aislados de suelo rizosférico en medios A. sacarosa y A. manitol.

En los aislamientos obtenidos en medios Ashby se distinguieron 9 morfologías que se identificaron con números arábigos (Cuadro No. 8). Las morfologías más frecuentes fueron la 1 y la 2. La morfología 1 corresponde a colonias transparentes, brillantes, medianas y chatas y la morfología 2 se describe como beige claro, brillante,

mediana y apenas globosa.

Cuadro No. 8. Número de diazotrofos aislados de suelo rizosférico de ambas subespecies de *P. dilatatum* según la morfología de las colonias en medios Ashby manitol y sacarosa.

Morfología	Número de aislamientos		
	<i>dilatatum</i>	<i>flavescens</i>	Total
1	31	19	50
2	16	18	34
3	6	14	20
4	7	-	7
5	5	17	22
6	1	8	9
7	13	10	23
8	12	9	21
9	6	10	16

Esta caracterización morfológica permitió evidenciar la gran diversidad existente entre los aislamientos y en segundo lugar permitió seleccionar un grupo de aislamientos para continuar con la caracterización ya que fue imposible trabajar con la totalidad de la colección dado el elevado número de aislamientos. Se seleccionaron 140 aislamientos en base a la caracterización morfológica los cuales fueron repicados en el mismo medio sin N del que fueron aislados. Ciento dos aislamientos demostraron que efectivamente crecían en medios sin N en repetidas oportunidades mientras que se descartaron 38 aislamientos provenientes de diferentes partes de la planta que no fueron capaces de volver a crecer en medio sin N combinado.

4.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *nifH*

Con el objetivo de tener una herramienta más para afirmar que un aislamiento es capaz de fijar N₂ se realizó una PCR para amplificar el gen *nifH*. Este gen codifica para una de las subunidades de la enzima nitrogenasa y su expresión es requerida para la fijación biológica de nitrógeno. El fragmento esperado de la amplificación del gen *nifH* con los primers degenerados *nifH* 11 y *nifH* 22 es de 360 pb. Se observó variabilidad en los resultados obtenidos de la amplificación del gen *nifH* ya que algunas amplificaciones dieron una única banda del tamaño esperado, mientras que otros aislamientos dieron además de la banda de 360 pb otras bandas que corresponden a amplificaciones inespecíficas (Figura No. 7). Además se obtuvieron fragmentos de PCR de concentración muy variable determinada por la intensidad de la banda en el gel de agarosa (Figura No. 7).

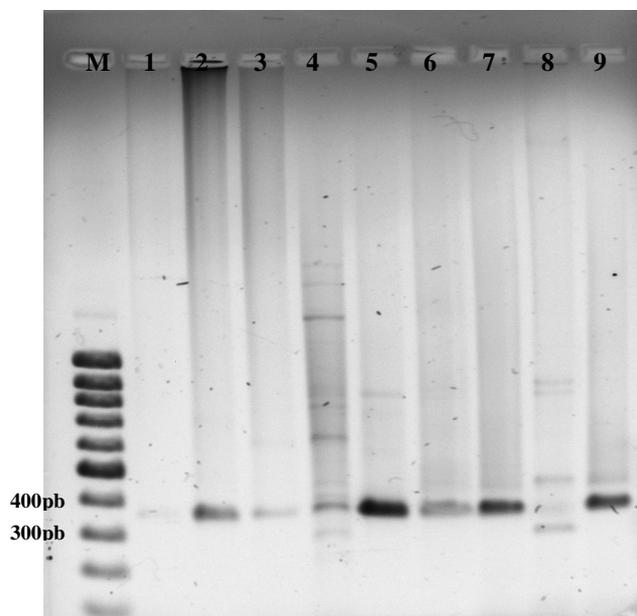


Figura No. 7. Productos de la amplificación del gen *nifH* en gel de agarosa 1%. M: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carriles 1 al 9: D1, D14, D319, F3, F9, F53, F216, F241, F239 respectivamente.

De los 102 aislamientos que crecieron en repetidas ocasiones en medio sin N solamente 18 resultaron positivos para *nifH* (17,64%) (Cuadro No. 9). Entre estos 18 aislamientos se encuentran aislamientos de ambas subespecies de *P. dilatatum*, tanto de suelo como endófitos de raíz y rizoma. Por otro lado es de destacar que fueron *nifH* positivos aislamientos con morfología M, B y C que fueron las morfologías más abundantes entre los diazotrofos obtenidos en medios semisólidos. Sin embargo, no resultaron *nifH* positivos los aislamientos con morfologías IV y II ni los con morfología 1 y 2 que fueron las más abundantes entre los aislamientos obtenidos en medios sólidos sin N.

Cuadro No. 9. Aislamientos identificados como *nifH* positivos

Aislam.	Orig.	Medio	Morf.	Aislam.	Origen	Medio	Morf.
D1	Suelo	LG	VI	F400	Suelo	LGi	A
D5	Suelo	LG	III	F401	Suelo	LGi	C
D14	Suelo	Ashby	4	F404	Suelo	jNFb	B
D18	Suelo	Ashby	9	F216	Rizoma	jNFb	C
F3	Suelo	LG	I	F218	Rizoma	jNFb	M
F9	Suelo	LG	III	F239	Rizoma	jNFb	J
F10	Suelo	LG	IX	F241	Rizoma	LGi	L
F53	Suelo	LG	XI	D315	Raíz	jNFb	B
F86	Suelo	Ashby	7	F322	Raíz	jNFb	D

4.4 AMPLIFICACIÓN DEL 16S rDNA

Para la identificación de las bacterias se escogió el gen 16S rDNA, dado que este gen se encuentra en todas las bacterias y está altamente conservado entre las diferentes especies de bacterias y archeobacterias. Se logró amplificar el 16S rDNA en 80 de los 102 aislamientos en estudio. Los primers utilizados amplificaron fragmentos de 1500 pb aproximadamente (Figura No. 8). En la figura se observan que se obtuvieron amplificaciones con diversa intensidad pero sin bandas inespecíficas.

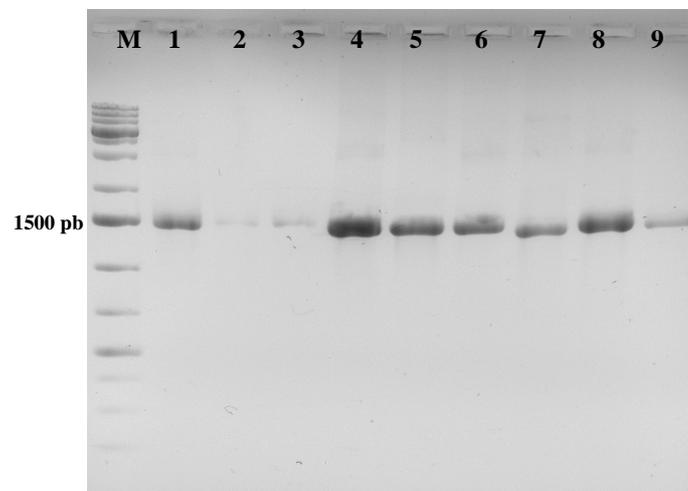


Figura No. 8. Productos de la amplificación del gen 16S rDNA en gel de agarosa 1%. M: marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas). Carriles 1 al 9: D3, D5, D206, D330, D334, D349, F168, F344, F422 respectivamente.

4.5 RESTRICCIONES DEL 16S rDNA

Se realizaron restricciones del gen 16S rDNA de 78 aislamientos, de los cuales 18 corresponden a aislamientos provenientes de raíz, 11 a aislamientos provenientes de rizoma y 49 a aislamientos de suelo rizosférico. La digestión con las enzimas Msp I y Hha I generó perfiles de restricción que posibilitaron la diferenciación entre aislamientos (Figura No. 9).

Entre los diazotrofos en estudio se encontraron 30 perfiles de restricción. Cada perfil de restricción fue identificado con números romanos. De estos 30 perfiles 9 se encontraron únicamente en aislamientos provenientes de la subespecie *dilatatum* y 14 en aislamientos de la subespecie *flavescens*, mientras que 7 perfiles se encontraron en aislamientos de ambas subespecies (Cuadro No. 10).

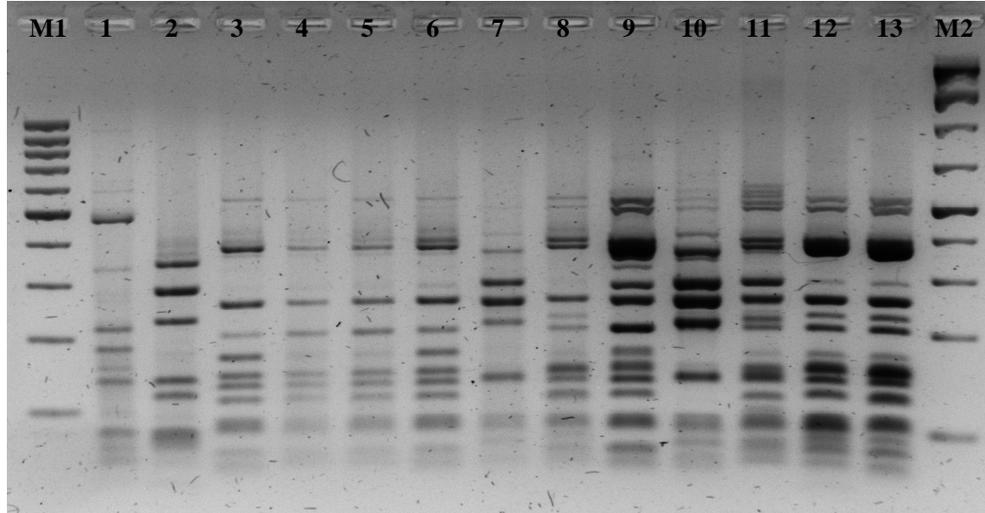


Figura No. 9. Restricción del 16S rDNA en gel de agarosa 3%. M1: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). M2: marcador de peso molecular 100 pb PLUS (Fermentas). Carriles 1-13: D2, D10, D26, D30, D31, D36, D46, D48, F204, F213, F239, D216, D319, respectivamente.

