



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Cátedra de Microbiología Agrícola

Facultad de Agronomía – UBA

Inoculación de trigo y maíz con cepas experimentales de *Azospirillum brasilense* a campo. Evaluación de parámetros agronómicos y del efecto sobre las comunidades microbianas nativas.

Ing. Agr. Lic. Luciana Paula Di Salvo

Directora: Dra. M. Sc. Ing. Agr. Inés E. García de Salamone

Co-directora: Dra. Qca. Fca. Ana Fernández Scavino

Consejero de Estudios: Dr. Alberto A. Gurni

Año 2015

A mis padres,

...por enseñarme el valor del trabajo, la constancia y el sacrificio, entre otros...

A Sebastián, mi esposo,

...por su paciencia, apoyo y acompañamiento...

Esta tesis doctoral, si bien no es el final del camino, constituye el resultado de un gran trabajo, esfuerzo y crecimiento. Asimismo, es el fruto de una travesía en la que muchas personas e instituciones han dado su apoyo para que pueda realizarse. Intentaré representar a todas ellas, aunque mi gratitud no se reduce a esta lista.

En primer lugar, agradezco a la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, que han favorecido y apoyado este tiempo de estudio e investigación.

Agradezco también a la Facultad de Farmacia y Bioquímica y a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, el contexto para mi formación como docente e investigadora. Un agradecimiento particular a la Cátedra de Microbiología de la FAUBA.

Valoro los aportes de la Dra. Ana Fernández Scavino (Facultad de Química, UDELAR), la Dra. Lucía Ferrando (Facultad de Química, UDELAR), la Dra. Katia Teixeira (EMBRAPA Agrobiología), la Dra. Rosalba Esquivel-Cote (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México), la Dra. María Alejandra Pereyra (Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP), que me brindaron orientación durante la realización de este trabajo. Por la calidad del saber profesional compartido, por el valor de sus palabras y la sensatez y honestidad de sus consejos.

Agradezco a los alumnos, muchos de ellos ya profesionales o algunos a punto de serlo, que han participado en los ensayos de campo y en el trabajo de laboratorio, Ing. Agr. Patricio Perdoménico, Lic. Florencia D'Auria, Ing. Agr. Gabriel Cellucci, Srta. Carolina Nardini, Srta. Eugenia Carlino, Sr. Pedro Radio Brandoni, y al personal de los establecimientos La Aurora (Villa Moll, Bs. As.), El Correntino (30 de Agosto, Bs. As.) y El Coronel (Pehuajó, Bs. As.), cuya colaboración a sido fundamental para la realización de este proyecto.

Quiero recordar, fundamentalmente, el valor y apoyo de mi familia y amigos. En particular a mi esposo, porque mis logros no hubiesen sido tales sin su apoyo durante todos estos años, por lo que también son merecidamente suyos. Gracias por tantos días juntos y por soñar por tantos y tanto más.

Finalmente, a mi directora, la Dra. Inés García de Salamone. Gracias por todos estos años de trabajo y de aprendizaje, en muchos casos mutuo. Gracias por exigirme, por confiar en mí y darme oportunidades para crecer.

...Gracias a todos y a cada uno...!

Índice de contenidos	
Dedicatoria y agradecimientos.....	02
Índice de contenidos.....	03
Índice de tablas.....	04
Índice de figuras.....	05
Listado de abreviaturas.....	09
Resumen.....	10
Capítulo 1. Introducción.	
1.1. Revisión bibliográfica.....	12
1.2. Objetivos e hipótesis.....	17
Capítulo 2. Metodologías aplicadas en ensayos a campo.	
2.1. Descripción general de los ensayos a campo y método de obtención de muestras.....	19
2.2. Determinaciones de parámetros agronómicos.....	20
2.3. Determinaciones microbiológicas de la rizósfera	
2.3.1. Recuentos de grupos microbianos.....	21
2.3.2. Micorrización natural.....	21
2.3.3. Diversidad funcional de comunidades rizosféricas.....	23
2.3.4. Diversidad estructural de comunidades rizosféricas.....	23
2.4. Análisis estadísticos.....	25
Capítulo 3. Caracterización de cepas de <i>Azospirillum brasilense</i>.	
3.1. Introducción.....	26
3.2. Metodología.....	29
3.3. Resultados y discusión	
3.3.1. Evaluación del crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	33
3.3.2. Actividad PGP <i>in vitro</i>	35
3.3.3. Análisis de los CLPP.....	39
3.3.4. Perfiles de FAME.....	43
3.3.5. Secuenciación del gen <i>nifH</i>	45
Capítulo 4. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada en cultivo de trigo.	
4.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.....	47
4.2. Resultados y discusión.....	48
Capítulo 5. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada y fosforada en cultivo de trigo.	
5.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.....	57
5.2. Resultados y discusión.....	58
Capítulo 6. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada en cultivo de maíz.	
6.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.....	74
6.2. Resultados y discusión.....	75
Capítulo 7. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada y fosforada en cultivo de maíz.	
7.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.....	84
7.2. Resultados y discusión	
7.2.1. Ensayo de evaluación de inoculación y fertilización fosforada.....	85
7.2.2. Ensayo de evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada.....	90
Capítulo 8. Discusión general y conclusiones.....	95
Referencias bibliográficas.....	137
Anexo 1.....	178
Anexo 2.....	186
Hoja de Firmas.....	191

Índice de tablas

Tabla 3.1. Producción de compuestos indólicos y actividad ACC desaminasa <i>in vitro</i> de las cinco cepas de <i>Azospirillum brasilense</i>	37
Tabla 3.2 Valores de absorbancia (590 nm) de las fuentes de carbono (C) utilizadas por las cinco cepas de <i>Azospirillum brasilense</i> en diferentes tiempos de incubación.....	42
Tabla 3.3 Composición de ácidos grasos celulares de las cinco cepas de <i>Azospirillum brasilense</i>	44
Tabla 4.1. Colonización radical y estructuras de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires.....	52
Tabla 4.2. Colonización radical y estructuras de de hongos micorrícicos arbusculares presentes en raíces de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano.....	52
Tabla 5.1. Recuento de microorganismos microaerofílicos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	64
Tabla 5.2. Biomasa aérea y radical en dos estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	64
Tabla 5.3. Colonización radical y estructuras de de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	68
Tabla 6.1. Biomasa aérea y radical en dos estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires.....	78
Tabla 6.2. Recuento de microorganismos microaerofílicos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires..	79
Tabla 6.3. Colonización radical y estructuras de de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires.....	83
Tabla 7.1. Biomasa aérea en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	87
Tabla 7.2. Recuento de microorganismos microaerofílicos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	87
Tabla 7.3. Biomasa aérea en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	91
Tabla 7.4. Recuento de microorganismos microaerofílicos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.....	91
Tabla 8.1. Costos de los fertilizantes e inoculantes aplicados en cada uno de los ensayos realizados. Elaborado en base a datos de Mayo de 2013 (Fuente: Agromercado, 2013).....	96
Tabla 8.2 Valores de absorbancia (590 nm) de las fuentes de carbono (C) utilizadas por las cinco cepas de <i>Azospirillum brasilense</i> a las 72 horas de incubación.....	119

Índice de figuras

Figura 3.1 Imágenes de morfología de colonias y crecimiento en forma de película típica en algunos de los medios de cultivos evaluados.....	38
Figura 3.2 Análisis discriminante de los CLPP de las cinco cepas evaluadas de <i>Azospirillum brasilense</i>	41
Figura 3.3 Número de fuentes de carbono (C) utilizadas por las cinco cepas evaluadas de <i>Azospirillum brasilense</i>	41
Figura 3.4 Análisis discriminante de los perfiles FAME de las cinco cepas evaluadas de <i>Azospirillum brasilense</i>	45
Figura 4.1. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de encañazón, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	50
Figura 4.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	50
Figura 4.3 Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	51
Figura 4.4 Análisis discriminante de los perfiles estructurales (T-RFLP) de las comunidades microbianas de rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en dos estados diferentes del cultivo.....	53
Figura 4.5 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) más abundantes obtenidos con la enzima de restricción <i>MspI</i> , para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires.....	54
Figura 4.6 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) más abundantes obtenidos con la enzima de restricción <i>HhaI</i> , para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires.....	55
Figura 4.7 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) obtenidos con la enzima de restricción <i>MspI</i> , para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires. Los fragmentos representados en la figura son los que fueron indicados por el análisis discriminante como los más importantes para diferenciar comunidades.....	55
Figura 5.1. Rendimiento de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados.....	59
Figura 5.2. Rendimiento de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	60

Figura 5.3. Número de granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados.....	61
Figura 5.4. Número de granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	61
Figura 5.5. Peso de 1000 granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados.....	62
Figura 5.6. Peso de 1000 granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	62
Figura 5.7. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, a la cosecha, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados.....	63
Figura 5.8. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, a la cosecha, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	63
Figura 5.9. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	65
Figura 5.10. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado.....	65
Figura 5.11. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada.....	66
Figura 5.12. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada.....	66
Figura 5.13. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada.....	67
Figura 5.14. Densidad de longitud radical de plantas de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación.....	69
Figura 5.15. Densidad de longitud radical de plantas de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas, para cada nivel de fertilización fosforada.....	69

Figura 5.16. Porcentaje de arbusculos presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función del tratamiento de inoculación, las dosis de fertilizante nitrogenado y las dosis de fertilizante fosforado aplicados.....	70
Figura 5.17. Porcentaje de vesículas presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas, para cada nivel de fertilización fosforada.....	70
Figura 5.18. Porcentaje de colonización de las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación.....	71
Figura 5.19. Porcentaje de colonización de las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada dosis de fertilizante nitrogenado.....	72
Figura 5.20. Porcentaje de arbusculos presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación.....	72
Figura 6.1. Rendimiento de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas.....	77
Figura 6.2. Rendimiento de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en función de los niveles de inoculación aplicados.....	77
Figura 6.3. Biomasa aérea de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de R3, para cada nivel de inoculación aplicado.....	78
Figura 6.4. Recuentos de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y fijadores microaerofílicos de N ₂ (MFN) en la rizósfera del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, para cada nivel de fertilización nitrogenada aplicado.....	79
Figura 6.5. Recuentos de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y fijadores microaerofílicos de N ₂ (MFN) en la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de R3, para cada nivel de inoculación aplicado.....	79
Figura 6.6. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	80
Figura 6.7. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	81
Figura 6.8. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	82
Figura 7.1. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada.....	88

Figura 7.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada.....	88
Figura 7.3. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada.....	89
Figura 7.4. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	92
Figura 7.5. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	92
Figura 7.6. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada.....	93
Figura 8.1. Análisis de componentes principales de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes ensayos y estados ontogénicos de los cultivos de maíz y trigo.....	121
Figura 8.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes ensayos y estados ontogénicos de los cultivos de maíz y trigo.....	123
Figura 8.3. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes tratamientos de inoculación aplicados en los ensayos.....	124
Figura 8.4. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes tratamientos de fertilización aplicados en los ensayos.....	124

Listado de abreviaturas

ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AIA	ácido indolacético
ARA	ensayo de reducción de acetileno, según sigla en inglés
AWCD	desarrollo de color promedio, según sigla en inglés
C	carbono
CLPP	perfiles fisiológicos de las comunidades, según sigla en inglés
DDS	días desde siembra
ECL	longitud equivalente de cadena, según sigla en inglés
EUF	eficiencia de uso de fertilizante
FBN	fijación biológica de nitrógeno atmosférico
FAME	metil-ésteres de los ácidos grasos, según sigla en inglés
<i>H'</i>	índice de diversidad de Shannon-Weaver
HFMA	hongos formadores de micorrizas arbusculares
IC	índice de cosecha
MFN	(microorganismos) microaerofílicos fijadores de nitrógeno atmosférico
MHB	bacterias colaboradoras ("helper") de las micorrizas, según sigla en inglés
N	nitrógeno
NMP	número más probable
P	fósforo
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la enzima polimerasa, según sigla en inglés
PGP	promoción del crecimiento vegetal, según sigla en inglés
PGPR	rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, según sigla en inglés
SF	solución fisiológica
SPT	superfosfato triple
T-RF	tamaño de fragmento de restricción, según sigla en inglés
T-RFLP	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal, según sigla en inglés
UFC	unidades formadoras de colonias

Resumen

Es ampliamente conocido que las diferentes estrategias de manejo de cultivos aplicadas en la producción agrícola pueden modificar la biodiversidad microbiana. Sin embargo, los efectos de la aplicación de fertilizantes e inoculantes formulados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de campo sobre las comunidades microbianas nativas no son completamente conocidos. El objetivo general de este trabajo fue generar conocimiento sobre la ecología microbiana rizosférica y sobre las variables agronómicas de los cultivos de trigo y maíz cuando se aplican fertilizaciones químicas e inoculantes de ciertas cepas de *Azospirillum brasilense* en condiciones de campo. Para ello se llevaron a cabo experimentos de trigo y maíz independientes entre sí, en diferentes campañas agrícolas y en diferentes establecimientos productivos de la provincia de Buenos Aires. Se determinó producción de biomasa aérea y radical de los cultivos, rendimiento y sus componentes, y densidad de longitud total de raíces. Se realizaron los recuentos de microorganismos MFN, celulolíticos y nitrificadores, pertenecientes a los ciclos biogeoquímicos del C y del N. Se realizó la caracterización y cuantificación de la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas rizosféricas, mediante los CLPP y mediante análisis de T-RFLP del gen 16S ARNr, respectivamente. Asimismo, se realizó la caracterización morfológica y fisiológica de las cepas de *A. brasilense* utilizadas en los ensayos a campo y de algunos de sus mecanismos de PGP en condiciones *in vitro*, todo ello en comparación con cepas patrón de *A. brasilense*. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y contraste de medias, y mediante métodos de análisis multivariado, según correspondiese. El presente trabajo no sólo evalúa los efectos de las prácticas de fertilización e inoculación con *A. brasilense* sobre los parámetros agronómicos de los cultivos de trigo y maíz, sino también sobre las comunidades microbianas rizosféricas nativas. Considerando el rol preponderante de los microorganismos del suelo en la mayor parte de los procesos ecosistémicos, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte significativo al conocimiento científico. De las respuestas obtenidas en rendimiento, biomasa aérea, densidad de longitud radical y EUF resultan evidentes las ventajas de los inoculantes combinados respecto a los inoculantes monocepa. La inoculación con *A. brasilense* 40M y 42M no generó efecto alguno sobre las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a los ciclos de C o del N. Además, si bien dicha inoculación generó modificaciones en las comunidades microbianas rizosféricas, éstas fueron de menor magnitud que las observadas a lo largo del ciclo del cultivo y entre cultivos diferentes. Entre

estados ontogénicos se registraron diferencias en el índice H' determinado a partir de los datos de los perfiles funcionales pero no en el índice H' determinado a partir de los datos de los perfiles estructurales. Se observó que la aplicación del inoculante formulado con ambas cepas de *A. brasilense* redujo parcialmente los efectos negativos de la fertilización fosforada sobre el desarrollo de la micorriza arbuscular nativa. El conocimiento obtenido permite brindar herramientas para mejorar la respuesta de los cultivos a la inoculación con *A. brasilense* en interacción con fertilización y para caracterizar el riesgo ambiental de ambas prácticas agronómicas. En esta tesis se ha generado información científica capaz de conectar procesos que ocurren en la porción aérea del sistema con procesos que tienen lugar en la porción subterránea. Esto tiene implicancias tanto académicas como productivas y ambientales, y resulta directamente transferible a asesores y productores agropecuarios, bajo el actual paradigma de una producción agrícola más sustentable.

Capítulo 1. Introducción.