Los perfiles de restricción que más se repitieron fueron el I y el IX con 9 aislamientos, seguido por los perfiles XV y XIX con 7 aislamientos cada uno (Cuadro No. 10). Entre los aislamientos identificados con perfil de restricción IX, XV y XIX se encuentran aislamientos *nifH* positivos (Cuadro No. 10).

Por otra parte, 19 perfiles de restricción están representados por un único aislamiento; lo que señala la heterogeneidad de la población de diazotrofos presentes en suelo rizosférico y endófitos de raíz y rizoma en ambas especies de *Paspalum dilatatum*.

Cuadro No. 10. Perfiles de restricción del gen 16S rDNA de aislamientos obtenidos de plantas de *Paspalum dilatatum* subespecie *dilatatum* y subespecie *flavescens*.

Perf	<i>P.dil.</i>	<i>P.flav.</i>	Total	Perf	<i>P.dil.</i>	<i>P.flav.</i>	Total
I	D12, D13, D26, D30, D31, D36, D355,	F203, F204	9	XVI	D46	F64, F213	3
II	D346, D347, D349	F347, F348	5	XVII	-	F75	1
III	-	F86 ⁺	1	XVIII	-	F83	1
IV	D6, D7	F2, F7 F216 ⁺ , F239 ⁺	6	XIX	-	F3 ⁺ , F10 ⁺ , F40, F42, F59, F60, F68	7
V	-	F82	1	XX	D14 ⁺	-	1
VI	D224	-	1	XXI	D20	-	1
VII	-	F241 ⁺	1	XXII	-	F33	1
VIII	-	F43, F321, F322 ⁺	3	XXIII	D10, D24	F88, F401 ⁺	4
IX	D48, D216, D315 ⁺ , D330, D344, D319	F320, F325, F404 ⁺	9	XXIV	D206, D225	-	2
X	-	F400 ⁺	1	XXV	-	F9 ⁺	1
XI	D313	-	1	XXVI	D5 ⁺	-	1
XII	D1 ⁺ , D3	F422, F446	4	XXVII	-	F53 ⁺	1
XIII	D338	-	1	XXVIII	D2	-	1
XIV	-	F337	1	XXIX	D32	-	1
XV	-	F44, F45, F52, F79, F80, F218 ⁺ , F344,	7	XXX	-	F168	1

⁺ Aislamientos *nifH* positivos

Al analizar los distintos perfiles de restricción se observaron aislamientos que tenían origen en distintas partes de la planta (raíz, rizoma o suelo rizosférico) con igual perfiles de restricción. Ocho perfiles de restricción se repitieron entre aislamientos con distinto origen; tres de estos perfiles se encontraron entre aislamientos de suelo, raíz y rizoma (Cuadro No. 11). Numerosos perfiles se observaron en aislamientos de un único origen: 14 perfiles únicos entre aislamientos de gránulos de suelo rizosférico, 4 entre los de raíz, 3 entre los de rizoma y 1 entre los aislamientos obtenidos de suelo en medios semisólidos (Cuadro No. 11).

Cuadro No. 11. Distribución de perfiles de restricción del 16S rDNA entre aislamientos provenientes de distintas zonas de las plantas de *P. dilatatum*

	Perfiles comunes entre aislamientos de distintas zonas								Perfiles únicos
	I	IV	VIII	IX	XII	XV	XVI	XXIII	
Raíz	✓	-	✓	✓	-	✓	-	-	II, XI, XIII, XIV
Rizoma	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	-	VI, VII, XXIV
Diluciones de suelo	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	X
Gránulos de suelo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	III, V, XVII-XXII, XXV-XXX

4.6 SECUENCIACIÓN DEL 16S RDNA

Se seleccionaron 39 aislamientos según el perfil de restricción del gen 16S rDNA para la secuenciación de dicho gen. Las secuencias obtenidas luego de la edición fueron de 750 - 900 pb. El alineamiento de las secuencias utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) permitió identificar secuencias con elevado porcentaje de homología, la mayoría entre 99 y 100% de similitud (Cuadro No. 12). Sólo dos aislamientos (D216 y F60) no pudieron ser identificados ya que su secuencia homólogo con menos del 97% de similitud (Cuadro No. 12).

Los 39 diazotrofos identificados pertenecieron a 16 géneros, pertenecientes a diversos grupos como las alfa, beta y gamma protobacterias, firmicutes y flavobacterias.

Algunos aislamientos fueron identificados a nivel de especie, mientras que otros solo fue posible clasificarlos a nivel de género ya que homologaron con igual % de similitud con distintas especies dentro del mismo género (Cuadro No. 12).

Cuadro No. 12. Identificación de los diazotrofos mediante secuenciación del 16S rDNA

Aisl. ^a	Origen ^b	Perfil	Especie relacionada	No. acceso	Similitud
D13	Gr S	I	<i>Klebsiella sp.</i>	DQ923489.1	99%
			<i>Raoultella terrigena</i>	HQ242728.1	99%
D26	Gr S	I	<i>Klebsiella sp.</i>	DQ923489.1	100 %
			<i>Raoultella terrigena</i>	HQ242728.1	99 %
D36	Gr S	I	<i>Klebsiella sp.</i>	DQ923489.1	100 %
			<i>Raoultella terrigena</i>	HQ242728.1	99 %
D355	Ra	I	<i>Klebsiella sp.</i>	DQ923489.1	98%
			<i>Raoultella terrigena</i>	HQ242728.1	98%
F203	Ri	I	<i>Klebsiella sp.</i>	DQ923489.1	99 %
			<i>Raoultella terrigena</i>	HQ242728.1	99 %
F86 ⁺	Gr S	III	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ772057.1	99 %
F216 ⁺	Ri	IV	<i>Rahnella sp</i>	JF262562.2	99%
F239 ⁺	Ri	IV	<i>Rahnella aquatillis</i>	GQ148971.1	100%
D224	Ri	VI	<i>Pseudomonas sp.</i>	GU595297.1	100%
			<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GQ334366.1	100%
F241 ⁺	Ri	VII	<i>Burkholderia gladiodi</i>	GU936677.1	100%
			<i>Burkholderia cocovenenans</i>	U96934.1	100%
F43	Gr S	VIII	<i>Bacillus megaterium</i>	CP003017	100%
			<i>Bacillus aryabhotti</i>	JF951729.1	100%
F321	Ra	VIII	<i>Bacillus aryabhotti</i>	JN128236.1	100%
			<i>Bacillus megaterium</i>	FJ460475.1	100%
F322 ⁺	R	VIII	<i>Bacillus aryabhotti</i>	JF460759.1	100%
			<i>Bacillus megaterium</i>	JF682064.1	100%
D48	Gr S	IX	<i>Enterobacter cloacae</i>	EF185909.1	99 %
			<i>Pantoea agglomerans</i>	JF496544.1	99 %
D216	Ri	IX	<i>Pantoea sp.</i>	HQ219193.1	95 %
D315 ⁺	Ra	IX	<i>Enterobacter cloacae</i>	HM755652.1	100 %
			<i>Enterobacter ludwigii</i>	JF431271.1	100 %
			<i>Pantoea agglomerans</i>	JF496544.1	100 %
F404 ⁺	Dil S	IX	<i>Enterobacter cloacae</i>	HM755652.1	99%
			<i>Pantoea agglomerans</i>	JF496544.1	99%
			<i>Enterobacter ludwigii</i>	JF431271.1	99%
D3	Gr S	XII	<i>Chryseobacterium sp.</i>	AB581560.1	99 %
F422	Dil S	XII	<i>Rahnella sp</i>	GQ148928.1	100%