1.1. Revisión bibliográfica.

El suelo constituye la mayor reserva de C del planeta, por lo que cualquier alteración en la misma que genere una disminución en el C almacenado, provoca una disminución en la calidad del suelo (Doran y Zeiss, 2000) y afecta el balance global de C, favoreciendo el cambio climático (Arias *et al.*, 2005). En relación a esto, la degradación de la materia orgánica del suelo constituye uno de los impactos negativos de la actividad agrícola (Doran y Zeiss, 2000). El conjunto de prácticas agrícolas conocida como siembra directa, cuyo objetivo es la producción de cultivos con un movimiento mínimo del suelo, y la inclusión de mayor cantidad de cultivos de gramíneas en la rotación, colaboran para obtener un balance positivo de nutrientes y el uso eficiente de los recursos del sistema suelo-planta. De esta manera se reducen los procesos degradativos de la calidad del suelo (Díaz Zorita *et al.*, 2002; Sisti *et al.*, 2004), y se contribuye a una mayor sostenibilidad ambiental de la producción agrícola (Altieri y Nicholls, 2000; Tilman *et al.*, 2002).

Dentro del esquema de rotación del cultivos comúnmente utilizado se encuentran el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el maíz (*Zea mays* L.), ambos pertenecientes a la familia de las Gramíneas. Estos cereales, junto al arroz, proveen más del 60% de las calorías de la dieta humana, por consumo directo o indirecto a través de la alimentación del ganado y la obtención de subproductos (FAOSTAT, 2012). Junto a las oleaginosas soja y girasol, el trigo y el maíz constituyen los principales cultivos de la región pampeana, en donde se observan los mayores rendimientos (Díaz Zorita *et al.*, 2002).

El aumento del rendimiento de los cultivos, basado en el mejoramiento vegetal de los mismos y en la aplicación de altas dosis de fertilizantes de síntesis química, representa una práctica onerosa que puede generar impactos ambientales negativos para el ecosistema (Tilman *et al.*, 2002). Es por ello que resulta importante buscar y mejorar las prácticas agronómicas tendientes a aumentar y mantener los altos niveles productivos de manera más sostenible (Altieri y Nicholls, 2000; Tilman *et al.*, 2002). Algunos autores han propuesto que luego de la revolución verde, la cual se basó en la combinación del mejoramiento vegetal y el uso de fertilizantes y agroquímicos para aumentar el rendimiento de los cultivos (Tilman, 1999), el aprovechamiento de los microorganismos edáficos podría constituir la “nueva revolución verde”, basada en el incremento de rendimiento mediante el conocimiento y la utilización de los microorganismos benéficos del suelo (Den Herder *et al.*, 2010;

Gewin, 2010), entre otras estrategias (Aeron *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta la estrecha relación entre un genotipo vegetal y la comunidad microbiana que se establece en su rizósfera en un ambiente dado (Cummins, 2009), el mejoramiento vegetal de los cultivos deberá también tener en cuenta funciones benéficas de los microorganismos rizosféricos (Bakker *et al.*, 2012; Rani y Goel, 2012).

Uno de los principales grupos de microorganismos beneficiosos claves para la sustentabilidad de los agroecosistemas son los hongos formadores de micorrizas (Barea, 2004; Johansson *et al.*, 2004). La compleja relación simbiótica entre las hifas de estos hongos y las raíces de una planta huésped se denomina micorriza (Koide y Mosse, 2004). Dentro de los diversos grupos de micorrizas, las del tipo arbusculares se encuentran presentes en la mayoría de las plantas silvestres y cultivadas (Koide y Mosse, 2004). Los HFMA pertenecen al *phylum* Glomeromycota, clase Glomeromicetes, e incluyen varios géneros pertenecientes a diferentes familias (Redecker *et al.*, 2013). Se caracterizan por la producción a lo largo de su ciclo de vida de estructuras típicas denominadas arbusculos, esporas y, en algunos casos, vesículas (Peterson y Massicotte, 2004). Los HFMA aumentan el área explorada por las raíces, incrementan la absorción de nutrientes del suelo (Richardson *et al.*, 2009), aumentando la eficiencia de uso de los recursos disponibles (Koide y Mosse, 2004; Ribeiro y Saggin-Júnior, 2004), y favorecen la agregación del suelo (Rillig *et al.*, 2002), siendo esta asociación planta-microorganismo importante para el buen funcionamiento del agroecosistema (Barea *et al.*, 2002; Jeffries *et al.*, 2003). Los HFMA son biótrosos obligados (Barea *et al.*, 2005) y, si bien actualmente se encuentran inoculantes formulados con éstos en el mercado, tanto su calidad como su efectividad no han podido ser aún correctamente demostradas (Alten *et al.*, 2002). Por todo esto, en la actividad agrícola, la inoculación con HFMA no es una práctica habitual. Sin embargo, dado que éstos se encuentran presentes en la mayoría de los ecosistemas (Koide y Mosse, 2004; Malusá *et al.*, 2012) y debido a su importancia dentro de los mismos, la cuantificación de la micorrización natural constituye un índice de calidad de suelos (Jeffries *et al.*, 2003; García de Salamone *et al.*, 2006).

Las gramíneas son capaces de asociarse con diversas especies de bacterias benéficas, comúnmente llamadas PGPR. Estas bacterias constituyen otro de los principales grupos de organismos beneficiosos en los sistemas suelo-planta (Barea, 2004). Asociadas a las plantas de cultivo, las PGPR producen efectos benéficos directos e indirectos sobre el crecimiento vegetal

(Pliego *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2010), mediante la producción de sustancias indólicas (Pedraza *et al.*, 2004), citoquininas (García de Salamone *et al.*, 2001) y sideróforos (Pedraza *et al.*, 2007), inhibiendo la síntesis de etileno (Glick, 1995), y mejorando la nutrición fosforada y nitrogenada, mediante la solubilización y la FBN, respectivamente (Kennedy *et al.*, 2004; García de Salamone *et al.*, 1990; 1996; Sarig *et al.*, 1990; Freitas *et al.*, 1997). En la producción agrícola, la inoculación con PGPR resulta una alternativa económica y ecológica que se está difundiendo local e internacionalmente (Bashan *et al.*, 2004; Caballero-Mellado, 2004; Cassán y García de Salamone, 2008; Lucy *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2010). La inoculación con PGPR permite aumentar la producción de los cultivos en forma sostenible (García de Salamone, 2011; Vessey, 2003), mejorando la eficiencia en el uso de los fertilizantes de síntesis química aplicados (Caballero-Mellado, 2004; Hayat *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2004).

Dentro del grupo de PGPR se encuentra el género *Azospirillum* el cual, en asociación con plantas, pueden fijar N (García de Salamone *et al.*, 1996), producir fitorreguladores (Bottini *et al.*, 1989; Dobbelaere *et al.*, 1999) y aumentar la cantidad y/o longitud de pelos radicales y raíces adventicias (Okon y Vanderleyden, 1997), lo que redundará en una mejora en la absorción de agua y nutrientes (Bashan *et al.*, 2007). Numerosos trabajos mostraron incrementos en el crecimiento y rendimiento de trigo (García de Salamone *et al.*, 1990; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2009; Naiman *et al.*, 2009) y de maíz (Paredes-Cardona *et al.*, 1988; García de Salamone y Döbereiner, 1996; Caballero-Mellado, 2004), entre otros cultivos.

El nivel de respuesta a la inoculación depende de las interacciones entre los microorganismos nativos del suelo y los microorganismos inoculados (Bashan, 1999), y entre éstos últimos y el cultivo. Además, estas interacciones están sujetas a los factores físico-químicos imperantes (Rani y Goel, 2012), tales como la disponibilidad de nutrientes (Dobbelaere *et al.*, 2001) para el cultivo y para los microorganismos. Debido a que la asociación *Azospirillum*-planta ocurre con distintos grados de interacción, el nivel de respuesta a la inoculación con *Azospirillum* depende, entre otras razones, de las características genéticas de la bacteria, a nivel especie y cepa, y de la planta hospedante (García de Salamone, 2012a; 2012b; García de Salamone y Döbereiner, 1996; García de Salamone *et al.*, 2012). En Argentina, existen inoculantes comerciales disponibles de estas PGPR para el productor agropecuario (Maddonni *et al.*, 2004a), aunque aún resulta necesario ajustar la tecnología de

inoculación a fin de lograr su máxima eficiencia (Bashan, 1999; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2009; García de Salamone, 2012a).

El género *Azospirillum* pertenece a las alfaproteobacterias y en él se reconocen quince especies (Reis *et al.*, 2011), siendo las más estudiadas *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae* y la especie tipo del género, *A. lipoferum* (Caballero-Mellado, 2004). Este género tiene una gran versatilidad para adaptarse a condiciones edáficas diversas, habiendo sido aisladas de la rizósfera y del interior de tejidos vegetales de una amplia variedad de plantas cultivadas y silvestres (Reis *et al.*, 2011), sean éstas especies gramíneas u otras (Kennedy *et al.*, 2004) e, incluso, de suelos contaminados (Young *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009).

El N es uno de los elementos más requeridos por los cultivos extensivos, debido a que es el principal limitante de la productividad primaria neta en los ecosistemas terrestres (LeBauer y Treseder, 2008). Debido a que la aplicación de fertilizantes de síntesis química en exceso posee impactos ambientales negativos (Tilman, 1999), existe un gran interés en conocer y utilizar biotecnológicamente microorganismos que posean el mecanismo conocido como FBN (Franché *et al.*, 2009). La FBN es una fuente esencial y potencial de N para el desarrollo de agroecosistemas sostenibles (Urquiaga *et al.*, 2004). Esto es aplicable a la pampa húmeda argentina en donde se ha reportado que la fertilización aplicada en cultivos de trigo, maíz, soja y girasol repone solamente el 23% del N y el 43% del P exportado por los cultivos (García, 1999). La capacidad de FBN de *A. brasilense* fue reportada en cultivos de trigo y a arroz (García de Salamone, 2012a), demostrándose en cantidades equiparables a 100 kg de N ha⁻¹ para dos genotipos comerciales de maíz inoculados con cepas de esta bacteria (García de Salamone *et al.*, 1996).

García de Salamone y Döbereiner (1996) aislaron cepas de *A. brasilense* a partir de muestras de raíces de plantas de maíz, creciendo en condiciones de campo, en la localidad de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires. La identificación de las cepas se realizó con posterioridad a su aislamiento, mediante secuenciación del gen 16S ARNr (García de Salamone *et al.*, 2010). Del total de aislamientos obtenidos, se seleccionaron las cepas 40M y 42M por su alta eficiencia de FBN. Hasta el momento, estas cepas han sido probadas en condiciones experimentales y no han sido utilizadas en la formulación de inoculantes comerciales. En un ensayo de arroz, realizado en condiciones de campo, fue evaluada la respuesta a la inoculación de estas

cepas y se observaron incrementos en la biomasa vegetal y en el contenido de N de la misma, junto con modificaciones en la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas asociadas debidas a la inoculación (García de Salamone *et al.*, 2010).

Numerosos estudios muestran que los diferentes manejos agrícolas modifican la biodiversidad y alteran la estructura de las comunidades microbianas (Daniell *et al.*, 2001; Govaerts *et al.*, 2007; Kennedy y Smith, 1995; Kandeler y Böhm, 1996; Øvreås y Torsvik, 1998; Lupwayi *et al.*, 2001; Willis *et al.*, 2013). Los microorganismos del suelo cumplen un rol preponderante en las funciones ecosistémicas (Friesen *et al.*, 2011; Neher, 1999; Winding *et al.*, 2005), por lo que la salud del suelo y la productividad vegetal, y con éstas, la sostenibilidad de la producción agrícola depende, en gran parte, de la selección de prácticas que promuevan la abundancia y la diversidad biológica (Altieri, 1999; Zak *et al.*, 2003).

Diferentes comunidades microbianas son consideradas indicadoras de la calidad del suelo (Abril, 2003), presentando, además, interrelación con otro tipo de variables (Anderson, 2003; Bending *et al.*, 2004). Estos indicadores pueden ser utilizados para evaluar los efectos de las prácticas agrícolas sobre el agroecosistema (Bending *et al.*, 2004; Romaniuk *et al.*, 2011) y sobre la calidad del suelo (Schloter *et al.*, 2003). Si bien las diferentes estrategias de manejo aplicadas en la producción agrícola pueden modificar la biodiversidad microbiana, los efectos de la aplicación de fertilizantes e inoculantes sobre las comunidades microbianas nativas en condiciones de campo no son completamente conocidos.

Entre los métodos disponibles para el análisis de la diversidad funcional microbiana se encuentra el estudio de los CLPP. Este método surgió como un análisis complementario al estudio tradicional de los microorganismos, basado en el aislamiento y recuento de los distintos tipos análisis taxonómicos. Se basa en la inoculación de muestras microbianas en varias celdas de microplacas plásticas, que contienen en cada una de dichas celdas distintas fuentes carbonadas únicas. Cuando la fuente carbonada es utilizada, producto del desarrollo microbiano, se obtiene un patrón de desarrollo de color debido a la reducción del colorante indicador que puede ser único para una determinada comunidad (Di Salvo y García de Salamone, 2012). Esta metodología ha sido ampliamente utilizada para la evaluación del efecto de diferentes manejos agrícolas sobre las comunidades microbianas (Engelen *et al.*, 1998; Lawlor *et al.*, 2000; Bending *et al.*, 2004; Bucher y Lanyon, 2005; Di Salvo y García de Salamone, 2012; García de Salamone, 2012b).

Debido a su importancia dentro de los ecosistemas, otro de los indicadores microbiológicos de calidad de suelos que puede ser tenido en cuenta para evaluar el efecto de las prácticas de manejo aplicadas, es la intensidad de la micorrización natural (García de Salamone *et al.*, 2006). Prácticas agrícolas como el monocultivo, la fertilización y el uso indiscriminado de agroquímicos podría disminuir o incluso hacer desaparecer el potencial micorrízico del sistema (Collins-Johnson y Pflieger, 1993; Oehl *et al.*, 2003; Schalamuk *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2013).

1.2. Objetivos e hipótesis.

En base a la revisión bibliográfica y los antecedentes de la temática, se establecen las siguientes hipótesis de estudio:

1. La inoculación de plantas de trigo y/o maíz con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M aumenta el rendimiento, la producción de biomasa aérea y radical de ambos cultivos.

2. La fertilización fosforada y/o nitrogenada de plantas de trigo y/o maíz aumenta el rendimiento, la producción de biomasa aérea y radical de estos cultivos.

3. La inoculación de plantas de trigo y/o maíz con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M modifica la diversidad funcional y estructural de las comunidades bacterianas rizosféricas de estos cultivos.

4. La fertilización fosforada y/o nitrogenada de plantas de trigo y/o maíz modifica la diversidad funcional y estructural de las comunidades bacterianas rizosféricas de estos cultivos.

5. La inoculación de plantas de trigo y/o maíz con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M favorece la micorrización natural de estos cultivos.

6. La fertilización fosforada y/o nitrogenada de plantas de trigo y/o maíz reduce la micorrización natural de estos cultivos.

A partir de las hipótesis expuestas se definen los siguientes objetivos:

Objetivo general: Generar conocimiento sobre la ecología microbiana rizosférica y sobre las variables agronómicas de los cultivos de trigo y maíz cuando se aplican fertilizaciones químicas e inoculantes experimentales de ciertas cepas de *A. brasilense* en condiciones de campo.

Objetivos particulares:

1. Realizar una caracterización de las propiedades fisiológicas de las cepas de *A. brasilense* utilizadas en los inoculantes para los ensayos a campo.
2. Realizar ensayos de campo independientes para trigo y maíz con el fin de evaluar la respuesta a la inoculación con cepas de *A. brasilense* 40M y 42M y a la fertilización fosforada y/o nitrogenada sobre el rendimiento y la producción de biomasa y de raíces.
3. Evaluar en los ensayos descritos en el objetivo 2, los efectos de la aplicación de inoculación y fertilización fosforada y/o nitrogenada sobre la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas nativas.
4. Evaluar en los ensayos descritos en el objetivo 2, los efectos de la aplicación de inoculación y fertilización fosforada y/o nitrogenada sobre las comunidades de HFMA nativos y la micorrización de los cultivos.

Capítulo 2. Metodologías aplicadas en ensayos a campo.

2.1. Descripción general de los ensayos a campo y método de obtención de muestras.

Se llevaron a cabo experimentos de trigo y maíz independientes entre sí, en diferentes campañas agrícolas y en diferentes establecimientos productivos de la Provincia de Buenos Aires. En lo que respecta a control de plagas, fecha de siembra y variedades o híbridos utilizados, y la conducción de los cultivos se realizaron según el manejo habitual de los propietarios de los establecimientos. El diseño de los experimentos fue variable según la disponibilidad de factores analizados en cada uno de los ensayos. Los detalles de cada uno de los ensayos se mencionan en los capítulos correspondientes a los mismos.

Para cada uno de los ensayos se formularon los inoculantes experimentales utilizados a partir de cultivos axénicos de las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M (número de acceso a GenBank HM002661 y HM002662, respectivamente). Para ello, el cultivo de las mismas se realizó en medio Nfb líquido, suplementado con cloruro de amonio 1 g L^{-1} (Döbereiner y Pedrosa, 1987) (ver anexo 1). Los inoculantes monocepa -en adelante, inoculante 40M e inoculante 42M, respectivamente- fueron formulados con los cultivos de las respectivas cepas, mientras que el inoculante mezcla de cepas -en adelante, inoculante 40M+42M- se formuló mediante la mezcla 1:1 de los cultivos de ambas cepas en los días de siembra de los ensayos correspondientes. Previo al día de la siembra de cada uno de los ensayos se realizó el recuento de células viables de cada uno de los inoculantes y la confirmación de pureza. Para ello, a partir de cada inoculante se realizaron diluciones sucesivas 1:10 en SF estéril (ver anexo 1), las cuales fueron posteriormente sembradas en medio agar nutritivo con glucosa (TYG) (ver anexo 1).

La inoculación se realizó en cada uno de los establecimientos al momento de la siembra, aplicando el o los inoculantes sobre las semillas, bajo las condiciones adecuadas para la inoculación, evitando la exposición directa del sol. Las dosis de inoculantes utilizadas fueron determinadas según el cultivo a sembrar y el tratamiento previo de las semillas, de modo de asegurar la mayor supervivencia de las bacterias sobre éstas. La aplicación de fertilizantes se llevó a cabo con la maquinaria disponible en cada uno de los establecimientos. Las dosis de inoculante y fertilizante utilizadas, el tipo de fertilizante, el momento de aplicación y la maquinaria utilizada se describen posteriormente en los capítulos correspondientes a cada uno de los ensayos.

Se realizaron dos muestreos en cada uno de los ensayos, en estados fenológicos diferentes. Uno de ellos fue durante la etapa vegetativa y el otro durante la etapa reproductiva. Los estados fenológicos en los que se realizaron los muestreos en cada uno de los ensayos fueron determinados según las escalas de Zadoks *et al.* (1974) y Ritchie y Hanway (1982) para los cultivos de trigo y maíz, respectivamente. Además, a la cosecha de los cultivos se realizó un tercer muestreo de parte aérea y de suelo rizosférico. En cada una de las parcelas de cada ensayo se muestrearon 0,5 m lineales del cultivo, y se cortó la parte aérea a la altura del cuello de las plantas. Sobre la línea de siembra se tomaron muestras de raíces y suelo rizosférico, en una profundidad de 0 a 20 cm, utilizándose un barreno de 5 cm de diámetro. A la siembra y/o a la cosecha del cultivo de cada uno de los ensayos se realizaron las determinaciones de pH, % de materia orgánica, % C orgánico, % N orgánico, relación C/N, contenido de N-NO₃ (ppm) y contenido de P asimilable Bray (ppm), por el laboratorio de referencia del Instituto de Suelos del INTA Castelar, laboratorio miembro de la Red INTA de Laboratorios de Suelo, Agua y Material Vegetal (RILSAV).

2.2. Determinaciones de parámetros agronómicos.

En cada muestreo, y en cada uno de los ensayos, las muestras de parte aérea fueron secadas en estufa a 60°C. En el caso de las muestras obtenidas durante la etapa reproductiva y a la cosecha de los cultivos, las estructuras reproductivas se separaron del resto de la planta y se secaron separadamente. Luego de secadas, las muestras fueron pesadas para determinación de biomasa aérea y componentes del rendimiento: número de espigas por planta (únicamente en los cultivos de trigo), número de granos ha⁻¹ y peso de granos. La biomasa radical se determinó mediante el secado de las raíces en estufa hasta peso constante, luego realizados todos los recuentos de grupos microbianos, según se describe en la sección 2.3.1.

A la cosecha del cultivo, se determinó el IC. El mismo se calculó como la relación entre el rendimiento y la biomasa aérea total (biomasa aérea + biomasa de espigas). Se calculó la EUF, mediante la relación entre los kg producidos -de grano o de biomasa aérea- por kg de nutriente o fertilizante aplicado.

2.3. Determinaciones microbiológicas de la rizósfera.

2.3.1. Recuentos de grupos microbianos.

En todos los ensayos y para cada una de las muestras se separaron las raíces del suelo mediante tamizado. Las raíces se colocaron en matraces previamente esterilizados y se completó con SF estéril de modo de realizar la primera dilución 1:10, a partir de la cual se realizaron las diluciones sucesivas 1:10 en SF estéril. Las diluciones se sembraron en viales con medio Nfb semisólido (Nfb ss) (ver anexo 1) a los fines de realizar el recuento de los microorganismos MFN, según la técnica de recuento por NMP (Alef, 1998). En ciertos ensayos, las diluciones también fueron utilizadas para el recuento de microorganismos celulolíticos y nitrificadores. Para ello se utilizaron microplacas plásticas de 96 celdas con 200 µl de medios de cultivos específicos para cada grupo microbiano en cada una de ellas (ver anexo 1). En cada celda se sembraron 50 µl de cuatro diluciones seriadas consecutivas, por triplicado, para aplicar la técnica del NMP. Las microplacas se incubaron a 28°C durante 15 días. Luego de la incubación, se realizó el cálculo del NMP con la tabla presentada en Man (1983). El número característico se determinó mediante la cuantificación de las celdas positivas, comparadas con celdas control en las cuales no se sembró ninguna de las diluciones, y de acuerdo al recuento del grupo microbiano correspondiente. En el caso del recuento de microorganismos celulolíticos, la determinación se realizó de acuerdo a una escala colorimétrica del grado de deterioro del papel de filtro utilizado por los microorganismos como única fuente de C. en el caso del recuento de microorganismos nitrificadores, la determinación se realizó midiendo la concentración de nitratos y nitritos mediante bandeletas Quantofix® (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania).

2.3.2. Micorrización natural.

Las muestras de raíces obtenidas en cada uno de los muestreos de cada ensayo se sometieron a un tratamiento de decoloración y posterior tinción, según una metodología adaptada de Phillips y Hayman (1970). El proceso de decoloración se realizó sumergiendo las raíces en solución de KOH al 10% e incubándolas durante 20 min en baño térmico a 60°C. Posteriormente, se descartó la solución y se repitió el proceso incubándolas durante 10 min a igual temperatura. Se descartó la solución y se las cubrió con una solución de HCl 1N durante 10 min a temperatura ambiente. Luego

de este tiempo, se descartó la solución y se las enjuagó con agua destilada. La tinción se realizó inmediatamente a la decoloración mediante el agregado de una solución de azul de Tripán al 0,05% en ácido láctico, manteniéndose durante 15 min en baño térmico a 60°C. Luego de ese tiempo, se descartó la solución y las raíces se conservaron en etanol 50% hasta posteriores determinaciones.

La densidad de longitud total de raíces se determinó mediante la estimación por la técnica del intercepto (Newman, 1966). Esta técnica consiste en colocar al azar la muestra de raíces, una vez teñidas, sobre una grilla y realizar el recuento del número de intercepciones raíz-grilla. El cálculo de la densidad de longitud radical total se realizó con la fórmula de Newman (1966):

$$R \approx \frac{\pi \times A \times n}{2 \times H}$$

Donde, R es la densidad de longitud radical total, A es el área total de la grilla donde están distribuidas las raíces, n es el número de intercepciones raíz-grilla, y H es la longitud total de las líneas que conforman la grilla.

Luego de la determinación de la densidad de longitud total de raíces, se armaron preparados para la observación y determinación al microscopio del porcentaje de colonización radical y de la presencia de las estructuras típicas de las micorrizas arbusculares. Los preparados fueron armados con 15 fragmentos de raíces de aproximadamente 1 cm, colocados sobre un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos luego de colocar sobre el portaobjetos una gota de ácido láctico al 90%. Al menos tres preparados fueron armados para cada una de las muestras, de forma tal de cubrir un mínimo de 30 fragmentos de raíces necesario para cada muestra, de acuerdo con Pongrac *et al.* (2007). La colonización radical se registró con un aumento de 100X, y se consideró colonización positiva cuando el fragmento de raíz estuvo teñido al menos en el 50% de su longitud. Estos datos fueron utilizados para la determinación del porcentaje de colonización radical. Debido a que en este trabajo se analizaron muestras de raíces obtenidas a campo mediante un colorante que tiñe la quitina (Giovannetti y Mosse, 1980) y que otros hongos pueden ser teñidos con este protocolo (Dodd y Jeffries, 1986), la variable obtenida mediante la cuantificación del total de raíces teñidas se denominó colonización radical, en lugar de colonización micorrícica, y hace referencia a la colonización radical por parte de hongos del suelo. Finalmente, en cada una de las raíces con

colonización radical positiva, se registró la presencia o ausencia de estructuras típicas de micorrizas arbusculares, como ser arbusculos, vesículas y esporas, con aumentos de 100X y 400X.

2.3.3. Diversidad funcional de comunidades rizosféricas.

A partir de las muestras obtenidas en cada uno de los muestreos de cada ensayo, se realizó la caracterización y cuantificación de la diversidad funcional bacteriana mediante la obtención de los CLPP de las comunidades presentes en cada una de las muestras según la metodología descrita por Di Salvo y García de Salamone (2012). Para ello, 50 μl de la dilución 10^{-4} realizada para los recuentos microbianos, se sembró en cada una de las celdas de las microplacas que contenían 100 μl de medio mineral basal, 50 μl de colorante indicador redox, y 50 μl de cada una de las 23 fuentes carbonadas diferentes (ver anexo 1). Las microplacas se incubaron a 30°C durante cuatro días. El desarrollo de las comunidades bacterianas presentes en cada una de las celdas fue determinado mediante la lectura de absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro Multiskan EX™ (Thermo, Vantaa, Finlandia) cada 24 horas, durante cuatro días consecutivos. Además de la caracterización de la diversidad funcional mediante el análisis multivariado de la información provista por esta metodología, para realizar una cuantificación de la misma se realizó el cálculo del índice H' (Gómez *et al.*, 2004). Este índice se obtiene mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$H' = \sum p_i \times \ln p_i$$

Donde, H' es el índice de diversidad de Shannon-Weaver, p_i es la relación entre el desarrollo (absorbancia) generado a partir de una fuente carbonada determinada (i) y la sumatoria de todos los valores de absorbancia obtenidos en todas las fuentes carbonadas, para cada una de las muestras.

2.3.4. Diversidad estructural de comunidades rizosféricas.

La caracterización de la diversidad estructural se llevó a cabo mediante el análisis de los perfiles por T-RFLP del gen 16S ARNr de las comunidades microbianas rizosféricas. Para ello se secaron las muestras de suelo rizosférico a 55°C . A partir de 0,5 g de muestra se extrajo el ADN total con el kit comercial UltraClean Soil DNA Isolation (#12800, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA,

USA). El ADN extraído fue utilizado como molde para la amplificación del gen 16S ARNr con el par de primers 27f (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1392r (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). El primer 27f había sido marcado con 6-carboxifluoresceína. Tres alícuotas por muestra de ADN extraído fueron utilizadas para realizar la amplificación por PCR en tres reacciones independientes. Todas las amplificaciones fueron realizadas en 25 μ l de volumen de solución total, la cual contenía 100 ng de ADN, 0,1 μ M de cada primer, 2,5 mM MgCl₂, BSA (0,2 mg ml⁻¹), buffer de la enzima Taq 1x, 0,2 mmol de cada dNTP y 0,4 U μ L⁻¹ de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (GeneAmpPCR System 2400, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con una secuencia de desnaturalización inicial 5 min a 94°C, 30 ciclos con la siguiente secuencia: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C, y un paso final de extensión de 10 min a 72°C.

Las tres alícuotas de cada muestra fueron mezcladas luego de la amplificación por PCR y los productos de dicha amplificación fueron concentrados y desalinizados con columnas de filtración por centrifugación (Microcon 100, Amicon, EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Aproximadamente 300 ng de los productos de PCR marcados fueron digeridos con las enzimas de restricción *MspI* y *HhaI* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por separado. Luego de la inactivación de dichas enzimas mediante el calentamiento a 65°C durante 15 min, la determinación de los T-RFLP se realizó en MacroGen GeneScan Service mediante el mezclado de alícuotas de 4 μ L de cada digestión enzimática con una solución conteniendo formamida deionizada, buffer de corrida (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) y 0,5 μ L del estándar de tamaño de fragmento de ADN GS1200LIZ (Applied Biosystems).

Los diferentes T-RFs obtenidos fueron analizados con el software PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems). Todos los T-RFs entre 50 y 550 pb, con alturas de pico mayores a 100 unidades de fluorescencia fueron considerados para los análisis de los perfiles de T-RFLP. La intensidad de fluorescencia total presente en cada electroferograma fue comparada en cada set de datos y los datos de T-RFLP fueron estandarizados con la menor intensidad, según describen Dunbar *et al.* (2001). Los perfiles fueron alineados utilizando el mismo software. Luego de los análisis estadísticos pertinentes, algunos de los T-RFs obtenidos fueron contrastados con digestiones *in silico* realizadas con la aplicación de digestión virtual (ISPaR) del software Microbial Community Analysis III (MiCA) a partir de la base de datos denominada Ribosomal Database Project (RDP, R10, U27) 700,829 Good

Quality (>1200) Bacterial y con la secuencias de primers y enzimas de restricción utilizadas en este trabajo. Las secuencias obtenidas que correspondían a bacterias no cultivables (“unculturable bacteria”) fueron descartadas para los análisis.

Además de la caracterización de la diversidad estructural mediante el análisis multivariado de la información provista por esta metodología, para realizar una cuantificación de la misma se realizó el cálculo del H' (Gómez *et al.*, 2004). Este índice se obtiene mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$H' = \sum p_i \times \ln p_i$$

Donde, H' es el índice de diversidad de Shannon-Weaver, p_i es la relación entre la intensidad de fluorescencia (altura observada en cada pico) correspondiente a un tamaño de fragmento determinado (i) y la sumatoria de todas las intensidades de fluorescencia (alturas de pico) correspondiente a todos los T-RFs, para cada una de las muestras.

2.4. Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos para las variables biomasa aérea, rendimiento, sus componentes y el IC, así como los datos de recuentos de grupos microbianos, el índice H' , y aquellos de las variables correspondientes a la evaluación de la micorrización natural fueron comparados mediante análisis de varianza y contraste de medias mediante test de Tukey ($P \leq 0,05$). Aquellas variables que no cumplieron con los supuestos de la varianza fueron analizadas mediante métodos no paramétricos. Los datos obtenidos en la caracterización de la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas presentes se evaluaron mediante métodos de análisis multivariado. Para el análisis de los datos de T-RFLP se utilizó el programa PeakScanner (v1.0 software, Applied Biosystems). Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico Infostat, versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Capítulo 3. Caracterización de cepas de *Azospirillum brasilense*.