			<i>Rahnella aquatillis</i>	U90757.1	100%
F446	Dil S	XII	<i>Chryseobacterium joostei</i>	AY468479.1	99 %
D338	Ra	XIII	<i>Rhizobium lusitanum</i>	GU552881.1	100%
			<i>Labrys sp.</i>	AY635896.1	99%
F337	Ra	XIV	<i>Labrys neptuniae</i>	NR043801.1	99%
			<i>Labrys portulacaleensis</i>	NR043801.1	99%
F45	Gr S	XV	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	JF934697.1	99%
F79	Gr S	XV	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	HQ877451.1	100%
			<i>Xanthomonas citri</i>	JN039034.1	99 %
F218 ⁺	Ri	XV	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	FR749877.1	99 %
			<i>Pseudomonas geniculata</i>	JF460765.1	99 %
			<i>Pectobacterium carotovorum</i>	FJ527449.1	99 %
			<i>Pseudomonas geniculata</i>	JF460769.1	99 %
F344	Ra	XV	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	JF934697.1	99 %
			<i>Xanthomonas sp.</i>	EU373342.1	99 %
	Gr S		<i>Pseudomonas sp.</i>	HM027909.1	99 %
D46		XVI	<i>Burkholderia cepacia</i>	JN208104.1	99 %
			<i>Pseudomonas koreensis</i>	JF496406.1	99 %
F3 ⁺	Gr S	XIX	<i>Rahnella aquatillis</i>	JF934696.1	100 %
F60	Gr S	XIX	<i>Enterobacter asburiae</i>	EF059886.1	96%
D14 ⁺	Gr S	XX	<i>Klebsiella oxytoca</i>	FR821648.1	99 %
			<i>Enterobacter sp.</i>	AY683044.1	99 %
D24	Gr S	XXIII	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FR828338.1	100 %
			<i>Rhizobium sp.</i>	FJ233854.1	100 %
F88	Gr S	XXIII	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	FR828338.1	99%
			<i>Rhizobium sp.</i>	FJ233854.1	99%
F401 ⁺	Dil S	XXIII	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	JF712520.1	99%
			<i>Raoultella sp.</i>	JF946789.1	99%
D225	Ri	XXIV	<i>Klebsiella sp.</i>	FJ432002.1	99%
			<i>Klebsiella trevisonii</i>	AF129444.1	99%
F9 ⁺	Suelo	XXV	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	AB078043.1	100 %
D5 ⁺	Gr S	XXVI	<i>Rhizobium alamii</i>	FN796844.1	98%
			<i>Rhizobium mesosinicum</i>	DQ485277.1	98%
	Gr S		<i>Achromobacter spanius</i>	FM999732.1	100 %
F53 ⁺		XXVII	<i>Alcaligenes fecalis</i>	AJ509012.1	100 %
			<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	HM137034.1	100 %
			<i>Achromobacter piechaudii</i>	GQ927161.1	100 %
D32	Gr S	XXIX	<i>Microbacterium sp.</i>	GU086414.1	99%

			<i>Microbacterium testacum</i>	JN084147.1	99%
F168	Suelo	XXX	<i>Methylobacterium sp.</i>	<u>AB600029.1</u>	100%

^a Aislamientos precedidos de la letra D fueron aislados de la subespecie *dilatatum* y los precedidos de la letra F de la subespecie *flavescens*. Aislamientos indicados con ⁺ son *nifH* positivos

^b origen de los aislamientos: Gr gránulos de suelo, dil S diluciones de suelo, Ri rizoma y Ra raíz.

La mayoría de los aislamientos identificados dentro del mismo género poseen igual perfil de restricción, mientras que en algunos casos como por ejemplo los aislamientos identificados dentro del género *Klebsiella/Raoultella* se observaron tres perfiles de restricción (I, XX y XXIV) (Cuadro No. 12). Los resultados sugieren que una misma bacteria fue capaz de crecer en suelo rizosférico y colonizar el tejido vegetal. Se observó que tres aislamientos de suelo rizosférico (subespecie *dilatatum*) con perfil de restricción I identificados como *Raoultella terrigena*, uno de raíz (subespecie *dilatatum*) y uno de rizoma (subespecie *flavescens*) presentaron un elevado porcentaje de homología con la misma secuencia del banco de datos, es decir el mismo número de acceso, lo que indicaría que se trata de la misma cepa (Cuadro No. 12). De la misma manera, un aislamiento proveniente de suelo rizosférico identificado como *Stenotrophomonas maltophilia* homológo con el mismo número de acceso que otro de raíz, ambos de la subespecie *flavescens* y con perfil de restricción XV (Cuadro No. 12). Se observó otro Además dentro del perfil de restricción IX identificado como *Enterobacter cloacae/ludwigii*, un aislamiento de suelo rizosférico aislado de la subespecie *flavescens* y otro aislamiento proveniente de raíz de la subespecie *dilatatum* homologan con la misma secuencia (igual No. de acceso) (Cuadro No. 12).

Los microorganismos endófitos de raíz y rizoma identificados pertenecen únicamente al grupo de las proteobacterias con 9 géneros representados mientras que entre los microorganismos aislados de suelo rizosférico se observó una mayor diversidad de especies pertenecientes a todos los grupos antes mencionados (Cuadro No. 13). Algunas especies de diazotrofos fueron aisladas de varias partes de las plantas; *Enterobacter cloacae/Pantoea agglomerans* (perfil IX), *Raoultella terrigena* (perfil I) y *Stenotrophomonas maltophilia* (perfil XV) fueron las tres especies aisladas de suelo rizosférico, raíz y rizoma (Cuadros No. 12 y No. 13).

Cuadro No. 13. Especies identificadas en diazotrofos aislados de suelo, raíz y rizoma de *P. dilatatum*

Especies identificadas en aislamientos provenientes de:		
Suelo	Raíz	Rizoma
<i>Achromobacter piechaudii</i>		
<i>Achromobacter spanius</i>		
<i>Achromobacter xylooxidans</i>		
<i>Alcaligenes fecalis</i>		
<i>Bacillus aryalhotti/</i> <i>megaterium</i>	<i>B.aryalhotti/ megaterium</i>	
<i>Burkholderia cepacia/</i> <i>Pseudomonas koreensis</i>		<i>Burkholderia gladiodi/</i> <i>cocovenenans</i>
<i>Chryseobacterium joostei</i>		
<i>Chryseobacterium sp.</i>		
<i>Enterobacter cloacae/ludwigii</i>	<i>E. cloacae/ludwigii</i>	
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea sp.</i>
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
<i>Klebsiella sp.</i>		<i>Klebsiella trevisonii</i>
<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Raoultella terrigena</i>
<i>Microbacterium sp.</i>		
<i>Microbacterium testacum</i>		<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>
<i>Rahnella aquatillis</i>		<i>Rahnella aquatillis</i>
<i>Rahnella sp</i>		<i>Rahnella sp</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
		<i>Raoultella sp.</i>
<i>Rhizobium alamii</i>		
<i>Rhizobium mesosinicum</i>		
<i>Rhizobium sp.</i>	<i>Rhizobium lusitanum</i>	
	<i>Labrys sp.</i>	
	<i>Labrys neptuniae/</i> <i>portulacaleensis</i>	

Cuadro No. 14. Resumen de los resultados de identificación

Perfil restricción	Género/especie	No. aislam.	Presencia aislam. nifH +	Origen	
				subespecie	zona
I	<i>Raoultella terrigena</i>	9	NO	D y F	S, Ra, Ri
II	ND	5	NO	D y F	S
III	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	1	SI	F	S
IV	<i>Rahnella aquatillis</i>		SI	F	S
V	ND	1	NO	F	S
VI	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Burkholderia gladioli</i>	1	NO	D	Ri
VII	<i>Burkholderia cocovenenans</i>	1	SI	F	Ri
VIII	<i>Bacillus megaterium-</i> <i>Bacillus aryalhotti</i>	3	SI	F	S, Ri
IX	<i>Enterobacter cloacae/ludwigii</i>	7	SI	D y F	S, Ra, Ri
X	ND	1	SI	F	S
XI	ND	1	NO	D	R
XII	<i>Chryseobacterium sp.</i> <i>Rahnella sp</i>	3	NO	D y F	S, Ra
XIII	<i>Rhizobium lusitanum</i>	1	NO	D	Ra
XIV	Labrys sp. Labrys neptuniae Labrys portulacaleensis	1	NO	F	Ra.
XV	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	4	SI	F	S, Ra, Ri
XVI	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	1	NO	D	S
XVII	ND	1	NO	F	S
XVIII	ND	1	NO	F	S
XIX	<i>Rahnella aquatillis</i> <i>Enterobacter asburiae</i>	2	SI	F	S
XX	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter sp.</i>	1	SI	D	S
XXI	ND	1	NO	D	S
XXII	ND	1	NO	F	S
XXIII	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Rhizobium sp.</i>	3	SI	D y F	S

XXIV	<i>Raoultella sp.</i>	1	NO	D	Ri
	<i>Klebsiella sp.</i>				
XXV	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	1	SI	F	S
	<i>Rhizobium alamii</i>				
XXVI	<i>Rhizobium mesosinicum</i>	1	SI	D	S
	<i>Achromobacter spanius</i>				
	<i>Alcaligenes fecalis</i>				
XXVII	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	1	SI	F	S
	<i>Achromobacter piechaudii</i>				
XXVIII	ND	1	NO	D	S
	<i>Microbacterium sp.</i>				
XIX	<i>Microbacterium testacum</i>	1	NO	D	S
XXX	<i>Methylobacterium sp.</i>	1	NO	F	S

D: subespecie *dilatatum*. F: subespecie *flavescens*. S: proveniente de suelo. Ra: proveniente de raíz. Ri: proveniente de rizoma. ND: no hay datos,

5 DISCUSIÓN

5.1 RECUENTO DE DIAZOTROFOS

El número de microorganismos diazotrofos determinado en un recuento depende de varios factores como el medio de cultivo utilizado, método de recuento y las condiciones de incubación. En este trabajo para el recuento de diazotrofos se utilizaron medios sin nitrógeno que permiten el crecimiento de bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N_2). Dado que no se conocen los diazotrofos asociados a *Paspalum dilatatum* se utilizaron 5 medios de cultivos sin N combinado con el fin de permitir el crecimiento de una mayor diversidad de diazotrofos. Los medios utilizados variaron en fuente de carbono, vitaminas, minerales, pH y concentración de agar. Se emplearon los métodos de recuentos en placa y número más probable con la finalidad de determinar las poblaciones de diazotrofos rizosféricos y endófitos de raíz.