3.1. Introducción.

Los niveles de respuesta a la inoculación con bacterias del género *Azospirillum* están definidos por las características genéticas de la bacteria y la planta huésped, y las interacciones entre éstas, entre otras razones (Azevedo *et al.*, 2005; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2008; García de Salamone y Monzón de Asconegui, 2008; García de Salamone *et al.*, 2010). Es por ello que resulta necesario obtener aislamientos bajo diferentes condiciones ambientales, de manera tal de garantizar el acceso a la diversidad genética del género *Azospirillum* y, en consecuencia, incrementar el éxito de la práctica de inoculación y la PGP en vías de una agricultura sostenible.

Históricamente, el aislamiento de cepas del género *Azospirillum*, principalmente *A. brasilense* y *A. lipoferum*, se ha basado en el uso de medios de cultivo semisólidos (ss), tales como el medio Nfb ss (Döbereiner y Pedrosa, 1987). Debido a la aerotaxia, estas bacterias se trasladan hacia el lugar específico en el medio donde la tasa de difusión de oxígeno y la respiración bacteriana permiten a la enzima nitrogenasa, responsable de la FBN, evitar el efecto inhibitor del oxígeno. Debido a esto, las bacterias forman una película sub-superficial en forma de velo que es característica (Tarrand *et al.*, 1978). Rodríguez-Cáceres (1982) desarrolló un medio de cultivo diferencial con la utilización del colorante rojo Congo. En este medio, denominado RC, las colonias son descritas como rojo escarlata, rugosas y secas. A pesar de la acción carcinogénica del rojo Congo y su interferencia en el crecimiento de especies bacterianas sensibles, algunos autores han señalado que el medio RC ha sido muy útil para obtener nuevos aislamientos de *Azospirillum* spp. (Puente *et al.*, 2008).

Técnicas moleculares, tales como RFLP, RAPD fingerprinting o electroforesis en gel de campo pulsado, han sido utilizadas para diferenciar algunas cepas de diferentes especies del género *Azospirillum*. Sin embargo, algunas cepas mostraron similares patrones moleculares y no pudieron ser diferenciadas, dependiendo de la técnica o el protocolo utilizado (Fancelli *et al.*, 1998; Fani *et al.*, 1993; Grifoni *et al.*, 1995; Gündisch *et al.*, 1993; Kirchhof *et al.*, 1997). Recientemente, se han realizado diversos avances en genómica, poniendo a disposición herramientas más eficientes para evaluar la diversidad estructural (Baudoin *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se quiere realizar una diferenciación entre cepas, estas herramientas aún son muy onerosas. Por ello,

no podrían ser utilizadas aún como el método principal para caracterizar la diversidad de *A. brasilense* durante los primeros pasos del aislamiento y obtención de las nuevas cepas.

La caracterización fisiológica del género *Azospirillum* ha sido extensamente considerada en la literatura (Bergey y Holt, 1994; Döbereiner, 1998; Hartmann y Baldani, 2006; Okon, 1994; Tarrand *et al.*, 1978; Westby *et al.*, 1983). La FBN de *Azospirillum* spp. se ha considerado que es inhibida en presencia de oxígeno (Zhang *et al.*, 1997). Además, se ha descrito que *Azospirillum* spp. no puede crecer en medios sólidos sin una fuente de N disponible, debido a la ausencia de mecanismos de protección de la enzima nitrogenasa contra el oxígeno que impiden la actividad de la misma (Döbereiner, 1998; Day y Döbereiner, 1976; Okon *et al.*, 1976). Además, se ha señalado que *A. brasilense* no puede crecer bajo condiciones de microaerobiosis en medios libres de N y suplementados con sacarosa o glucosa como fuentes de C (Döbereiner, 1998; Döbereiner *et al.*, 1995; Tarrand *et al.*, 1978). También, cuando hay una fuente de N disponible en el medio de cultivo, no se observa crecimiento en presencia de sacarosa o glucosa como fuentes de C (Martínez Drets *et al.*, 1984), pero ha sido informado que ciertas cepas han mostrado la capacidad de crecer en medios conteniendo glucosa (Gillis y Reinhold-Hurek, 1994).

El análisis de los FAME obtenidos a partir de células bacterianas por cromatografía gaseosa ha sido utilizado por más de 50 años como un método rápido y de fácil uso para la identificación microbiana de rutina (Maas *et al.*, 1985). Este análisis quimiotaxonómico es común en la descripción de las especies bacterianas. El mismo ha sido aplicado para la identificación rápida de especies de *Bacillus* spp. (Lawrence *et al.*, 1991), *Rhizobium* spp. (Jarvis y Tighe, 1994) y *Bradyrhizobium* spp. (Graham *et al.*, 1995), e incluso para la clasificación taxonómica de subespecies pectinolíticas atípicas de *Erwinia carotovora* (De Boer y Sasser, 1986). Schenk y Werner (1988) han propuesto que un análisis de los ácidos grasos celulares podría ser un método favorable para identificar nuevos aislamientos del género *Azospirillum*. Sus resultados mostraron similitudes y diferencias en los tipos de ácidos grasos presentes en diferentes especies del género *Azospirillum*.

Además de la FBN, otro mecanismo de PGP del género *Azospirillum* es la producción de fitorreguladores o fitohormonas (Bashan *et al.*, 2004). Existen dos fuentes de fitohormonas, la producción endógena en los tejidos vegetales y la producción exógena por parte de los microorganismos. Dichas fitohormonas pueden ser agrupadas en cinco clases principales: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Baca y Elmerich, 2007), a las que se suman las

poliaminas y los brasinoesteroides (Salisbury y Ross, 1991). Se identificó la síntesis de ácido indolacético (AIA), compuesto más común dentro del grupo de las auxinas, tanto en la patogénesis de bacterias fitopatógenas como en PGPR, promoviendo el desarrollo radical (Lambrecht *et al.*, 2000). El AIA es la principal fitohormona sintetizada por *A. brasilense* (Zimmer y Bothe, 1989). Es sabido que en esta bacteria la expresión de genes relacionados con la síntesis de AIA se encuentra regulada positivamente por las auxinas secretadas por las plantas (Lambrecht *et al.*, 2000), y que la síntesis de AIA es estimulada en presencia del aminoácido precursor triptófano (Baca *et al.*, 1994), existiendo varias vías para la síntesis (Baca y Elmerich, 2007). La síntesis de AIA ha sido identificada en varias cepas de esta especie bacteriana (Crozier *et al.*, 1988; Pedraza *et al.*, 2004). Las giberelinas, en estrecha relación con otras fitohormonas, están implicadas en numerosos procesos de la fisiología y el desarrollo de las plantas, siendo sintetizadas por éstas, pero también por hongos y bacterias de suelo (Bottini *et al.*, 2004), tales como *Azospirillum* sp. (Bottini *et al.*, 1989; Tien *et al.*, 1979). La síntesis de citoquininas fue confirmada en numerosos microorganismos (Strzelczyk *et al.* 1994), como así también en PGPR tales como *Pseudomonas* sp. (García de Salamone *et al.*, 2001) y *Azospirillum* sp. (Tien *et al.*, 1979; Strzelczyk *et al.*, 1994). El etileno es una hormona sintetizada por las plantas en niveles muy bajos, a lo largo de su ciclo de vida (Bashan *et al.*, 2004). Sin embargo, su síntesis puede incrementarse debido a condiciones de estrés vegetal (Glick *et al.*, 2007). Muchos microorganismos del suelo, incluyendo varias PGPR, poseen la enzima desaminasa del ACC (Baca y Elmerich, 2007). Esta enzima cliva el ACC, precursor directo del etileno (Glick *et al.*, 1998), reduciendo la acumulación de esta hormona en las plantas (Penrose y Glick, 2003) y sus efectos inhibidores sobre la elongación radical (Blaha *et al.*, 2006). Si bien se ha establecido que esta enzima no está presente en el género *Azospirillum* (Holguin y Glick, 2001), otros autores han reportado la presencia del gen que codifica para esta enzima en algunas especies de *Azospirillum* sp. (Blaha *et al.*, 2006) y la actividad ACC desaminasa de una cepa de *A. lipoferum* (Esquivel-Cote *et al.*, 2010).

Junto con los mecanismos de PGP antes mencionados, también se incluyen la capacidad de los microorganismos de producir sideróforos y de solubilizar fosfatos. En suelos aeróbicos, el hierro se encuentra precipitado por lo que no está disponible para su asimilación por los organismos, existiendo una alta competencia por este elemento en la rizósfera. Ante situaciones de déficit, muchas bacterias del suelo inducen la síntesis de moléculas con alta afinidad por el hierro,

denominadas sideróforos (Gamalero y Glick, 2011). La capacidad de producir este tipo de compuesto también fue reportada para el género *Azospirillum* (Bachhawat y Ghosh, 1987; Pedraza *et al.*, 2007). La producción de sideróforos constituye tanto un mecanismo directo de PGP, aumentando la disponibilidad del nutriente limitante, como un mecanismo indirecto, debido al secuestro de este nutriente y la disminución del mismo para los microorganismos potencialmente patógenos (Ortiz-Castro *et al.*, 2009). En el suelo, el P está presente principalmente en formas insolubles, P mineral y P orgánico. La presencia de formas solubles en la solución del suelo depende de procesos fisicoquímicos, como la sorción-desorción y la precipitación, así como de procesos biológicos de inmovilización, mineralización y solubilización (Khan *et al.*, 2009). El principal mecanismo de solubilización de fosfatos es la secreción de ácidos orgánicos (Gamalero y Glick, 2011). Numerosos hongos y bacterias del suelo poseen la capacidad de solubilizar fosfatos (Khan *et al.*, 2009), incluyendo al género *Azospirillum* (Puente *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004).

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo fue realizar la caracterización de la fisiología y de algunos mecanismos de PGP de las cepas de *A. brasilense* utilizadas en todos los ensayos a campo. Durante esta caracterización se pusieron en revisión algunos de los conceptos más importantes, relacionados con los protocolos de aislamiento y caracterización comúnmente utilizados en los trabajos realizados con *A. brasilense*.

3.2. Metodología.

En este trabajo se realizó una caracterización fisiológica y bioquímica de las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M (Colección de Cultivos Microbianos Diazotróficos de Embrapa Agrobiología BR 11036 y BR11038; número de acceso a GenBank HM002661 y HM002662, respectivamente) utilizadas posteriormente en los ensayos a campo. Para esta caracterización se utilizaron, además, cepas patrón de *A. brasilense*, con el objetivo de realizar comparaciones entre las diferentes cepas. Las cepas patrón utilizadas fueron Az39 (Colección IMyZA-INTA, Castelar, Buenos Aires; número de acceso a GenBank JQ844453), Sp7 (ATCC 29145; número de acceso a GenBank X79739) y Cd (ATCC 29710; número de acceso a GenBank DQ438999).

Se evaluó la capacidad de crecimiento en medios sólidos y semisólidos (ss), solidificados con agar-agar o agarosa, y en diferentes medios de cultivo, con y sin fuentes de C y/o N. Los medios de cultivo utilizados fueron Nfb sólido, Nfb ss, TYG, RC, LGI ss, JNfb ss, LGSac ss, LGglu ss, LGSac,

LGglu, Nfb agarosa, Nfb ss agarosa, LGglu agarosa y LG agarosa. La composición de cada medio se describe en detalle en el anexo 1. La caracterización de la actividad de PGP *in vitro* de las cinco cepas se realizó mediante las determinaciones de FBN en microaerofilia, la producción de sideróforos y de compuestos indólicos, la capacidad de solubilizar de fosfatos, y la actividad ACC desaminasa.

La FBN se determinó mediante la técnica de ARA, adaptada de Eckert *et al.* (2001). Para ello, se prepararon suspensiones de cada una de las cepas, uniformando la densidad óptica de las mismas a 0,2. Luego se sembraron 50 μ l de dichas suspensiones en viales de 10 ml con 4,5 ml de un medio mínimo semisólido diseñado para evaluar la actividad de la enzima nitrogenasa (ver anexo 1). Los viales fueron incubados a 30°C hasta formación de película subsuperficial. Luego del lapso de incubación, éstos fueron cerrados con septos de goma y brazaletes metálicos previo a agregar acetileno en 1/10 del volumen de aire (Burriss, 1972). Posteriormente, los viales se incubaron a 30°C en oscuridad durante 22 horas, evitando movimientos bruscos que pudieran destruir la película sub-superficial. La cantidad de etileno producida se midió utilizando cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890A). Los cálculos se realizaron basándose en el área del pico y constantes del equipo utilizado.

Se evaluó la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos mediante la utilización de medios de cultivo específicos. Para ello, colonias típicas en medio TYG de las cinco cepas se resuspendieron en 0,5 ml de SF estéril y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes fueron descartados. Este lavado de células se repitió dos veces más. Finalmente, el pellet de células se resuspendió en 0,5 ml de SF estéril. A partir de estas suspensiones de células se realizaron estrías en los medios agar Pikovskaya y agar CAS, respectivamente (ver anexo 1). Se incubaron las placas a 30°C, durante 7 días. La formación de un halo alrededor del crecimiento indica que la cepa es capaz de solubilizar fosfatos o producir sideróforos, respectivamente (Gaur, 1990; Tortora *et al.*, 2011).

Se determinó la producción de compuestos indólicos mediante la siembra de colonias típicas de las cinco cepas, obtenidas en medio TYG, en matraces con medio Nfb líquido (ver anexo 1). Los matraces se incubaron a 35°C, durante cuatro días. Luego de la incubación, 1 ml de cada matraz se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. A partir del sobrenadante se realizó la cuantificación de la producción de compuestos indólicos en una microplaca de 96 celdas, a partir de 50 μ l del

sobrenadante (Hynes *et al.*, 2008). Se realizaron dos curvas estándar de AIA, (de 0 a 10 µg), por triplicado. Para ello se utilizó solución stock de AIA (1 mg AIA ml⁻¹ de metanol), completándose el volumen de 50 µl de cada celda con medio Nfb con cloruro de amonio para la primera de las curvas, y con Nfb con triptófano, para la otra curva. A cada una de las celdas se agregaron 200 µl de reactivo Salkowski (ver anexo 1). La microplaca se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se registró la lectura de absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro Multiskan EX™ (Thermo, Vantaa, Finlandia). Además, se realizó el recuento de las UFC en medio TYG para poder realizar la comparación entre cepas.

La actividad ACC desaminasa se evaluó adaptando la metodología descrita por Hynes *et al.* (2008). Colonias típicas de las cinco cepas, obtenidas en medio TYG, se resuspendieron en 1 ml de SF estéril y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes fueron descartados. Este lavado de células se repitió tres veces. Finalmente, el pellet de células se resuspendió en 200 µl de SF estéril. Estas suspensiones se sembraron matraces conteniendo 50 ml medio Nfb líquido (ver anexo 1). Los matraces se incubaron a 30°C, durante cinco días. Luego de la incubación, se registró la lectura de absorbancia a 405 nm en espectrofotómetro Multiskan EX™ (Thermo, Vantaa, Finlandia). Luego de la incubación, las diferencias en los valores de absorbancia entre las celdas con y sin ACC fueron estandarizadas a partir de los valores de absorbancia obtenidos antes de la incubación de manera tal de poder realizar la comparación entre cepas.

Además, se caracterizaron los perfiles fisiológicos de utilización de 28 fuentes de C diferentes para todas las cepas según metodología descrita por Di Salvo y García de Salamone (2012). Para ello, colonias típicas de las cinco cepas, obtenidas en medio TYG, se sembraron en matraces con medio DYGS (ver anexo 1) por triplicado. Los matraces fueron incubados a 30°C durante 72 horas. Luego de la incubación, se realizaron diluciones sucesivas 1:10 en SF estéril (ver anexo 1). Las microplacas fueron preparadas en forma similar a lo descrito en el apartado 2.3.3., pero con la inclusión de arabinosa, galactosa, sacarosa, sorbitol y glifosato además de las 23 fuentes carbonadas descritas en el anexo 1. En dichas microplacas se sembraron 50 µl de la dilución 10⁻³ de cada una de las repeticiones de cultivos celulares de las cinco cepas. Las microplacas fueron incubadas a 30°C durante 96 horas, registrándose la lectura de absorbancia cada 24 horas mediante espectrofotómetro Multiskan EX™ (Thermo, Vantaa, Finlandia) a 590 nm. Previo a la realización de los análisis, los valores de absorbancia no fueron estandarizados debido a que no se

observaron diferencias entre cepas a las 0 horas de incubación (Di Salvo y García de Salamone, 2012). Los valores de absorbancia correspondientes al tiempo de incubación de 48 horas fueron utilizados para realizar los análisis discriminantes correspondientes, y el cálculo del número de fuentes de C que fueron utilizadas por las cepas, considerándose como tales a aquellas cuyos valores de absorbancia fueron mayores al AWCD de todas las fuentes carbonadas para cada cepa, a un mismo tiempo de incubación.

Para el análisis de los perfiles de FAME, se aplicó la metodología descrita en Maas *et al.* (1985). Se cultivaron las cinco cepas en medio RC, incubándose a 30°C, durante cuatro días. Luego de la incubación, colonias típicas de todas las cepas en este medio se colocaron en 1 ml de una solución de NaOH (1,2N en metanol al 50%) y se saponificaron a 100°C, durante 30 min. Los extractos fueron acidificados hasta pH 2 con HCl 6N y tratados con 1 ml de tricloruro de boro en metanol (BCl₃-CH₃OH; Applied Science Laboratories, State College, Pennsylvania, USA). La mezcla fue calentada a 85°C durante 10 min, enfriada y extraída dos veces con hexano-dietil éter (1:1). La fase orgánica, conteniendo los metil ésteres, fue transferida a viales de cromatografía gaseosa. Los FAME se analizaron por cromatografía gaseosa mediante un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-14B) equipado con un detector de ionización de llama y un integrador Chromatopac C-R6A. Las condiciones de operación fueron: flujo de gas N como carrier 30 ml min⁻¹, temperatura de inyector 250°C, temperatura de detector 280°C, temperatura inicial de la columna 150°C, temperatura final de la columna 250°C, programa de temperatura 4°C min⁻¹. Se inyectó 1 µl de cada muestra en una columna megabore SPB-5 30-m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Los ácidos grasos fueron identificados mediante la co-cromatografía con estándares de referencia (Bacterial Acid Methyl Esters Mix, Catalog N1. 47080-U, Supelco). Estas determinaciones fueron realizadas por el laboratorio de Bioquímica Vegetal y Microbiana de INTA Balcarce.

Finalmente, para contribuir con la caracterización molecular de las cepas de *A. brasilense*, se realizó la secuenciación del gen *nifH* -responsable de la síntesis de la proteína dinitrogenasa reductasa del complejo enzimático nitrogenasa- a partir de cultivos puros de cada una de las cepas 40M y 42M. Para ello se resuspendieron colonias aisladas de cada una de las cepas cultivadas en medio TYG por menos de una semana en 600 µl de SF estéril. Se centrifugó a 13000g durante 2 min para obtener un pellet de células. Se realizó la extracción de ADN genómico mediante el kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit (#A1120, Promega, Madison, WI, USA) utilizando el

protocolo para bacterias Gram negativas. El ADN genómico extraído fue utilizado como molde para la amplificación del gen *nifH* con el par de primers PoIF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') y PoIR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3') (Poly *et al.*, 2001a). Todas las amplificaciones fueron realizadas en 25 μ l de volumen de solución total, la cual contenía 100 ng de ADN, 0,4 μ M de cada primer, 2,5 mM MgCl₂, BSA (0,2 mg ml⁻¹), buffer de la enzima Taq 1x, 0,2 mmol de cada dNTP y 0,4 U μ L⁻¹ de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (GeneAmpPCR System 2400, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) con una secuencia de desnaturalización inicial 5 min a 94°C, 30 ciclos con la siguiente secuencia: 1 min a 94°C, 1 min a 57°C y 2 min a 72°C, y un paso final de extensión de 5 min a 72°C (Poly *et al.*, 2001b). Los productos de la amplificación fueron enviados para su secuenciación en MacroGen GeneScan Service (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el software Chromas Lite (versión 2.1.1, Technelysium, South Brisbane, Australia), posteriormente alineadas con el software Mega5 (Tamura *et al.*, 2011) y comparadas con la base de datos del National Center of Biotechnology Investigation (NCBI, Bethesda, MD, USA).

3.3. Resultados y discusión.

3.3.1. Evaluación del crecimiento en diferentes medios de cultivo.

Históricamente, nuevos aislamientos de *A. brasilense* han podido ser obtenidos y caracterizados utilizándose el medio Nfb semisólido, mediante el desarrollo de crecimiento típico en de una película sub-superficial en forma de velo y la alcalinización del medio (Döbereiner, 1998). En este trabajo, las cinco cepas de *A. brasilense* evaluadas presentaron el crecimiento característico (Figura 3.1 E). Sin embargo, otros autores han podido aislar bacterias con capacidad de FBN diferentes de *A. brasilense* utilizando este medio de cultivo (Fisher *et al.*, 2007; Tr n Van *et al.*, 1997; Tripathi *et al.*, 2002a). Generalmente, para confirmar que un aislamiento corresponde a una nueva cepa de *A. brasilense*, una alícuota de la película t pica en Nfb ss es sembrada en medio Nfb sólido, suplementado con cloruro de amonio (Nfb). Se ha reportado que en este medio de cultivo, *A. brasilense* forma una colonia circular, rugosa y seca, con coloración azul (D bereiner, 1998; D bereiner y Pedrosa, 1987). En este trabajo, las cepas Sp7, Cd, 40M y 42M presentaron esta morfología en el medio Nfb (Figuras 3.1 D y D₁), mientras que la cepa Az39 presentó un halo blanquecino.

El medio RC ha sido recomendado para facilitar el aislamiento de *Azospirillum* spp., debido a que forma colonias típicas de forma circular, secas y rugosas, con coloración rojo escarlata. En este trabajo, las cepas Sp7, Cd, 40M y 42M presentaron esta morfología en el medio RC (Figuras 3.1 B y B₁), mientras que la cepa Az39 presentó un halo blanquecino (Figuras 3.1 A y A.1). Este medio diferencial posee la misma composición que el medio Nfb (Bashan *et al.*, 2011) pero el colorante BTA se reemplazó por el colorante rojo Congo, utilizado para incrementar la selectividad para la identificación del género *Azospirillum* (Rodríguez-Cáceres, 1982). Sin embargo, algunos autores han utilizado el medio RC para el aislamiento de *Azospirillum* y encontraron típicas colonias rojo escarlata pero que luego fueron identificados como miembros de los géneros *Agrobacterium* (Anzovini, comunicación personal), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterobacter* (Fisher *et al.*, 2007; Ogbo y Okonkwo, 2012; Pisarska *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2011).

El medio TYG también ha sido utilizado como un medio alternativo para el aislamiento del género *Azospirillum*. Únicamente se describió el crecimiento de la cepa Cd como colonias circulares, rugosas y secas, con coloración rosada (Leyva y Bashan, 2008). En este trabajo, no sólo la cepa Cd, sino también las cepas Sp7, 40M y 42M presentaron esta morfología de colonia (Figura 3.1 C₁), excepto la cepa Az39 que presentó coloración blanca a crema (Figura 3.1 C).

Se evaluó la capacidad de las cinco cepas de *A. brasilense* de crecer en los medios de cultivo LGI ss y JNfb ss, a pesar que estos medios han sido formulados para el aislamiento de *A. amazonense* y *Herbaspirillum* spp., respectivamente (Döbereiner, 1998). Todas las cepas presentaron desarrollo de película sub-superficial en forma de velo, con acidificación (Figura 3.1 G) o alcalinización (Figura 3.1 H) del medio de cultivo, respectivamente. La composición del medio JNfb ss es similar a la composición del medio Nfb ss, pero el valor de pH es menor al rango óptimo recomendado para el aislamiento de *A. brasilense*. El medio LGI ss contiene sacarosa en lugar de glucosa y su valor de pH es una unidad menor al pH óptimo recomendado para *A. brasilense*. Sin embargo, estas diferencias en los valores de pH en ambos medios no han impedido el crecimiento de las cepas de *A. brasilense* evaluadas. Además, las cinco cepas han podido crecer y fijar N atmosférico con sacarosa como única fuente de C, a pesar que se ha establecido que *A. brasilense* no tiene la capacidad de fijar N cuando la sacarosa es la única fuente de C disponible (Bergey y Holt, 1994; Gillis y Reinhold-Hurek, 1994). Sin embargo, ninguna de las cepas pudo crecer en los medios LGglu ss (Figura 3.1 F) y LGSac ss, probablemente debido a la mayor concentración de estas

fuentes de C en ambos medios de cultivo, en comparación con la concentración disponible en el medio LGI ss.

Las cinco cepas de *A. brasilense* evaluadas presentaron crecimiento en los medios LGglu y LGsac sólidos, libres de N (Figuras 3.1 I e I₂), a pesar que se ha reportado que el género *Azospirillum* no posee los mecanismos para prevenir la inhibición de la actividad de la enzima nitrogenasa por parte del O₂ (Tarrand *et al.*, 1978; Hartmann y Burris, 1987). En ambos medios, las cepas Sp7, Az39, 40M y 42M presentaron colonias redondas, rugosas, secas y con coloración blanca. La cepa Cd mostró similar morfología de colonia pero con coloración rosada en lugar de blanca (Figura 3.1 I₁). Con la intención de descartar cualquier aporte de nutrientes, en particular de N, provenientes del agar-agar, algunos medios fueron formulados reemplazando éste por agarosa ultrapura. Se observó que todas las cepas presentaron crecimiento en los medios Nfb agarosa y LGglu agarosa, pero no pudieron crecer en el medio LG libre de N y sin ninguna fuente de C. Estos resultados indican que ni el agar-agar ni la agarosa pudieron proveer alguna fuente de C o de N, para que las cepas de *A. brasilense* sembradas en los medios LGglu y LGsac pudieran utilizar y crecer a expensas de éstas. En concordancia, Aquilanti *et al.* (2004) encontraron que *A. brasilense*, *A. halopraeferans*, *A. amazonense* y *A. lipoferum* desarrollaron colonias en el medio LG libre de N con sacarosa como fuente de C. Además, algunos autores caracterizaron el crecimiento de *A. brasilense* en un medio libre de N desarrollado para *Azotobacter* (Salantur *et al.*, 2006). Algunos autores mostraron que la producción de compuestos carotenoides contribuye a la protección de la enzima nitrogenasa del efecto inhibitor del O₂ y la mantienen activa (Hartmann y Hurek, 1988; Marchal y Vanderleyden, 2000; Nur *et al.*, 1981). Sin embargo, otros mecanismos de protección que podrían causar diferencias entre cepas en la tolerancia al oxígeno aún no son bien conocidas (Hartmann, 1988).

3.3.2. Actividad PGP *in vitro*.

Todas las cepas de *A. brasilense* produjeron sideróforos en el medio CAS. Otros autores han reportado producción de sideróforos en numerosos aislamientos de *A. brasilense* (Tortora *et al.*, 2011; Bachhawat y Gosh, 1987; Pedraza *et al.*, 2007). Perrig *et al.* (2007) han mostrado que las cepas Az39 y Cd no poseen la capacidad de producir sideróforos pero utilizando una metodología diferente para evaluarlo. Ninguna de las cepas presentó la capacidad de solubilización de fosfatos

en el medio agar Pikovskaya a pesar que algunas cepas de *A. brasilense* mostraron esta capacidad (Puente *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004). Los mismos resultados fueron obtenidos por Perrig *et al.* (2007) para las cepas Az39 y Cd. Las cinco cepas de *A. brasilense* mostraron diferentes niveles de producción de compuestos indólicos cuando el medio Nfb estuvo suplementado con triptófano como precursor (Tabla 3.1) y menores cantidades fueron producidas cuando las cepas se incubaron en medio Nfb libre de triptófano. Bashan *et al.* (2004) mostraron que las cepas Sp7 y Cd producen este tipo de sustancias. Otros autores han reportado que la cepa Sp7 puede producir compuestos indólicos con (Baca *et al.*, 2012; Pedraza *et al.*, 2004) y sin (Pedraza *et al.*, 2007; Dobbelaere *et al.*, 1999) adición de triptófano al medio de cultivo. Se ha señalado que la producción de compuestos indólicos por parte de algunos nuevos aislamientos de *A. brasilense* obtenidos de frutilla fue menor que los niveles producidos por la cepa Sp7 (Pedraza *et al.*, 2007). Además, se ha mostrado que la cepa Cd tiene una producción mayor de este tipo de compuestos en comparación con la cepa Az39 (Perrig *et al.*, 2007) y que la producción de la cepa 40M fue mayor que la de la cepa Sp7 (Baca *et al.*, 2012). En este trabajo, las cepas Cd y Az39 mostraron niveles similares de producción de compuestos indólicos. Interesantemente, la cepa 42M produjo los mayores niveles de estas sustancias, los cuales superaron a los producidos por las cepas Sp7, Cd y 40M (Tabla 3.1).

No se observaron diferencias significativas entre las cepas de *A. brasilense* evaluadas, respecto a la capacidad de FBN, estimada a través de la actividad nitrogenasa medida por ARA en el medio de cultivo utilizado (Tabla 3.1). El valor promedio obtenido para todas las cepas evaluadas es similar a los valores reportados por otros autores para otras especies de *Azospirillum* (Eckert *et al.*, 2001; Reinhold *et al.*, 1987). Es importante considerar que la FBN estimada mediante esta técnica depende de la formulación del medio de cultivo. Al respecto, mientras que algunos autores reportaron actividad nitrogenasa mediante la técnica de ARA, utilizando un medio con malato para cultivar las cepas Sp7 (Hartmann y Burris, 1987; Hartmann *et al.*, 1986; Pedraza *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2002b) y Cd (Bashan *et al.*, 1989), otros autores encontraron niveles muy bajos de producción de etileno de la cepa Sp7, cultivando esta bacteria en medio con lactato (Katupitiya *et al.*, 1995). Es importante destacar que este es el primer trabajo en demostrar y presentar valores de FBN para las cepas 40M y 42M y para la cepa Az39, junto con la comparación con la FBN de las cepas Sp7 y Cd.

Varios autores han considerado que *Azospirillum* spp. no es capaz de sintetizar la enzima ACC desaminasa, basados en la publicación de Holguin y Glick (2001) que incluía solamente a las

cepas de *A. brasilense* Sp245 y Cd. Sin embargo, algunos autores han demostrado la actividad ACC desaminasa en *A. lipoferum* (Esquivel-Cote *et al.*, 2010) y la presencia del gen *acdS* en algunas especies de *Azospirillum* (Blaha *et al.*, 2006). Hasta el momento, no existen publicaciones que muestren la actividad ACC desaminasa en cepas de *A. brasilense*. En este trabajo se pudo demostrar por primera vez que las cinco cepas de *A. brasilense* evaluadas podrían presentar actividad ACC desaminasa (Tabla 3.1). Resulta muy interesante que las cepas Sp7 y Cd mostraron los mayores y los menores niveles de actividad ACC desaminasa, respectivamente, estimada mediante los valores de absorbancia (Tabla 3.1). En relación a esto, es importante mencionar que la cepa Cd no resultó tan similar a la cepa Sp7, como se ha establecido en la literatura.

Tabla 3.1. Producción de compuestos indólicos, actividad ACC desaminasa y actividad nitrogenasa (ARA) *in vitro* de las cinco cepas de *Azospirillum brasilense*.