Esta metodología permitió demostrar la existencia de una población de diazotrofos asociados a la especie *Paspalum dilatatum*. Este resultado era esperado ya que es conocida la capacidad de varias especies de gramíneas de asociarse con bacterias capaces de fijar nitrógeno (De-Polli et al. 1975, Weier 1980, Lindberg y Granhall 1984, Baldani y Baldani 2004, Loredó-Ostí et al. 2004, Chowdhury et al. 2007). Para la especie *Paspalum notatum* ha sido ampliamente estudiada la capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno (Dobereiner et al. 1972, Day et al. 1975, Weier 1980, Boddey y Chalk 1983). A nivel mundial, los estudios realizados en la especie *P. dilatatum* son escasos. Uno de los pocos trabajos realizados es el de Wrigth y Weaver (1981), en el que se estudia la asociación de varias gramíneas entre ellas *Paspalum dilatatum* donde se observó que existen diazotrofos asociados a *Paspalum dilatatum* y se detectó la FBN mediante la técnica de reducción de acetileno que demostró valores de hasta 0,002 moles de C_2H_2 en 24 horas. A nivel nacional no existen antecedentes sobre el tema, limitándose los estudios sobre FBN a cultivos como el maíz (Montañez et al. 2009, Montañez et al. 2012), caña de azúcar (Taulé et al., 2012) y arroz (Irisarri et al. 2008, Punschke y Mayans 2011). Por lo tanto, este es el primer trabajo en nuestro país que busca demostrar que la especie *P. dilatatum* está presente en campo natural en asociación con microorganismos capaces de fijar nitrógeno.

Los resultados obtenidos del recuento de diazotrofos permitieron demostrar la existencia de microorganismos tanto endófitos como rizosféricos asociados a *Paspalum dilatatum* capaces de crecer en diversos medios sin nitrógeno (Cuadro No. 1). Los mencionados microorganismos se encuentran en elevada concentración, detectándose poblaciones del rango de 10^5 a 10^6 diazotrofos/g de raíz y suelo mediante el método de NMP y poblaciones de 10^7 ufc/g suelo utilizando el método de recuento en placa.

Las densidades de diazotrofos endófitos obtenidas en este trabajo son similares a las encontradas por Wrigth y Weaver (1981) en raíces de *P. dilatatum* en Texas,

quienes determinaron utilizando medios semisólidos poblaciones del rango de $2.5 - 5.7 \times 10^5$ diazotrofos/g de raíz. Por otro lado, los valores obtenidos para las poblaciones de diazotrofos endófitos de raíz son similares a los detectados en otras especies; Jha et al. (2009) determinaron valores entre 3×10^5 y 2×10^7 diazotrofos/g de raíz en plantas de arroz; Roech et al. (2006) reportaron valores de 2×10^6 en plantas de maíz y Pariona-Llanos et al. (2010) observaron valores entre $4,2 \times 10^3$ - $5,6 \times 10^5$ en caña de azúcar. En comparación con gramíneas forrajeras, los resultados obtenidos son similares a los reportados por Kirchhof et al. (1997) quienes observaron poblaciones de endófitos de 10^5 - 10^6 en raíces de *Pennisetum purpureum*. Sin embargo, nuestros resultados demostraron una mayor densidad de diazotrofos que los reportados por Kolb y Martin (1988) para *Phleum pratense* con valores entre $10^3 - 10^4$ para diazotrofos endófitos de raíz.

El número de diazotrofos en suelo rizosférico de plantas de *P. dilatatum* fue similar al observado por otros autores para otros cereales y forrajes. Islam et al. (2010) en suelos cultivados con arroz bajo largos tratamientos con fertilizantes NPK detectaron poblaciones del rango de $2,4 \times 10^2$ y $7,5 \times 10^7$ ufc/g suelo. Asimismo, Garrido et al. (2010) determinaron el número de diazotrofos presentes en suelo de tres gramíneas tropicales, detectando valores en el rango de 10^5 ufc/g. Sin embargo las altas poblaciones de diazotrofos en una planta no implica que ocurra una elevada actividad de la enzima nitrogenasa. Por ejemplo en los estudios realizados por Wriqth y Weaver (1981) 4 de las 9 plantas bajo estudio no mostraron reducción de acetileno y presentaron una densidad de diazotrofos superior a 1×10^5 /g de suelo. Los mismos autores señalan que las poblaciones encontradas serían suficientes para lograr altas tasas de fijación de N_2 , dependiendo de que ocurran condiciones apropiadas para el desarrollo de las bacterias. Por consiguiente, se puede plantear la misma hipótesis para los resultados obtenidos en este trabajo. Dado que se detectaron poblaciones de diazotrofos elevadas, es de esperar que si las condiciones son apropiadas, parte del N total de las plantas de *Paspalum dilatatum* sea proveniente de la FBN.

Los resultados obtenidos del recuento mediante el método de NMP demostraron que la densidad de diazotrofos es similar entre raíz y suelo rizosférico (Cuadro No. 2), detectándose únicamente diferencias en el medio LGi para la subespecie *dilatatum* donde las poblaciones de suelo fueron mayores que las endófitas de raíz. Rosenblueth y Martínez-Romero (2006) señalan que en general las poblaciones de las bacterias endofíticas son menores que las rizósfericas. Nuestros resultados se pueden deber en parte al momento de muestreo, dado que a esa fecha las temperaturas son elevadas y puede llevar a obtener similares recuentos en poblaciones endófitas que están en un nicho adecuado para su desarrollo frente a poblaciones de suelo que están sujetos directamente a la competencia con otros microorganismos y en un ambiente no tan favorable y con mayor disponibilidad de energía o fuentes carbonadas. Si observamos a los diazotrofos endófitos como una submuestra de los diazotrofos rizosféricos estos

tendrían que estar presente en mayor número que los otros dado que no todos los diazotrofos de suelo son capaces de colonizar tejido vegetal y por ello las poblaciones de endófitos son menores. Roesch et al. (2006) observó en maíz poblaciones de diazotrofos rizosféricos superiores a los endófitos, atribuyendo esto a una mayor presencia de exudados radicales en el suelo que promueven un ambiente rico en fuente de carbono y una reacción de defensa de la planta para evitar la colonización endofítica. Asimismo Rosenblueth y Martínez-Romero (2006) señalan que las respuestas defensivas de las plantas limitan las poblaciones de endófitos dentro de ellas.

La densidad de la población de diazotrofos endófitos es altamente variable, dependiendo principalmente de la especie bacteriana y el genotipo del hospedero, pero también del estado de desarrollo del hospedero, densidad del inóculo que logra entrar en el hospedero y condiciones ambientales (Tan et al., 2003). El número de diazotrofos puede variar con las condiciones existentes en el momento del muestreo, por ejemplo Dobereiner et al. (1972) observaron que el agregado de sacarosa aumentaba los recuentos de *Azotobacter paspali* en asociación con *Paspalum notatum* y la actividad nitrogenasa (medida en nmoles de etileno reducido). De-Polli et al. (1977) demostraron que plantas de *Paspalum notatum* tratadas con sacarosa mostraron una mayor fijación de N₂ mediante el uso de la técnica de N₁₅. El estado hídrico de las especies vegetales al momento del muestreo también afecta las densidades de diazotrofos, por ejemplo Garrido et al. (2010) encontraron que la época de lluvia favoreció significativamente las poblaciones de diazotrofos microaerófilos y de vida libre con respecto a la época de sequía para estudios realizados sobre 3 especies forrajeras en Colombia. La disminución de la población en la época de sequía pudo deberse a que las condiciones ambientales generan estrés en los tejidos vegetales, lo cual no favorece la producción de exudados. En el presente estudio, si bien los resultados obtenidos demuestran que *Paspalum dilatatum* es capaz de asociarse con diazotrofos el número de diazotrofos puede variar teniendo en cuenta que las poblaciones naturales de *P. dilatatum* pasan por varios períodos de exceso/deficiencia de humedad o variaciones de temperatura.

En general no existieron diferencias significativas en el número de diazotrofos asociados a las dos subespecies de *P. dilatatum* estudiadas, únicamente se encontraron diferencias significativas entre las dos subespecies en la población de endófitos de raíz detectada utilizando el medio LGi (Cuadro No. 1). En la bibliografía no existe información sobre los efectos de diferentes genotipos de *Paspalum dilatatum* sobre las poblaciones de diazotrofos asociados. Sin embargo, diversos autores han evidenciado el efecto del genotipo vegetal sobre las poblaciones de diazotrofos asociados a otras especies vegetales. Para la especie *Paspalum notatum*, se observó que los cultivares tetraploides se encuentran asociados en la rizósfera con la especie diazotrofa *Azotobacter paspali* mientras que los cultivares diploides o en otras especies de *Paspalum* esto no ocurre, aun cuando se inoculan artificialmente (Döbereiner et al., 1972). Resultados similares fueron observados por Behling y Boddey (1987), quienes

realizaron estudios en *Panicum maximum* y encontraron diferencias en el % de N derivado de la atmósfera medido con la técnica de enriquecimiento con N¹⁵ entre biotipos, sugiriendo que la mejora genética en esta especie debería de considerar la diferencia en la capacidad de fijar nitrógeno. A su vez en arroz Jha et al. (2009) detectaron diferencias en el número de diazotrofos endófitos de raíz entre el cultivar Kartiki y el cultivar Sataria. Sin embargo, Roesch et al. (2006) no encontraron diferencias entre cultivares de maíz cuando realizaron recuentos de endófitos de raíz y tallo y rizosféricos, utilizando número más probable. Por lo que el hecho que sean dos cultivares diferentes no indica que existan diferencias en las densidades de diazotrofos a la que esten asociados. Es importante destacar que tanto la especie como sus variedades influyen directamente en las poblaciones de microorganismos diazotróficos, lo que favorece el crecimiento de diferentes géneros, de acuerdo con las características de la rizósfera desarrollada en una planta, según su eficiencia fotosintética, la disponibilidad de nutrientes, la resistencia a las condiciones desfavorables, la producción de exudados, el pH del suelo y la materia orgánica (Burgmann et al., 2005). En nuestro trabajo no se evidenciaron diferencias entre las dos subespecies aunque sería recomendable realizar un mayor número de estudios para verificar este hecho y entender más la capacidad de los diazotrofos de asociarse en diferente forma con especies relacionadas. Es probable que con el uso de otras técnicas diferentes al recuento sea posible determinar diferencias entre las poblaciones de diazotrofos asociadas a ambas subespecies de *Paspalum dilatatum*. En este sentido, Aira et al. (2010) mediante la técnica PLFA (phospholipid fatty acid) detectaron diferencias en la composición de la población microbiana en dos variedades de maíz, afirmando que el genotipo modificó la estructura de las comunidades asociadas a maíz.