	Cepa				
	Sp7	Cd	Az39	40M	42M
Producción de compuestos indólicos ¹ ($\mu\text{g } 10^{-6} \text{ UFC}^{-1}$)	0,50 ^a \pm 0,09	0,44 ^a \pm 0,01	0,60 ^{ab} \pm 0,01	0,50 ^a \pm 0,04	0,74 ^b \pm 0,07
Actividad ACC desaminasa ²	3,90 ^b \pm 1,30	0,24 ^{ab} \pm 0,06	0,17 ^a \pm 0,17	0,37 ^{ab} \pm 0,03	0,22 ^{ab} \pm 0,01
ARA ³ ($\text{nmol C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1}$)	159,42 ^a \pm 36,40	nd	102,65 ^a \pm 52,79	114,32 ^a \pm 12,60	77,45 ^a \pm 2,78

¹Producción de compuestos indólicos en matraces con medio Nfb suplementado con triptófano (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas en los valores de absorbancia promedio entre las cepas, según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

²Actividad ACC desaminasa estimada por el crecimiento obtenido en celdas conteniendo medio Nfb con ACC como única fuente nitrogenada. Valores de absorbancia promedio estandarizados \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas en los valores de absorbancia promedio entre las cepas, según la prueba de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

³Actividad nitrogenasa estimada por reducción de acetileno. Valores promedio de etileno producido \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas en los valores de etileno producidos por las cepas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). nd: no determinado

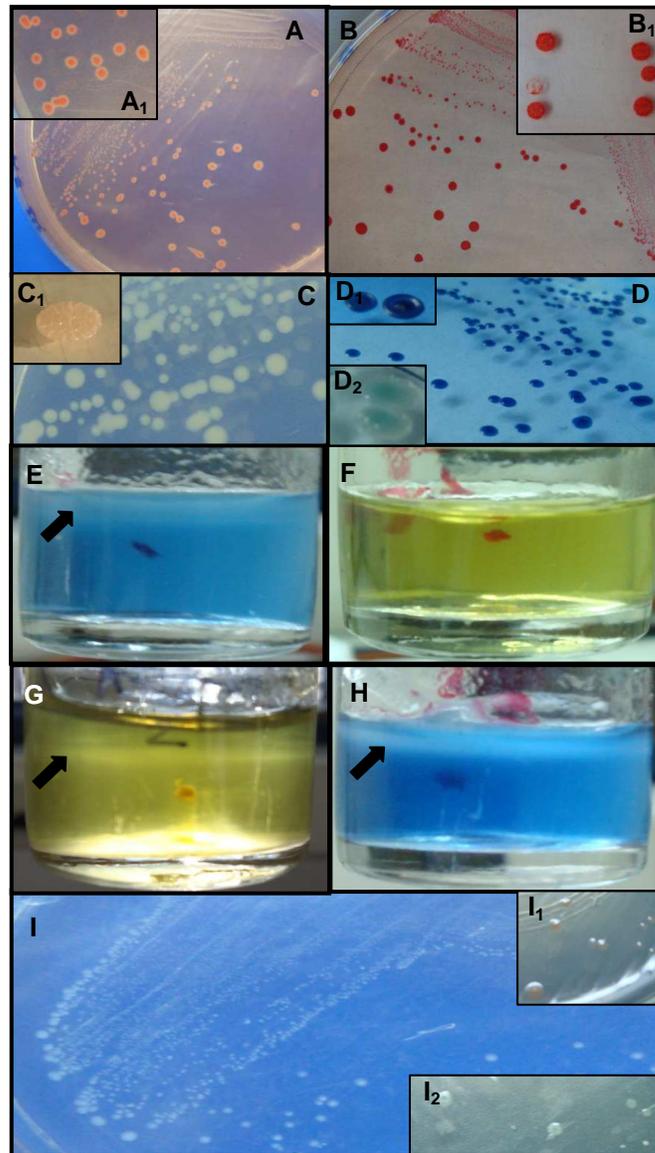


Figura 3.1 Imágenes de morfología de colonias y crecimiento en forma de película típica en algunos de los medios de cultivos evaluados. Colonias redondas, rugosas y secas, con coloración roja y un halo de coloración blanca de la cepa Az39 creciendo en medio RC (A y A1). Colonias típicas de *A. brasilense* en los medios RC (B y B1), TYG (C1) y Nfb (D y D1). Colonias no típicas de la cepa Az39 en los medios TYG (C) y Nfb (D2). Crecimiento típico formando una película con forma de velo de las cepas de *A. brasilense* creciendo en los medios de cultivo Nfb ss (E), LGI ss (G) y JNfb ss (H). Las flechas negras indican la ubicación de la película. Ninguna de las cepas creció en el medio LGglu ss (F). Colonias redondas, rugosas y secas, con coloración blanca de *A. brasilense* creciendo en el medio LGglu (I e I2). Colonias redondas, rugosas y secas, con coloración rosada de la cepa Cd en el medio LGglu (I1).

3.3.3. Análisis de los CLPP.

El análisis discriminante de los CLPP luego de 96 horas de incubación mostró que las cepas Az39 y Cd presentan diferencias en sus fisiologías (Figura 3.2). Ambos ejes explicaron el 91% de la varianza total. El eje 1 estuvo compuesto principalmente por manitol, prolina, sorbitol, ácido oxálico, glutamina, ácido láctico y arabinosa. El eje 2 estuvo principalmente compuesto por histidina y arabinosa. El análisis del número de fuentes de C utilizadas (Figura 3.3) mostró que las cinco cepas usaron un mayor número de sustratos a medida que el tiempo de incubación aumentó. Entre las 48 y 72 horas de incubación las cepas presentaron diferencias en la cantidad de fuentes de C utilizadas. A las 96 horas no se observaron diferencias en la cantidad de sustratos utilizados, pero sí se mantienen las diferencias en el tipo de sustrato utilizado (Tabla 3.2). La fisiología de una determinada cepa, analizada mediante CLPP, podría explicar la capacidad de esa cepa de adaptarse a condiciones ambientales variables. En la rizósfera, el CLPP de una cepa podría definir, entre otros procesos, la capacidad de colonización radical, de formar biofilms o la capacidad de controlar patógenos vegetales.

Los CLPP han sido tradicionalmente utilizados para la identificación y clasificación de cultivos puros, como también para el estudio de diferentes comunidades microbianas (Di Salvo y García de Salamone, 2012). En este trabajo, el análisis discriminante mostró que las cepas Sp7, 40M y 42M poseen similares perfiles fisiológicos (Figura 3.2). Además, las cepas Az39 y Cd presentaron diferentes perfiles fisiológicos entre ellas y respecto a las otras tres cepas (Figura 3.2). Algunos autores señalaron similitudes genéticas entre las cepas Sp7 y Cd (Tarrand *et al.*, 1978; Gündisch *et al.*, 1993) pero en este trabajo se presentaron diferencias fisiológicas entre ambas cepas, como así también, diferencias en los distintos mecanismos PGP evaluados y discutidos anteriormente. Diferencias fisiológicas entre cepas de *Pseudomonas fluorescens* han sido reportadas utilizándose las microplacas GN y el software de identificación de Biolog (Biolog Inc., Hayward, California, USA) (García de Salamone *et al.*, 2001). Aplicada al género *Azospirillum*, esta metodología se utilizó únicamente para diferenciar especies (Eid y Sherwood, 1995). Este es el primer trabajo que muestra similitudes y diferencias en los perfiles fisiológicos de un grupo de cepas de *A. brasilense*.

Algunos autores han demostrado que algunas especies del género *Azospirillum* son capaces de degradar petróleo presente en suelos contaminados y posibles nuevas especies han sido aisladas de estos suelos (Muratova *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Reis *et al.*,

2011). En base a esto, la posibilidad de incorporar compuestos xenobióticos como fuentes de C en las microplacas (Di Salvo y García de Salamone, 2012) permite la evaluación del potencial de degradación de cualquier especie bacteriana. En este trabajo, las cinco cepas de *A. brasilense* mostraron bajos valores de absorbancia en las celdas conteniendo glifosato como único sustrato (datos no mostrados), en comparación con el desarrollo observado en todas las fuentes de C evaluadas, por lo que se podría concluir que *A. brasilense* no fue capaz de utilizar esta sustancia como fuente de C en el tiempo de incubación considerado. A pesar de esto, las cepas Sp7 y Az39 mostraron valores relativamente más altos que las cepas 40M y 42M a las 48 horas de incubación (datos no mostrados). Estos resultados muestran que podría resultar interesante realizar más estudios acerca del potencial de degradación de compuestos xenobióticos de *A. brasilense*, tales como el herbicida glifosato.

Aunque *A. brasilense* posee las enzimas necesarias para la metabolización de la glucosa, en medios de cultivo líquidos, esta fuente de C tiene una baja tasa de transporte hacia el interior de las células (Hartmann y Zimmer, 1994; Loh *et al.*, 1984). Sin embargo, Goebel y Krieg (1984) han señalado que la capacidad de *A. brasilense* para crecer en medios de cultivo con glucosa variaba entre cepas. Además, y tal como se mencionó previamente, se ha establecido que *A. brasilense* no es capaz de crecer cuando el sustrato carbonado disponible es la sacarosa. De acuerdo con esto, y contrariamente a lo observado en los medios sólidos y semisólidos evaluados, en este trabajo ninguna de las cepas presentó desarrollo en las celdas de las microplacas que contenían estas dos fuentes de C, bajo nuestras condiciones experimentales (Tabla 3.2). Además, Tarrand *et al.* (1978) y Hartmann y Zimmer (1994) establecieron que *A. brasilense* no es capaz de utilizar manitol o sorbitol como fuentes de C. De acuerdo con esto, ninguna de las cepas evaluadas creció en las celdas conteniendo estas fuentes de C (Tabla 3.2). Sumado a esto, algunos autores han demostrado que *Azospirillum* posee la capacidad de fijar N utilizando fructosa, arabinosa o galactosa como fuentes de C (Martínez-Drets *et al.*, 1984; Goebel y Krieg, 1984). En este trabajo, las cinco cepas evaluadas crecieron utilizando fructosa y galactosa, excepto la cepa Cd que no presentó crecimiento en las celdas conteniendo galactosa; y todas las cepas, excepto la cepa 40M, crecieron en las celdas conteniendo arabinosa como sustrato carbonado (Tabla 3.2).

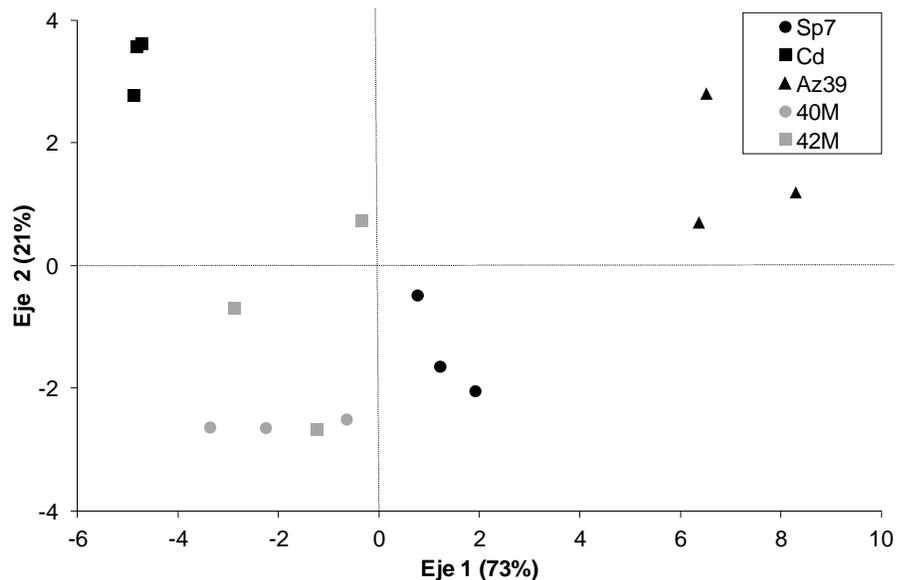


Figura 3.2 Análisis discriminante de los CLPP de las cinco cepas evaluadas de *Azospirillum brasilense*. El análisis fue realizado con los valores de absorbancia correspondientes a las 96 horas de incubación. Cada cepa fue analizada por triplicado.

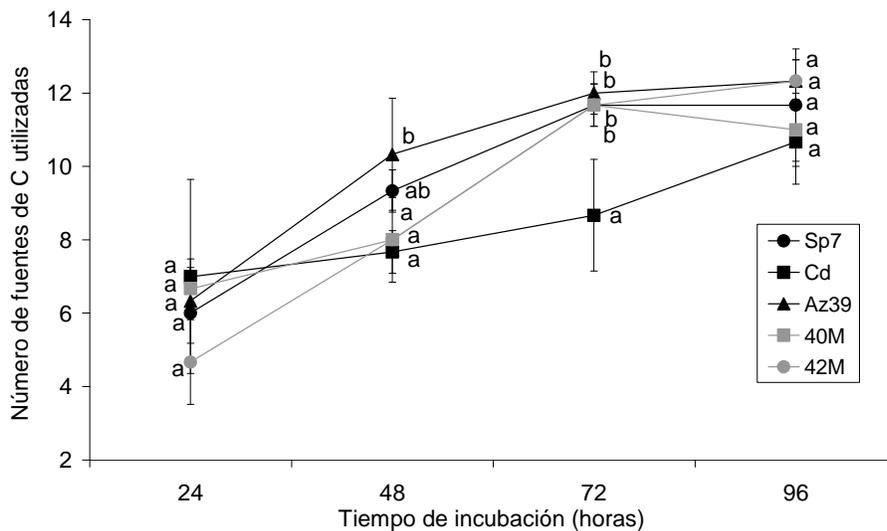


Figura 3.3 Número de fuentes de carbono (C) utilizadas por las cinco cepas evaluadas de *Azospirillum brasilense*. Se consideró que un sustrato carbonado era utilizado cuando su valor de absorbancia superó al valor desarrollo de AWCD, para cada cepa en cada tiempo de incubación. Corresponden a valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre cepas para cada tiempo de incubación, según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tabla 3.2 Valores de absorbancia (590 nm) de las fuentes de carbono (C) utilizadas por las cinco cepas de *Azospirillum brasilense* en diferentes tiempos de incubación.