No se observaron diferencias entre los tres medios sólidos utilizados para recuento de diazotrofos de suelo. Por tanto se puede decir que los diazotrofos en la rizósfera de *Paspalum dilatatum* pueden utilizar diversas fuentes de carbono.

El método de gránulos de suelo permitió observar diferencias entre los medios LG , A. sacarosa y el medio A. manitol, sin embargo el recuento de viables realizado en placas con estos dos medios de cultivo no presentó diferencias significativas. La ventaja de usar diferentes medios radica en ofrecer a los diazotrofos de suelo diferentes ambientes para su desarrollo y así lograr aislar un mayor número de diazotrofos.

Entre los medios semisólidos utilizados (jNFb y LGi) no existieron diferencias significativas, sin embargo el medio LGi permitió determinar diferencias entre ambas subespecies y entre las poblaciones de suelo y raíz dentro de la subespecie *dilatatum*.

5.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Empleando medios de cultivo sin N combinado se obtuvieron 601 aislamientos de suelo rizosférico, endófitos de raíz y rizoma de ambas subespecies de *P. dilatatum*.

La mayoría de los aislamientos provienen de suelo, dado que en el trabajo se sembraron muestras de suelo en 5 medios y muestras de raíz en solo 2 medios. En todos los medios sin N combinado se observó crecimiento de bacterias, indicando que existen diazotrofos asociados a ambas subespecies de *Paspalum dilatatum* capaces de crecer en medios con diversas fuentes de carbono (ácido málico, sacarosa, manitol), diferentes pH, diferentes concentraciones de micronutrientes y vitaminas y tanto en medios sólidos como semisólidos. A pesar de utilizar diversos medios de cultivo y condiciones de incubación es imposible cultivar la totalidad de los diazotrofos presentes ya que existen microorganismos capaces de fijar nitrógeno en determinadas condiciones que pueden no ser las mismas que se proveen en el laboratorio (Martínez-Romero, 2006). Es por ello que los métodos dependientes del cultivo pueden no representar la verdadera diversidad bacteriana existente en un ambiente, debido a que los microorganismos son recuperados solo en un medio que intenta reproducir su nicho fisiológico (Ward et al., 1990).

Se obtuvieron la misma cantidad de aislamientos de cada medio de cultivo utilizado, tanto sólidos como semisólidos. En este trabajo además del interés por los diazotrofos presentes en el suelo rizosférico existió interés en aislar y determinar que tipo de microorganismos se encuentran en el interior de los tejidos de la especie *P. dilatatum*. Los microorganismos endófitos son aquellos que colonizan los tejidos interiores de la planta, como los de raíz y rizoma, a veces en elevados números, sin dañar el hospedero o generando fuertes respuestas de defensa por parte del mismo (Reinhold-Hurek y Hurek, 2011). A partir de raíces desinfectadas superficialmente se aislaron 95 microorganismos capaces de crecer en medios sin N y 90 a partir de rizoma desinfectado superficialmente. La fijación biológica de nitrógeno por parte de los microorganismos presentes en diferentes partes de la planta fue objeto de estudio del trabajo realizado por Döbereiner et al. (1972), en el que las raíces de *Paspalum notatum* tuvieron una mayor actividad nitrogenasa (medida mediante la reducción de acetileno) que el resto de la planta, aún más que el suelo en contacto con las raíces; lo cual demuestra que las condiciones en las raíces son más propicias para la FBN. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son capaces de entrar en las raíces desde la rizósfera, particularmente por la base de las raíces laterales emergentes, entre las células epidérmicas y a través de los pelos radicales; sin embargo en la mayoría de los casos las bacterias solo colonizan la superficie de las raíces y permanecen vulnerables a la competencia por parte de otros microorganismos rizosféricos, como consecuencia aún cuando las bacterias fijadoras de nitrógeno son endofíticas, las plantas obtienen mayores beneficios debido a una mejoría en la toma de nutrientes del suelo que de la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo aquellas bacterias capaces de establecerse en el xilema tienen la posibilidad de generar un nicho para que ocurra la fijación biológica de nitrógeno por parte de los microorganismos endófitos en arroz, maíz, sorgo y otras no leguminosas (Cocking, 2003). Dado lo anteriormente expuesto, es que en este trabajo se realizó un esfuerzo en formar una colección de diazotrofos endófitos y es de esperar que si alguno de los endófitos aislados de *P. dilatatum* es capaz de establecerse en el xilema

podríamos suponer que tiene un elevado potencial para suministrar N fijado a la planta.

La diversidad morfológica de los aislamientos fue amplia, obteniéndose diversas morfologías en los medios Ty, LG, A. Sacarosa y A. Manitol, con diferencias en tamaño, color, brillo, textura, producción de pigmentos. Este resultado permitió tener una idea preliminar de la diversidad asociada a ambas subespecies de *P. dilatatum* y comprobar si los géneros posteriormente identificados corresponden con la misma morfología. Sin embargo no es una técnica confiable para la identificación de aislamientos o para estimar la diversidad de géneros o especies presentes.

5.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *nifH*

La amplificación de este gen permitió tener una herramienta más para afirmar que un aislamiento es capaz de fijar N₂. La presencia de este gen solamente indica que el organismo tiene la información genética para sintetizar la nitrogenasa, no que esta enzima esté fijando nitrógeno efectivamente. Por lo tanto, un aislamiento *nifH* positivo indica que puede sintetizar la nitrogenasa, no que esté efectivamente realizando FBN en las condiciones de aislamiento. El porcentaje de aislamientos de los cuales se logró amplificar el gen *nifH* fue bajo (17,64%); sin embargo los aislamientos en los que no fue posible amplificar el gen fueron capaces de crecer en medios sin N en repetidos repiques. Este resultado coincide con los obtenidos por Chowhury et al. (2007) para *Lasiurus indicus*, una gramínea perenne del desierto de India, en que solamente 3 de 19 aislamientos fueron positivos para *nifH*. Sin embargo, Pariona-Llanos et al. (2010), realizando estudios en caña de azúcar, pudieron amplificar el gen *nifH* en 104 de los 105 aislamientos obtenidos utilizando dos pares de primers diferentes a los usados en este trabajo. Estos resultados indicarían que es posible obtener un buen porcentaje de aislamientos *nifH* positivos empleando más de un juego de primers para este gen.

Para la amplificación del gen *nifH* se utilizan primers degenerados, como consecuencia no siempre se adhieren al ADN para que la polimerasa comience a duplicar el gen. Existen diversos primers degenerados y no todos tienen la misma afinidad por el ADN, algunos logran adherirse al ADN con mayor afinidad que otros e incluso es posible que se amplifique genes que no son el *nifH*. El uso de primers altamente degenerados y condiciones de amplificación de bajo rigor facilitan la amplificación, mientras que los primers menos degenerados no amplificarán todos los genes *nifH*. Con el objetivo de lograr la amplificación universal es que se emplean primers degenerados, los cuales poseen secuencias de aminoácidos altamente conservados, pero la degeneración del código genético introduce variabilidad a la secuencia de ADN (Burgmann, 2004).

5.4 IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los

codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rodicio y Mendoza, 2004).

Las restricciones realizadas en el gen 16S rDNA con las enzimas Msp I y Hha I, permitió obtener perfiles de restricción que posibilitaron la diferenciación entre aislamientos. En total se observaron 30 perfiles de restricción entre los diazotrofos en estudio, de los cuales 9 perfiles se observaron únicamente en aislamientos provenientes de la subespecie *dilatatum* y 14 en aislamientos de la subespecie *flavescens*, mientras que 7 perfiles se encontraron en aislamientos de ambas subespecies. Asimismo 19 perfiles de restricción están representados por un único aislamiento, lo que señala la heterogeneidad de la población de diazotrofos presentes en suelo rizosférico y endófitos de raíz y rizoma en ambas especies de *Paspalum dilatatum*.