	Fuentes de C	Sp7	Cd	Az39	40M	42M
48 horas de incubación	Arabinosa	0,08 ^a ± 0,01	0,22 ^b ± 0,03	0,14 ^{ab} ± 0,01	-	0,18 ^b ± 0,03
	Arginina	-	-	0,16 ^a ± 0,00	0,10 ^a ± 0,00	0,09 ^a ± 0,00
	Ácido cítrico	-	-	0,17 ± 0,01	-	-
	Fructosa	0,27 ^a ± 0,03	0,23 ^a ± 0,09	0,36 ^a ± 0,05	0,24 ^a ± 0,05	0,23 ^a ± 0,02
	Galactosa	0,08 ^a ± 0,01	-	0,19 ^b ± 0,01	0,17 ^{ab} ± 0,05	-
	Glicerina	0,21 ^a ± 0,01	0,34 ^a ± 0,09	0,29 ^a ± 0,05	0,22 ^a ± 0,00	0,23 ^a ± 0,02
	Glutamina	0,09 ^a ± 0,00	0,21 ^b ± 0,02	0,13 ^a ± 0,02	0,11 ^a ± 0,01	0,09 ^a ± 0,00
	Ácido itacónico	-	-	0,13 ± 0,02	-	-
	Ácido láctico	0,26 ^b ± 0,02	0,28 ^b ± 0,04	0,17 ^a ± 0,01	0,28 ^b ± 0,01	0,28 ^b ± 0,04
	Ácido málico	0,08 ^a ± 0,00	0,12 ^a ± 0,03	-	0,09 ^a ± 0,00	0,08 ^a ± 0,00
	Prolina	0,17 ^{ab} ± 0,01	0,16 ^a ± 0,09	0,35 ^b ± 0,07	0,18 ^{ab} ± 0,00	0,18 ^{ab} ± 0,03
Xilosa	0,08 ± 0,01	-	-	-	-	
72 horas de incubación	Arabinosa	0,08 ^a ± 0,00	0,23 ^b ± 0,04	0,14 ^{ab} ± 0,03	-	0,15 ^{ab} ± 0,02
	Arginina	0,08 ^a ± 0,01	-	0,15 ^b ± 0,00	0,10 ^{ab} ± 0,01	0,09 ^{ab} ± 0,01
	Ácido cítrico	0,09 ^a ± 0,01	-	0,14 ^a ± 0,03	-	-
	Fructosa	0,24 ^b ± 0,01	0,36 ^c ± 0,01	0,20 ^{ab} ± 0,01	0,16 ^a ± 0,03	0,18 ^a ± 0,01
	Galactosa	0,13 ^a ± 0,05	-	0,16 ^a ± 0,02	0,11 ^a ± 0,01	0,08 ^a ± 0,01
	Glicerina	0,18 ^a ± 0,02	0,24 ^a ± 0,05	0,22 ^a ± 0,01	0,21 ^a ± 0,00	0,21 ^a ± 0,02
	Glutamina	0,07 ^a ± 0,01	0,15 ^b ± 0,01	0,11 ^{ab} ± 0,01	0,09 ^{ab} ± 0,01	0,08 ^a ± 0,01
	Ácido itacónico	0,11 ^a ± 0,01	0,28 ^c ± 0,01	0,20 ^b ± 0,00	0,12 ^a ± 0,03	0,09 ^a ± 0,03
	Ácido láctico	0,21 ^a ± 0,02	0,16 ^a ± 0,05	0,17 ^a ± 0,01	0,16 ^a ± 0,01	0,16 ^a ± 0,02
	Ácido málico	0,09 ^a ± 0,02	0,10 ^a ± 0,00	0,09 ^a ± 0,00	0,08 ^a ± 0,01	0,08 ^a ± 0,01
	Maltosa	-	-	-	0,06 ± 0,01	-
	Prolina	0,16 ^a ± 0,01	-	0,24 ^b ± 0,01	0,19 ^a ± 0,02	0,17 ^a ± 0,01
	Xilosa	0,13 ^a ± 0,01	0,19 ^a ± 0,09	0,17 ^a ± 0,04	0,08 ^a ± 0,01	0,09 ^a ± 0,01
96 horas de incubación	Arabinosa	0,09 ^a ± 0,02	0,18 ^b ± 0,02	0,13 ^{ab} ± 0,03	-	0,14 ^{ab} ± 0,03
	Arginina	0,08 ^a ± 0,01	0,14 ^a ± 0,05	0,12 ^a ± 0,02	0,90 ^a ± 0,01	0,90 ^a ± 0,02
	Ácido cítrico	-	0,17 ^b ± 0,05	0,12 ^{ab} ± 0,03	-	0,07 ^a ± 0,00
	Fructosa	0,22 ^{bc} ± 0,01	0,23 ^c ± 0,02	0,20 ^{abc} ± 0,01	0,15 ^a ± 0,04	0,17 ^{ab} ± 0,00
	Galactosa	0,14 ^a ± 0,04	-	0,16 ^a ± 0,02	0,09 ^a ± 0,01	0,12 ^a ± 0,02
	Glicerina	0,17 ^a ± 0,01	0,27 ^a ± 0,08	0,20 ^a ± 0,03	0,20 ^a ± 0,01	0,19 ^a ± 0,01
	Glutamina	-	0,11 ^a ± 0,02	0,11 ^a ± 0,04	0,08 ^a ± 0,01	0,08 ^a ± 0,01
	Ácido itacónico	0,14 ^a ± 0,03	0,28 ^b ± 0,05	0,17 ^a ± 0,01	0,16 ^a ± 0,03	0,13 ^a ± 0,02
	Ácido láctico	0,22 ^b ± 0,01	0,21 ^b ± 0,02	0,18 ^{ab} ± 0,01	0,14 ^a ± 0,01	0,15 ^a ± 0,03
	Ácido málico	-	-	0,10 ^a ± 0,01	0,07 ^a ± 0,01	0,07 ^a ± 0,00
	Maltosa	0,08 ^a ± 0,01	0,09 ^a ± 0,02	-	0,07 ^a ± 0,01	-
	Prolina	0,14 ^a ± 0,03	-	0,26 ^b ± 0,01	0,17 ^a ± 0,01	0,16 ^a ± 0,01
Xilosa	0,13 ^a ± 0,01	-	0,22 ^b ± 0,01	0,11 ^a ± 0,01	0,10 ^a ± 0,02	

El símbolo (-) indica que dicha fuente de C presenta un valor menor al valor del AWCD de cada cepa a cada tiempo de incubación. Corresponden a valores de absorbancia (590 nm) promedio ± desviación estándar. Valores de desviación estándar menores a 0,005 son mostrados como 0,00.

Letras distintas indican diferencias significativas en los valores de absorbancia promedio entre cepas para cada fuente de C, según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En resumen, y tal como se mencionó previamente, aunque las cinco cepas evaluadas corresponden a *A. brasilense*, en este trabajo se muestra que el uso de fuentes de C difiere entre las mismas. Podrían considerarse los resultados de este perfil de uso de fuentes de C para la formulación de medios de cultivo destinados al crecimiento de esta especie bacteriana o, incluso, para la formulación de medios de cultivo para la producción de inoculantes a escala industrial. Sin embargo, no hay que perder de vista que la metodología de CLPP implica determinadas condiciones de cultivo que pueden diferir de las utilizadas para cumplir con el objetivo de obtener crecimiento masivo de células bacterianas. Prueba de esto es que algunas fuentes de C presentes en la Tabla 3.2, como por ejemplo el ácido málico, comúnmente utilizado en la formulación de medios de cultivo tales como el medio Nfb (ver anexo 1), generaron un bajo nivel de desarrollo de las cinco cepas evaluadas en las microplacas utilizadas para el análisis de CLPP, en comparación con otras fuentes de C tales como fructosa o ácido láctico (Tabla 3.2).

3.3.4. Perfiles de FAME.

La Tabla 3.3 muestra que cinco ácidos grasos estuvieron presentes en todas las cepas: octadecanoato (18:1), dodecanoato (12:0), hexadecanoato (16:1), hexadecanoato (16:0), y un ácido graso desconocido con ECL 19. Aunque no en todas las cepas, también se detectaron los ácidos grasos octadecanoato (18:0), 3-hidroxi-tetradecanoato (3-OH-14:0), tetradecanoato (14:0) y un ácido graso desconocido con ECL 17. A pesar que los perfiles FAME de todas las cepas analizadas fueron cualitativamente similares, éstos pudieron ser agrupados mediante un análisis discriminante de los valores de FAME (Figura 3.4). Ambos ejes explicaron el 89% de la varianza total. El eje 1 estuvo compuesto principalmente por los ácidos grasos 12:0, 16:0, 16:1 y 18:1. El eje 2 estuvo principalmente compuesto por los ácidos grasos 12:0 y ECL 19. La cepa Cd mostró un perfil de FAME diferente de las otras cepas (Figura 3.4), con un contenido de ácido graso 18:1 entre 53 y 66%, de 16:1 más 16:0 entre 18 y 35%, cantidades menores de los ácidos grasos 18:0, 12:0, 3-OH-14:0, 14:0, y los dos ácidos grasos desconocidos con 17 y 19 de ECL (Tabla 3.3). También la cepa 42M mostró un perfil de FAME diferente al de las otras cepas (Figura 3.4), con un contenido de ácido graso 18:1 entre 39 y 49%, siendo la cepa que presentó el menor contenido de este ácido graso, con un contenido de ácido graso 16:1 más 16:0 entre 13 y 24%, de 12:0 entre 26 y 45%, siendo la cepa que presentó el mayor contenido de este ácido graso (Tabla 3.3). Las cepas Sp7 y

Az39 mostraron perfiles de FAME similares (Figura 3.4), con una composición del ácido graso 18:1 entre 65 y 85%, del 16:1 más 16:0 entre 4 y 11,5%, del 12:0 entre 7 y 16,5% (Tabla 3.3). La cepa 40M tuvo un perfil FAME distintivo (Figura 3.4), presentando una composición de ácidos grasos con valores intermedios a los de las otras cepas (Tabla 3.3).

Las cinco cepas evaluadas presentaron un perfil de FAME similar al observado para diferentes cepas de *A. brasilense* (Schenk y Werner, 1988). En general, el perfil de ácidos grasos de este género incluye dos mayoritarios, el ácido graso 18:1 cis-9, con un contenido entre 52 y 63%, y el ácido graso 16:1 cis-9, con un contenido entre 12 y 16,5%, y otros siete ácidos grasos presentes en diferentes proporciones: 12:0, 14:0, 3-OH-14:0, 16:0, 18:0, y dos desconocidos con 17 y 19 de ECL (Schenk y Werner, 1988; Olubayi *et al.*, 1998; Tapay y Kogamata, 1989). Schenk y Werner (1998) mostraron que los únicos dos ácidos grasos no saturados corresponden a la mayor proporción de ácidos grasos, encontrándose aproximadamente el 80% del contenido total, y que, a pesar que el ácido graso 18:0 es uno de los minoritarios, éste es característico de *A. brasilense*. Sin embargo, estos autores no han discutido las posibles diferencias entre cepas de diversas especies de *Azospirillum*. En base a las diferencias observadas en la composición de ácidos grasos de las cepas estudiadas en este trabajo (Tabla 3.3), éstas pudieron ser clasificadas en cuatro diferentes grupos (Figura 3.4), y este es el primer trabajo en reportar diferencias en los perfiles de FAME entre cepas de *A. brasilense*.

Tabla 3.3 Composición de ácidos grasos celulares de las cinco cepas de *Azospirillum brasilense*.

Ácidos grasos	Porcentaje promedio ± desviación estándar				
	Sp7	Cd	Az39	40M	42M
12:0	9,1 ± 2,1	1,0 ± 0,3	13,4 ± 3,1	13,8 ± 0,8	35,6 ± 9,1
14:0	nd	0,7 ± 0,4	nd	4,0 ± 1,0	nd
3-OH-14:0	nd	1,5 ± 0,3	nd	nd	nd
16:1	4,4 ± 0,6	14,5 ± 3,6	4,9 ± 0,9	6,6 ± 1,0	9,7 ± 3,2
16:0	0,5 ± 0,1	12,1 ± 4,8	0,7 ± 0,2	3,0 ± 0,9	8,7 ± 2,2
ECL 17	nd	1,2 ± 0,5	nd	Nd	nd
18:1	81,7 ± 3,2	58,3 ± 5,7	76,8 ± 5,7	72,6 ± 7,1	44,1 ± 5,2
18:0	nd	1,8 ± 0,9	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,1
ECL 19	1,8 ± 0,6	2,1 ± 0,9	3,8 ± 0,9	1,8 ± 0,7	1,2 ± 0,9

nd: no detectado.

ECL (sigla en inglés de longitud equivalente de cadena) utilizado para ácidos grasos no identificados.

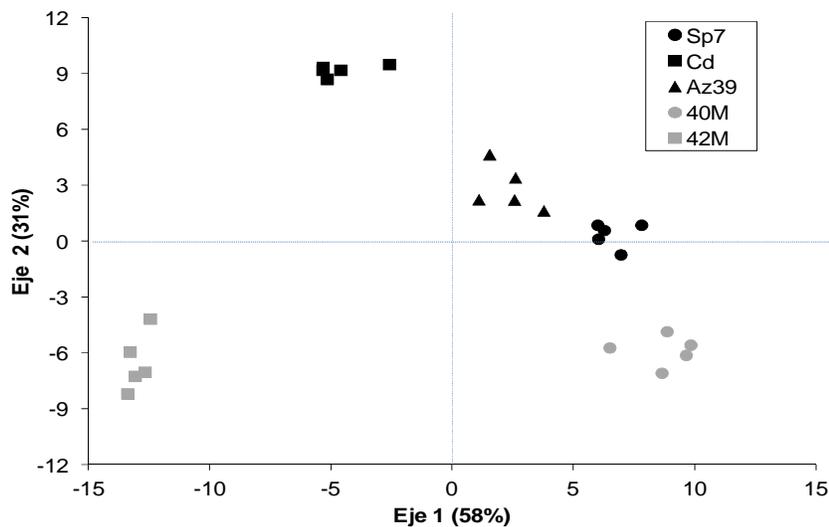


Figura 3.4 Análisis discriminante de los perfiles FAME de las cinco cepas evaluadas de *Azospirillum brasilense*. El análisis fue realizado con los valores en porcentaje de la composición de ácidos grasos. Cada cepa se evaluó por quintuplicado.

3.3.5. Secuenciación del gen *nifH*.

La enzima nitrogenasa se encuentra codificada en el genoma bacteriano por los genes *nif*, los cuales han sido utilizados para el estudio de relaciones filogenéticas entre diversas especies de bacterias con capacidad de FBN (Sarita *et al.*, 2008). Entre ellos, el gen *nifH* ha sido ampliamente utilizado para estudios filogenéticos y de diversidad de este grupo funcional (Buée *et al.*, 2009; Elbeltagy y Ando, 2008; García de Salamone *et al.*, 2010; Lovell *et al.*, 2000; Sarita *et al.*, 2008), incluso con resultados similares a los estudios basados en el gen 16S ARNr (García de Salamone *et al.*, 2010; Hennecke *et al.*, 1985; Nogales, 2005). Debido a ello, en este trabajo se obtuvieron las secuencias del gen *nifH* de las cepas 40M y 42M de un tamaño de alrededor de 300 pares de bases.

La secuencia para la cepa 40M fue:
 5'-GGGGCCTGGTTCTCGCGGATGGGCATGGCGAA-CCGCCGCACACCACGTGCCAGCACGTC
 GTAGGAGAGGTAGTCC-CGTCGTCGTAGGCGCGTTCTCTTCGAGGAGGTTGATCGAGGTGATC
 ACTCCGCGGCCGCGCAGCCGAGCCCCGGCTCCGGACCGCCGGACTCGACGCACTTGATGCC
 CTTGTAGCCGATCTTGAGAACGTCCTCGAGCTCCAGATCCTCGACCGAGCCGGCTTCGGCGGC
 GAGGTGCAGCACGGTGTCTCTGCGCCTCGGCGTGCAGGATCAGGCGGGTTCGAGTCCG-3'.

secuencia para la cepa 42M fue:

```
5'-GGGGCCTTGTTTCCGCGGATGGGCATGGCGAAACCGCCGCACACCACGTCGCCAGCACGTC  
GTAGGAGACGTAGTCCACGTCGTCGTAGGCGCCGTTCTCTTCGAGGAGGTTGATCGAGGTGAT  
CACTCCGCGGGCCGGCGCAGCCGACCCCGGCTCCGGACCGCCGGAGTCGACGCACTTGATGC  
CCTTGTAGCCGATCTTGAGAACGTCCTCGAGCTCCAGATCCTCGACCGAGCCGGCTTCGGCGG  
CGAGGTGCAGCACGGTGTCTGCGCCTTGGCGTGCAGGATCAGGCGGGTCGAGTCCGT-3'.
```

La comparación con la base de datos del NCBI demostró que ambas secuencias presentan entre un 98 y un 99% de similitud con secuencias de nucleótidos conocidas del gen *nifH* de otras cepas de *A. brasilense*. Ambas secuencias fueron enviadas a la base de datos del NCBI para ser depositadas y que estén a disposición de futuras investigaciones. Actualmente se encuentran en revisión para la asignación de los números de acceso de GenBank respectivos.