En total se aislaron diazotrofos pertenecientes a 17 géneros distintos, dentro de las alfa, beta y gamma proteobacterias, firmicutes y flavobacterias. Los géneros observados fueron: *Klebsiella*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter/Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Rhizobium*, *Labrys*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Flovobacterium*, *Achromobacter*, *Microbacterium* y *Methylobacterium*. La mayoría de los géneros han sido reportados capaces de realizar fijación biológica de nitrógeno, *Klebsiella* (Hardy et al. 1973, Shanmugam et al. 1975, Kennedy et al. 2004), *Raoultella* (Wurdig et al., 2007), *Stenotrophomonas* (Garbeva et al. 2001, Sun et al. 2008, Berg 2009, Vanieraki et al. 2011), *Rahnella* (Antoun y Prevost 2005, Martinez-Romero 2006, Podile y Kishore 2006), *Pseudomonas* (Yan et al., 2008), *Burkholderia* (Reis et al., 2004), *Bacillus* (Ding et al. 2005, Liu et al. 2006), *Enterobacter* (Grimont y Grimont 2006, Bhattacharjee et al. 2008, Shoebitz et al. 2009), *Pantoea* (Loiret et al., 2009), *Rhizobium* (Valverde et al., 2006), *Labrys* (Islam et al., 2007), *Flavobacterium* (Giri y Pati 2004, Xie y Yokota 2006), *Achromobacter* (Jha y Kumar, 2009), *Microbacterium* (Zinniel et al., 2002) y *Methylobacterim* (Jourand et al., 2004).

Los microorganismos endófitos encontrados pertenecen al grupo de las proteobacterias solamente, mientras que los microorganismos aislados de suelo rizosférico pertenecen a todos los grupos antes mencionados. Los géneros más abundantes son *Raoultella*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*, que fueron aislados de suelo, raíz y rizoma y de ambas subespecies. Entre los aislamientos de suelo además de los 3 géneros antes mencionados, se aislaron microorganismos de los géneros: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Rahnella* y *Rhizobium*. En raíz, además de los 3 géneros mencionados se aislaron una menor cantidad de géneros, observándose: *Bacillus*, *Rhizobium* y *Labrys*. En rizoma predominaron *Raoultella* y *Rahnella*, también se observaron: *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Como era de esperar se observaron una menor diversidad de géneros en raíz y rizoma que en suelo,

dado que seguramente no todos los géneros tienen la capacidad de colonizar tejido vegetal. La diversidad observada fue muy amplia y superior a la observada en otras gramíneas; Kirchhof et al. (1997) reportó en cuatro gramíneas (*Pennisetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* y *Spartina pectinata*) a las especies *Azospirillum lipoferum* y *Herbaspirillum seropedicae*. En comparación con el cultivo de arroz nuestros resultados son similares a las reportadas en la revisión de Mano y Morisaki (2008).

En estudios realizados por Sun et al. (2008) en arroz se observó mediante el análisis del gen 16S rRNA que *Stenotrophomonas* spp., fue la especie de diazotrofos endófitos que más se encontró. Gosal et al. (2011) observó que *Stenotrophomonas maltophila* era capaz de asociarse con trigo. Por otro lado, este género de diazotrofos es capaz también de asociarse con especies de angiospermas como *Populus* sp. como lo demostró Taghavi et al. (2009). Dado que *Stenotrophomonas maltophila* es capaz de asociarse con diversas especies vegetales, de confirmarse su capacidad de fijar nitrógeno asociada con *Paspalum dilatatum* mediante técnicas como la reducción de acetileno o N^{15} puede convertirse en una especie potencial para desarrollar inoculantes que beneficien la producción total de materia seca de esta y tal vez otras gramíneas.

El género *Enterobacter* también ha sido reportado como capaz de fijar nitrógeno asociado a gramíneas. Shoebitz et al. (2009) reporta la capacidad de fijar nitrógeno de *Enterobacter ludwigii* asociado con *Lolium perenne*, una gramínea forrajera.

Algunos aislamientos de suelo y raíz fueron identificados como la misma especie y la secuencia del 16S rRNA homologó con secuencias del GeneBank con el mismo número de acceso, por tanto se puede afirmar que se trata de la misma cepa que fue capaz de sobrevivir en el suelo rizosférico y colonizar el interior de la raíz. Este resultado se observó en los aislamientos identificados como *Raoultella terrigena* D13, D26, D36 de suelo cuya secuencia es idéntica a la de los aislamientos D355 de raíz y F203 de rizoma. Este hecho también se repite para la especie *Enterobacter ludwigii/cloacae* en un aislamiento de suelo de la subespecie *flavescens* (F404) y un aislamiento de raíz de la subespecie *dilatatum* (D315) y también se observó con *Stenotrophomonas maltophila* en un aislamiento de suelo (F45) y un aislamiento de raíz (F344) (Cuadro No. 13). Este aspecto resulta importante dado que es posible formular un inoculante con estos aislamientos porque son capaces de sobrevivir en suelo y colonizar el interior de la raíz de *Paspalum dilatatum*.

Cryseobacterium es un género que no ha sido reportado como fijador de nitrógeno. En este trabajo se obtuvieron dos aislamientos uno de la subespecie *dilatatum* y otro de la subespecie *flavescens* con perfil de restricción XII que fueron identificados como *Chryseobacterium* sp. El aislamiento D1, también con perfil de restricción XII fue *nifH* positivo. De confirmarse con estudios posteriores que estas bacterias son capaces

de fijar nitrógeno este sería el primer estudio en el cual se reportó el género *Cryseobacterium* como diazotrofo.

6 CONCLUSIONES

- *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* y *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* son capaces de asociarse con diazotrofos presentes en suelo, así como también con diazotrofos capaces de colonizar raíz y rizoma.
- Los recuentos de diazotrofos en medios selectivos sin nitrógeno mostraron que las poblaciones de diazotrofos asociadas a ambas subespecies son similares y de valores elevados, capaces de suministrar nitrógeno atmosférico de acuerdo con la bibliografía.
- Se formó una importante colección de microorganismos diazotrofos aislados de suelo rizosférico y endófitos de raíz y rizoma que constituye un importante germoplasma para futuros estudios.
- 18 de 103 aislamientos preseleccionados son *nifH* positivos. Afirmando así que *Paspalum dilatatum* está asociado con microorganismos capaces de crecer en medios sin N y de sintetizar la enzima nitrogenasa.
- La restricción del gen 16S rRNA con enzimas demostró una alta variabilidad genética dentro de la población de diazotrofos obtenida.
- En base a los perfiles de restricción encontrados se secuenciaron 39 aislamientos observándose que existe una amplia diversidad de géneros de diazotrofos asociados a *Paspalum dilatatum*.

7 RESUMEN

El nitrógeno constituye unos de los elementos más importantes para el desarrollo vegetal y frecuentemente se presenta como limitante del crecimiento vegetal. La mayor parte del N del suelo se encuentra en forma orgánica (98%), el cual no es asimilable por las plantas. El N₂ atmosférico no puede ser utilizado como tal por las plantas ni animales para producir moléculas organonitrogenadas. Sólo un grupo minoritario de procariontas, conocidos como diazotrofos o fijadores de N₂, pueden reducir el N₂ a NH₄⁺ mediante el proceso conocido como fijación biológica de N₂ (FBN). Existen diversos estudios que detectan FBN en varias gramíneas y determinan las especies de diazotrofos que se encuentran asociadas a ellas. En el caso de *P. dilatatum*, no existe información confirmada y dados los esfuerzos que se han realizado en la región para utilizar este recurso fitogenético, resulta particularmente relevante conocer las posibles asociaciones de esta especie con fijadores de nitrógeno. El objetivo de este trabajo fue comprobar la existencia de diazotrofos asociados a dos biotipos de *Paspalum dilatatum*, aislar y caracterizar bacterias fijadoras de N₂ rizosféricas y endófitas de ambos biotipos. Los recuentos en medios selectivos sin nitrógeno mostraron que las poblaciones de diazotrofos asociadas a los dos biotipos de *P. dilatatum* estudiados (*P. dilatatum* ssp. *dilatatum* y *P. dilatatum* ssp. *flavescens*) son elevadas. El número de diazotrofos presentes en suelo determinado mediante recuento de viables en placas varió entre 1,2 y 1,7 x10⁷ ufc/g suelo. Mientras que el número de diazotrofos presentes en raíces determinado mediante número más probable varió entre 4,4 x10⁵ y 3,0 x10⁶ diazotrofos/g de raíces. En general no existieron diferencias significativas en el número de diazotrofos asociados a las dos subespecies, únicamente se encontraron diferencias significativas entre las dos subespecies en la población de endófitos de raíz detectada utilizando el medio LGi. Se formó una colección de 601 aislamientos obtenidos de suelo rizosférico, raíces y rizoma de ambas subespecies de *P. dilatatum*. La caracterización genética demostró una elevada diversidad entre los diazotrofos ya se que identificaron 38 perfiles de restricción del gen 16S rDNA. La secuenciación parcial del gen 16S rDNA demostró que los diazotrofos aislados pertenecen a 17 géneros distintos, dentro de las alfa, beta y gamma protobacterias, firmicutes y flavobacterias. Los géneros observados fueron: *Klebsiella*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter/Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Rhizobium*, *Labrys*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Flovobacterium*, *Achromobacter*, *Microbacterium* y *Methylobacterium*. Los microorganismos endófitos encontrados pertenecen únicamente al grupo de las proteobacterias, mientras que los microorganismos aislados de suelo rizosférico pertenecen a todos los grupos antes mencionados. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de una población de diazotrofos asociados a la especie *Paspalum dilatatum*. Este resultado confirma la capacidad de *Paspalum dilatatum* de asociarse con bacterias capaces de fijar nitrógeno y plantea la posibilidad de su uso como promotores del crecimiento vegetal para optimizar el desempeño productivo de la gramínea a la que se encuentran asociadas o levantar limitantes productivas de las

mismas. La elevada flora diazotrófica encontrada justificaría un estudio cuantitativo de la FBN por parte de esta especie y su contribución a la producción de forraje.

Palabras clave: *Paspalum dilatatum*; Diazotrofos; Endófitos; Gen *nifH*; Gen 16S rDNA.

8 SUMMARY

Nitrogen is one of the most important elements for plant growth and is often presented as limiting plant growth. Most soil N is in organic form (98%), which cannot be assimilated by plants. Atmospheric N₂ can not be used as such by plants or animals to produce organonitrogenated molecules. Only a minority group of prokaryotes, called diazotrophs or N₂ fixers can reduce N₂ to NH₄⁺ by the process known as biological N₂ fixation (BNF). Several studies have detected FBN in several grasses and identified diazotrophic species that are associated with them. In the case of *Paspalum dilatatum*, no information has been reported and given the efforts that have been made in the region to use the genetic resources of this species, it is particularly important to understand its the possible association with nitrogen fixers. The aim of this work was to verify the existence of two biotypes associated diazotrophs of *P. dilatatum*, and isolate and characterize rhizospheric N₂-fixing bacteria and endophytes of both biotypes. Counts on selective media without nitrogen showed that populations of diazotrophs associated with both studied strains of *P. dilatatum* (*P. dilatatum* ssp. *dilatatum* y *P. dilatatum* ssp. *flavescens*) are high. The number of diazotrophs present in soil as determined by viable plate counts ranged from 1.2 to 1.7 x10⁷ cfu / g soil. While the number of diazotrophs present in roots determined by the most probable number and ranged from 3.0 x10⁶ to 4.4 x10⁵ diazotrophs/g of roots. Overall there were no significant differences in the number of diazotrophs associated with the two subspecies, the only significant differences between the two subspecies were detected in the population of root endophytes using the medium LGi. A collection of 601 isolates obtained from rhizospheric soil, roots and rhizomes of both subspecies of *P. dilatatum* was formed. Genetic characterization showed a high diversity among diazotrophs given that 16S rDNA 38 restriction profiles were identified. Partial sequencing of the 16S rDNA gene showed that the isolates belong to 17 distinct genera of diazotrophs including the alpha, beta and gamma-proteobacteria, firmicutes and flavobacteria. The genera observed were: *Klebsiella*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter* / *Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Rhizobium*, *Labrys*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Flovobacterium*, *Achromobacter*, *Microbacterium* y *Methylobacterium*. Endophytic microorganisms were found to belong only to proteobacteria, while rhizospheric soil contained isolates belonging to all the groups mentioned above. These results demonstrated the existence of a population of diazotrophs associated to both subspecies of *P. dilatatum*. This result confirms the ability of *several species of grasses* to associate with bacteria that fix nitrogen and raises the possibility of their use as plant growth promoters to optimize the productive performance of the grass which are associated or overcoming their productive limitations. The abundant diazotrophic flora reported here would justify a quantitative study of BNF by this species and its contribution to forage production.

Key words: *Paspalum dilatatum*; Diazotrophs; Endóphytes; Gen *nifH*; Gen 16S rDNA.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULINL, T. 1999. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *BaciMaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 961-967.
2. AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; BÅÅTH, E.; DOMÍNGUEZ, J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 2276-2281.
3. ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. 2005. PGPR'; biocontrol and biofertilization. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol and Biofertilization*. s.l., Springer. pp. 1-38.
4. AYALA, W.; CARÁMBULA, M. 1994. Nitrógeno en campo natural. *In*: Seminario de Actualización Técnica (1994, La Estanzuela, Colonia). Nitrógeno en pasturas. Montevideo, INIA. pp. 33-42 (Serie Técnica no. 51).
5. AZCÓN-BIETO; TALÓN. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid, Interamericana-McGraw-Hill. 522 p.
6. BEHLING, C.; BODDEY, R. 1987. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 Ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen-15-labeled Soil. *Agronomy Journal*. 79: 558-563.
7. BERG G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Microbiology Biotechnology*. 84:11–18.
8. BHARATHKUMAR, S.; RAMESHKUMAR, N.; PAUL, D.; PRABAVATHY, V.; NAIR, S. 2008. Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism (SSCP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 387–394.
9. BHATTACHARJEE, R.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes; prospects and

challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80:199–209.

10. BODDEY, R.; CHALK, P.; VICTORIAB, R.; MATSUIB, E. 1983. The ¹⁵N-isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. *Soil Biology and Biochemistry*. 15: 25-32.
11. _____.; JANTALIA, C.; ZOTARELLI, L.; OKITO, A.; ALVES, B.; URQUIAGA, S. 2008. Techniques for the quantification of plant associated biological nitrogen fixation. In: International Nitrogen Fixation Congress (15th.), International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (12th., 2007, Cape Town). Biological nitrogen fixation; towards poverty alleviation through sustainable agriculture, proceedings. s.l., Springer. pp. 37-41 (*Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* no. 42).
12. BOTTOMLEY, P. MYROLD, D. 2007. Biological N inputs. In: Paul, E. ed. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*. 3rd. ed. Burlington, Academic Press. pp. 367-386.
13. BÜRGMANN, H.; MEIER, S.; BUNGE, M.; WIDMER, F.; ZEYER, J. 2004. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environmental Microbiology*. 7: 1711–1724.
14. _____.; WIDMER, F.; VON SIGLER, W.; ZEYER, J. 2005. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 240-247.
15. CAMPBELL, N.; REECE, J. 2005. *Biología*. Madrid, Editorial Médica Panamericana. 763 p.
16. CARÁMBULA, M. 2007. *Pasturas y forrajes*. Montevideo, Hemisferio Sur. 357 p.
17. CHAN, M.; JONGSUN, K. 1993. The nitrogenase FeMo cofactor and P-cluster pair; 2.2 Å resolution structures. *Science*. 260: 792-794.
18. CHOWDHURY, S.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; TRIPATHI, A. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community

associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar desert, India. *Microbial Ecology*. 54: 82–90.

19. COCKING, E. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*. 252: 169–175.
20. COELHO, M.; MARRIEL, I.; JENKINS, S.; LANYON, C.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A. 2009. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*. 42: 48–53.
21. CORNAGLIA, P. 2003. El pasto miel; características adaptativas. Consideraciones para lograr una implantación exitosa. *Revista Argentina de Producción Animal*. 3-4: 143-146.
22. DALTON, D.; KRAMER, S. 2006. *Plant-associated bacteria*. s.l., Springer. pp. 105–130.
23. DAY, J.; NEVES, M.; DÖBEREINER, J. 1975. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. *Soil Biology and Biochemistry*. 7: 107-112.
24. DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; CHEN, S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 1271–1281.
25. DOBEREINER, J.; DAY, J.; DART, P. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology*. 71: 103-116.
26. _____.; BALDANI, V.; BALDANI, J. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. Brasilia, Brazil, MAARA-EMBRAPA-CNPAB. 60p.
27. EDEN, P.; SCHMIDT, T.; BLAKEMORE, R.; PACE, N. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 41:324–325.
28. FORMOSO, F. 2003 Importancia de *Paspalum dilatatum* en Uruguay. *Revista*

Argentina de Producción Animal. 3-4: 143-146.

29. FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 1: 35–59.
30. FRIONI, L. 2006. Microbiología; básica, ambiental y agrícola. Montevideo, Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 464 p.
31. GARBEVA, P.; OVERBEEK, L.; VUURDE, J.; ELSAS, J. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbiology Ecology Journal*. 41:369-383.
32. GARRIDO, M.; CÁRDENAS, D.; BONILLA, R.; BALDANI, V. 2010. Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas. *Pastos y Forrajes*. 33: 1-11.
33. GILLER, K. 1987. Use and abuse of the acetylene reduction assay for measurement of “associative” nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*. 19: 783-784.
34. GIRI, S.; PATIB, A. 2004. Comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 51: 47–56.
35. GOSAL, S.; SAROA, G.; VIKAL, Y.; CAMEOTRA, S.; PATHANIA, N.; BHANOT, A. 2011. Isolation and molecular characterisation of diazotrophic growth-promoting bacteria from wheat rhizospheric soils of Punjab. *Soil Research* 49: 725-732.
36. GRIMONT, F.; GRIMONT, P. 2006. The Genus *Enterobacter*. In: Dworkin, M; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.; Stackebrandt, E. eds. *Prokaryotes*. Minneapolis, Springer. pp. 197–214.
37. HARDY, R.; BURNS, R.; HOLSTEN, R. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and*

Biochemistry. 5: 47-81.

38. HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*. 106: 169–178.
39. IRISARRI, P.; GONNET, S.; MONZA, J. 2008. Fijación de nitrógeno por cianobacterias y fertilización en arroz. Montevideo, INIA. 27 p. (FPTA no. 21).
40. ISLAM, M.; KAWASAKI, H.; NAKAGAWA, Y.; HATTORI, T.; SEKI, T. 2007. *Labrys okinawensis* sp. nov. and *Labrys miyagiensis* sp. nov., budding bacteria isolated from rhizosphere habitats in Japan, and emended descriptions of the genus *Labrys* and *Labrys monachus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 552–557.
41. ISLAM, R.; TRIVEDI, P.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; LEE, G.; YANG, J.; KIM, Y.; KIM, M.; HAN, G.; CHAUHAN, P.; SA, T. 2010. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment. *Biology and Fertility of Soils*. 46:261–269.
42. JHA, P.; KUMAR, A. 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbiology Ecology Journal*. 58:179–188.
43. JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BÉNA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2269–2273.
44. KARL, D.; LETELIER, R.; TUPAS, L.; DORE, J.; CHRISTIAN, J.; HEBEL, D. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature*. 388: 533- 538.
45. KENNEDY, I.; CHOLUDHURY, A.; KECSKÉS, M. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for

plant growth promotion be better exploited?. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1229-1244.

46. KENNETH, T. 2000. Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias. Madison, WI, University of Wisconsin. s.p.
47. KIRCHHOF, G.; REIS, V.; BALDANI, J.; ECKERT, B.; D'OBBEREINER, J.; HARTMANN, A. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*. 194: 45–55.
48. KOLB, W.; MARTIN, P. 1988. Influence of nitrogen on the number of N₂-fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. 20: 211-225.
49. LAWSON, A.; KELLY, K.; STOCKDALE, C. 2003. Management and role of *Paspalum* in irrigated pastures in northern Victoria, Australia. *Revista Argentina de Producción Animal*. 3-4: 143-146.
50. LINDBERG, T.; GRANHALL, U. 1984. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of temperate cereals and forage grasses. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 683-689.
51. LIU, X.; ZHAO, H.; CHEN, S. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*. 52: 186–190.
52. LOIRET, F.; GRIMM, B.; HAJIREZAEI, M.; KLEINER, D.; ORTEGA, E. 2009. Inoculation of sugarcane with *Pantoea sp.* increases amino-acid contents in shoot tissues; serine, alanine, glutamine and asparagine permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of the bacterium. *Journal of Plant Physiology*. 166: 1152—1161.
53. MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2000. *Biology of microorganisms*. 9th. ed. Carbandale, Prentice Hall. 1098 p.
54. MANO, H.; MORISAKI, H. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environmental*. 23: 109-117.
55. MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Dinitrogen-fixing Prokaryotes. In: Dworkin,

M; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.; Stackebrandt, E. eds. Prokaryotes. Minneapolis, Springer. pp. 793-817.

56. MAYNARD, R.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P. 1994. Mo-independent nitrogenase 3 is advantageous for diazotrophic growth of *Azotobacter vinelandii* on solid medium containing molybdenum. *Journal of Bacteriology*. 176: 5583-5586.
57. MAYZ-FIGUEROA, J. 2004 Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*. 4: 1-20.
58. MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils*. 45: 253–263.
59. _____.; RODRÍGUEZ BLANCO, A.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*. 58: 21– 28.
60. MONZA, J.; MARQUEZ A. 2004. El metabolismo del nitrógeno en plantas. Córdoba, Almuzara. 176 p.
61. PARIONA-LLANOS, R.; IBAÑEZ DE SANTI FERRARA, F.; SOTO GONZALES, H.; RAMOS BARBOSA, H. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *European Journal of Soil Biology*. 46: 387-393.
62. PODILE, A.; KISHORE, A. 2006. Plant-associated bacteria. Plant growth-promoting rhizobacteria. Amsterdam, Springer. 195-230.
63. PUNSCHKE, K.; MAYANS, M. 2011. Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia*. 15:19-26.
64. REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:435–443.

65. REIS, V.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, S.; BALDANI, V.; SCHMID, M.; BALDANI, J.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2155–2162.
66. RENGEL, Z. 1997. Root exudation and microflora population in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant and Soil*. 196: 255-260.
67. RIBBE, M.; GADKARI, D.; MEYER, O. 1997. N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 26627–26633.
68. RODICIO, M.; MENDOZA, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 22: 238-45.
69. ROESCH, L.; OLIVARES, F.; PEREIRA, L.; SELBACH, P.; SACCOL DE SÁ, E.; OLIVEIRA DE CAMARGO, F. 2006. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 967–974.
70. ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Bacterial endophytes and their interacciones with host. *The American Phytopathological Society*. 8: 827-837.
71. ROTHBALLER, M.; SCHMI, M.; HARTMANN, A. 2009. Diazotrophic bacterial endophytes in *gramineae* and other plants. *Microbiology Monographs*. 8: 273–302.
72. RUIZ, B.; CAMPOS, J.; BEHRENS, N. 2008. Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. *Educación Química*. 19: 34-41.

73. SHANMUGAN, K.; CHAN, I.; MORANDI, C. 1975. Regulation of nitrogen fixation. Nitrogenase-derepressed mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 408: 101-111.
74. SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C.; PARDO, M.; CANTORE, M.; CIAMPI, L.; CURA, J. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 1768–1774.
75. SPERANZA, P. 2005. Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomíticas; lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia*. 1-2: 73-76.
76. _____. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*. s.p.
77. SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbiology Ecology Journal*. 55:415–424.
78. TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A.; WEYENS, N.; BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 748–757.
79. TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. *Environmental Microbiology*. 5: 1009–1015.
80. TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. 2012. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) growth by 15-N isotope dilution and identification of associated endophytic diazotrophs. *Plant and Soil*. 356: 35-49.
81. UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. 1995. Genetic diversity of N₂ fixing bacteria associated with rice roots by molecular

- evolutionary analysis of a *nifD* library. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 235–240.
82. VALVERDE, A.; IGUAL, J.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2631–2637.
83. VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. 2011. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbiology Ecology Journal*. 61:277–285.
84. WARD, D.; WELLER, R.; BATESON, M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganism in a natural community. *Nature*.345: 63-65.
85. WEIER, K. 1980a. Nitrogen fixation associated with grasses. *Tropical Grasslands*. 4: 194-201.
86. _____. 1980b. Nitrogenase activity associated with three tropical grasses growing in undisturbed soil cores. *Soil Biology and Biochemistry*. 12. 131-136.
87. WEISBURG, W.; BARNS, S.; PELLETIER, D.; LANE, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 2: 697-703.
88. WRIGHT, S.; WEAVER, R. 1981. Enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria from forage grass roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 1: 97-101.
89. WURDIG ROESCH, L.; PEREIRA, L.; MENEZES, F.; TRIPLETT, E.; OLIVEIRA, F. 2007. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 1:1367-1380.
90. XIE, C.; YOKOTA, A. 2006. Reclassification of *Flavobacterium ferrugineum* as *Terrimonas ferruginea* gen. nov., comb. nov., and description of

Terrimonas lutea sp. nov., isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56: 1117–1121.

91. YAEGER, C.; KORNOSKY, J.; HOUSMAN, D.; GROTE, E.; BELNAP, J.; KUSKE, C. 2003. Diazotrophic community structure in function in two successional stages of biological soils crusts from the Colorado plateau and Chihuahua desert. Applied and Environmental Microbiology. 70: 973-983.
92. YAN, Y.; YANG, J.; DOU, Y.; CHEN, M.; PING, S.; PENG, J.; LU, W.; ZHANG, W.; YAO, Z.; LI, H.; LIU, W.; HE, S.; GENG, L.; ZHANG, X.; YANG, F.; YU, H.; ZHAN, Y.; LI, D.; LIN, Z.; WANG, Y.; ELMERICH, C.; LIN, M.; JIN, Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. PNAS. 105: 7564-7569.
93. ZANI, S.; MELLON, M.; COLLIER, J.; ZHER, J. 2000. Expression of *nifH* genes in natural assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3119-3124.
94. ZINNIEL, D.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.; VIDAVER, A. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology. 68: 2198–2208.
95. ZUBERER, D. 1998. Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic. In: Sylvia, D.; Fuhrmann, J.; Hertel, P.; Zuberer, D. eds. Principles and applications of soil microbiology. New York, Prentice Hall. pp. 295-320.

10 ANEXOS

- Medios selectivos para diazotróficos.

Medios sólidos:

ASHBY:

	g/l
Sacarosa/Manitol	5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,2
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,005
NaCl	0,2
CaCl . 2 H ₂ O	0,2
Agar	15
pH	7,0

LG.

	g/l
Sacarosa	20
K ₂ HPO ₄	0.05
KH ₂ PO ₄	0.15
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.011
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.002
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0.016
CaCO ₃	1.0
Azul Bromotinol (0,5% en etanol)	2.0 ml
Agar	15
Agua destilada	1000

pH	6.8 (color verde)
----	-------------------

Medios Semisólidos:

LGI:

	g/l
Sacarosa	5
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.6
NaCl	0.2
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.0023
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.002
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0.017
Sol Azul de bromotinol 0,5% en 0.2N KOH	5 ml
pH	6 (con ácido acético al 1%)
Agar	6

jNFb:

	g/l
Acido Málico	5
KH ₂ PO ₄	1.5
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2
NaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.012
Fe EDTA	0.066
Sol. Elementos mínimos	2 ml
Sol vitamina	1 ml
Sol Azul de bromotinol 0,5% en 0.2N KOH	2 ml
pH	6
Agar	6

Solucion de elementos mínimos: 0.40 g CuO₄S . 5 H₂O ; 0.12 g ZnSO₄ . 7 H₂O ; 1.40 g H₃BO₃ ; 1.00 g Na₂MoO₄ . 2 H₂O ; 1.50 g MnSO₄ . H₂O

En 1000 ml de agua destiada