En este capítulo se realizó una caracterización de la fisiología y de ciertos mecanismos de PGP de las dos cepas de *A. brasilense* utilizadas como inoculantes en todos los ensayos a campo, realizando en simultáneo, una comparación con tres cepas de *A. brasilense* consideradas como cepas control. A lo largo de esta caracterización se encontraron algunos resultados esperables para esta bacteria, pero también otros resultados no concordantes con lo establecido en la bibliografía respectiva comúnmente utilizada para el aislamiento y caracterización de esta PGPR, por lo que se evidencia la necesidad de continuar con estudios para ampliar y revisar la información disponible. Además, en este capítulo se demostró la utilidad de la técnica de CLPP como una herramienta para detectar diferencias fisiológicas entre cepas de *A. brasilense*, antes de la aplicación de métodos moleculares. Asimismo, se comprobó que también la técnica de los perfiles de FAME puede ser utilizada para la diferenciación entre cepas de *A. brasilense*. La técnica de CLPP también posibilita la evaluación *in vitro* del potencial de degradación de compuestos xenobióticos, ampliamente utilizados en la agricultura. Finalmente, los resultados de este capítulo constituyen un aporte para el establecimiento de un protocolo de aislamiento y caracterización de *A. brasilense*, posibilitando la mejora de los procesos biotecnológicos y del éxito de la práctica de inoculación de cultivos, en pos de una agricultura más sustentable.

Capítulo 4. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada en cultivo de trigo.

4.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la interacción entre la inoculación con *A. brasilense* y la fertilización nitrogenada sobre las comunidades microbianas rizosféricas nativas y la micorrización natural del cultivo de trigo, se realizó un ensayo a campo en la campaña 2009-2010, en el establecimiento “La Aurora”, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires (35° 02' 36" latitud sur y 59° 37' 59" longitud oeste) (Figura 1 del anexo 2). El suelo es clasificado como Argiudol ácuico de textura franco arenosa, serie Chacabuco (Geolnta, 2013) (Figura 2 del anexo 2). Las características químicas de los primeros 20 cm a la siembra fueron: pH 6.1 (1:2,5 suelo:agua), conductividad 0,45 dS m⁻¹, 3,9% de materia orgánica, 59,7 ppm de NO₃, 5,37 ppm de P Bray. El promedio de precipitaciones ocurridas en Las Flores fue de 473 mm durante el ciclo del cultivo (SMN, 2014a).

El cultivar de trigo utilizado en este ensayo fue Klein Castor (Klein®), cultivar de ciclo corto con buena tolerancia a manchas foliares. Antes de la siembra, el barbecho químico se realizó con una aplicación combinada de 1,7 L ha⁻¹ de glifosato (Touchdown® Syngenta®) y 5 g ha⁻¹ de metsulfurón metil (Metsulfurón 60 Zamba®). La secuencia de cultivos en el lote utilizado era soja-trigo/soja-maíz, bajo siembra directa. La siembra del cultivo del ensayo se realizó el 18 de Julio de 2009. La densidad de siembra fue 150 kg ha⁻¹ con un espacio entre hileras de 17,5 cm. Se realizó una fertilización a la siembra con 20 kg P ha⁻¹ (100 kg SPT ha⁻¹). Se realizó una aplicación de 200 ml ha⁻¹ de dicamba (Dicamba Zamba®) y 5 g ha⁻¹ de metsulfurón metil (Metsulfurón 60 Zamba®), en la etapa de macollaje para control de malezas.

El diseño del ensayo fue en bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial de dos factores. Se determinaron cuatro bloques en forma perpendicular a la pendiente topográfica, menor al 0,5%. Uno de los factores fue la inoculación con cuatro niveles (testigo T sin inocular, inoculado con la cepa 40M, inoculado con la cepa 42M e inoculado con ambas cepas, en adelante 40M+42M). La dosis de inoculación aplicada de cada uno de los inoculantes fue de 15 ml kg⁻¹ de semilla. El recuento de bacterias del inoculante 40M fue de 6,6 x 10⁸ UFC ml⁻¹, el de 42M fue de 2,0 x 10⁸ UFC ml⁻¹ y el de 40M+42M fue de 3,7 x 10⁸ UFC ml⁻¹. El otro factor evaluado fue la fertilización nitrogenada, en dos niveles (control sin fertilizar, en adelante 0N, y fertilizado, en adelante 46N). La

fertilización se realizó en la etapa de macollaje, con 46 kg N ha⁻¹ Solmix®, PASA Fertilizantes (Petrobras; 28% N y 2,6% S).

En este ensayo se realizaron los muestreos a los 88 DDS, en estado de encañazón (Elongación del tallo, Estado 3 de Zadoks, 1974) y a los 133 DDS, en estado de llenado de granos (Desarrollo pastoso del grano, Estado 8 de Zadoks, 1974). El muestreo de rendimiento se realizó a la cosecha de cultivo (154 DDS). Se realizaron las determinaciones de biomasa aérea, componentes del rendimiento, recuento de microorganismos MFN y micorrización natural. Con la lectura de absorbancia de 48 hs se realizó el análisis discriminante de los CLPP. Además, a partir de las muestras de los tratamientos T 0N, 40M+42M 0N y T 46N se analizaron los perfiles estructurales mediante el análisis de T-RFLP del gen 16S ARNr. Finalmente, se realizó el análisis del índice *H'* obtenidos a partir de los análisis de CLPP y T-RFLP.

4.2. Resultados y discusión

A la cosecha del cultivo, se observó que ninguno de los factores evaluados produjo una respuesta significativa sobre el rendimiento o sobre la generación de biomasa aérea, siendo éstos en promedio de 5645 y 7263 kg ha⁻¹, respectivamente. Los rendimientos obtenidos en el ensayo fueron mayores al promedio registrado para el cultivo de trigo en el partido de Navarro, de 4900 kg ha⁻¹ (MAGyP, 2014). Probablemente, esto se deba a que este promedio incluye cultivos realizados con diferentes variedades de trigo y bajo diversos manejos agrícolas, como aplicación o no de inoculantes y fertilizantes. Éstos no necesariamente son similares a los aplicados en este trabajo, lo que puede explicar las diferencias observadas. Las precipitaciones registradas durante el período del ensayo no constituyeron una limitante para el crecimiento del cultivo, debido a que éstas fueron mayores al promedio 1981-1990 de 427 mm observado en Las Flores en el mismo lapso del tiempo, (SMN, 2014b). Se consideraron los datos de la estación meteorológica de Las Flores del Servicio Meteorológico Nacional por ser la fuente de información más cercana a la zona del ensayo y con características climáticas más similares a éste.

A pesar de no observarse diferencias significativas, los mayores valores de rendimiento y biomasa aérea fueron obtenidos en las parcelas no fertilizadas e inoculadas con la cepa 42M, seguidas por las parcelas inoculadas con 42M y fertilizadas con N. Durante el estado de encañazón,

tampoco se observaron efectos la inoculación y la fertilización sobre las variables número de plantas ha^{-1} , con un promedio de 1959244 plantas ha^{-1} , ni sobre el número de macollos por planta, en un promedio de 4 macollos por planta, ni sobre la biomasa aérea y radical, en un promedio de 4485 y 3467 kg ha^{-1} , respectivamente. Durante el estado de llenado de granos, tampoco se observaron efectos de los tratamientos evaluados sobre las variables número de espigas ha^{-1} , en un promedio de 6535450 espigas ha^{-1} , ni sobre la biomasa aérea y radical, en un promedio de 14564 y 4276 kg ha^{-1} , respectivamente. Tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de IC, en un promedio de 0,37 para todos los tratamientos aplicados.

No se observaron efectos de la inoculación y de la fertilización sobre el NMP de microorganismos MFN determinado en ambos estados ontogénicos del cultivo de trigo evaluados. El recuento de este grupo funcional durante el estado de encañazón fue significativamente mayor que el recuento en llenado de granos que, expresados en $\log \text{NMP g}^{-1}$ de raíz seca fueron iguales a 6,09 y 5,40, respectivamente. El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de encañazón se presenta en la Figura 4.1. Ambos ejes explicaron el 52% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por histidina, fructosa, glutamina y ácido láctico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por glicina y tween 20. Se observó que la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas no estuvo determinada por la interacción entre el tratamiento de inoculación y el nivel de fertilización aplicados (Figura 4.1). En la Figura 4.2 se presenta el análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de llenado de granos. Ambos ejes explicaron el 58% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido cítrico y glutamina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por glutamina. Al igual que en el estado de encañazón (Figura 4.1), en el estado de llenado de grano, los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas rizosféricas no estuvieron determinadas por los tratamientos evaluados (Figura 4.2).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 4.3. Ambos ejes explicaron el 87% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por glicina, xilosa, ácido láctico y ácido oxálico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ácido cítrico, arginina e histidina. El análisis discriminante de los CLPP mostró que la fisiología de las comunidades microbianas

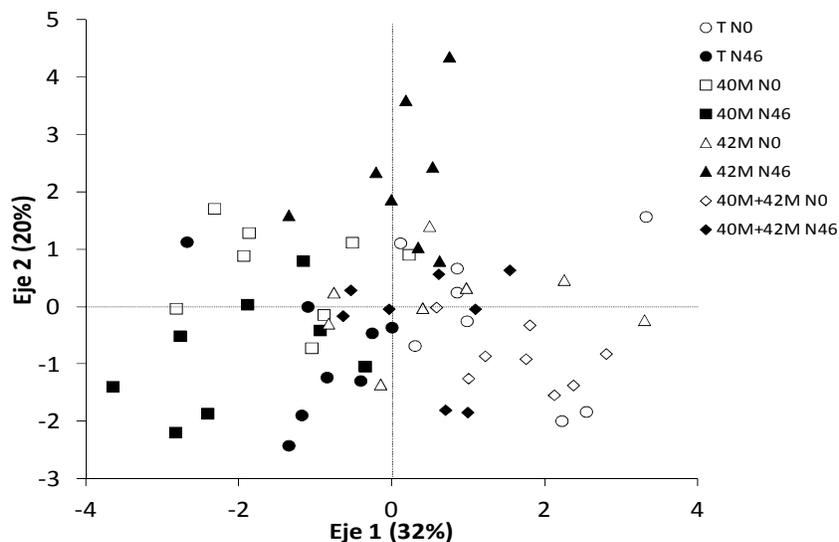


Figura 4.1. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de encañazón, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 48 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

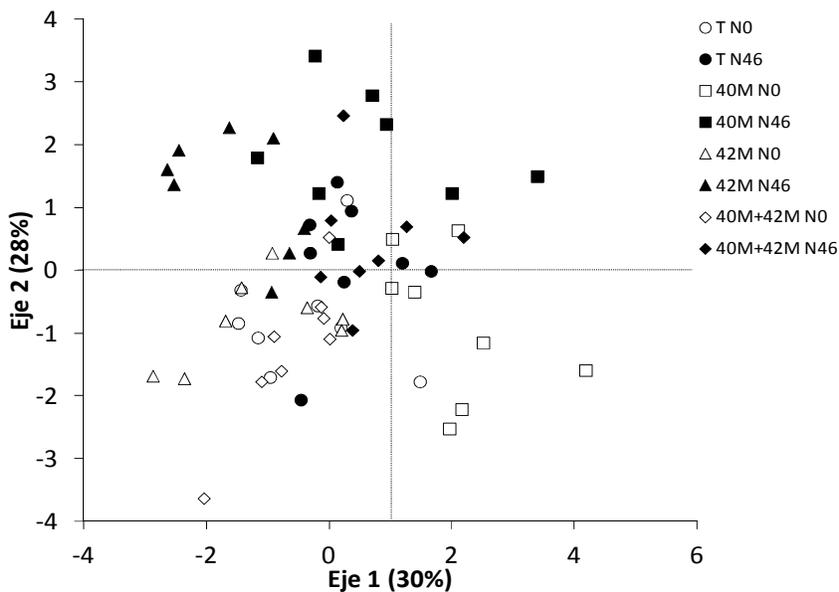


Figura 4.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 48 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

presentes en la rizósfera de las plantas estuvo determinada, principalmente, por el estado ontogénico del cultivo (Figura 4.3) más que por los tratamientos de inoculación y fertilización aplicados (Figuras 4.1 y 4.2). El análisis del índice H' determinó que la diversidad funcional fue significativamente (2,94) durante el estado de encañazón que durante el llenado de grano (2,89). No se observaron diferencias significativas para este índice entre los distintos tratamientos en ninguno de los dos momentos del ciclo del cultivo. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

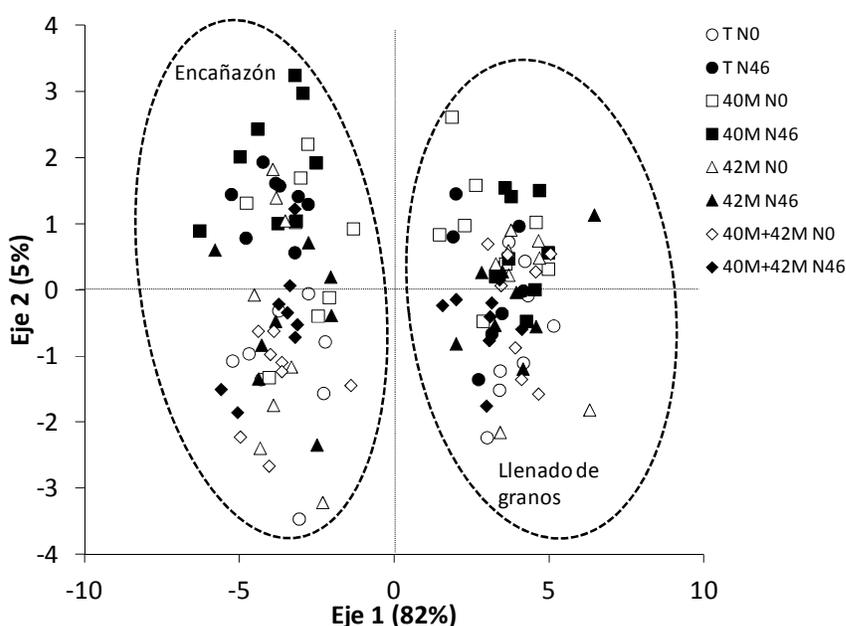


Figura 4.3 Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 48 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El cultivo de trigo de este ensayo presentó un alto porcentaje de colonización radical en ambos estados ontogénicos evaluados (Tabla 4.1). La densidad de longitud radical fue un 19% mayor en el estado de llenado de grano, en comparación con el estado de encañazón. En relación a las estructuras fúngicas, en el estado de llenado de grano se observó un 15% más de colonización

radical, un 26% más de arbusculos y un 155% más de esporas, pero un 38% menos de vesículas, en comparación con los porcentajes determinados en el estado de encañazón (Tabla 4.1). En el estado de llenado de grano se observó que las plantas fertilizadas presentaron un 16% menos de arbusculos y 54% menos de esporas, en comparación con las plantas testigo no fertilizadas (Tabla 4.2). La fertilización no modificó la micorrización observada en el estado de encañazón. Se debe destacar que la aplicación de inoculante no produjo diferencias significativas en las variables de micorrización evaluadas en ambos momentos de muestreo. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a la micorrización natural serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

Tabla 4.1. Colonización radical y estructuras de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Densidad de				
	Longitud Radical (cm/cm ³)	Colonización radical (%)	Arbusculos (%)	Vesículas (%)	Esporas (%)
Encañazón	0,32 a	64,1 A	40,6 A	40,0 b	2,9 a
Llenado de grano	0,38 b	73,5 B	51,1 B	25,0 a	7,4 b

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Tabla 4.2. Colonización radical y estructuras de de hongos micorrícicos arbusculares presentes en raíces de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano.

Dosis de fertilización nitrogenada (kg N ha ⁻¹)	Densidad de				
	Longitud Radical (cm/cm ³)	Colonización radical (%)	Arbusculos (%)	Vesículas (%)	Esporas (%)
0	0,37 a	75,0 a	55,6 b	7,1 a	10,1 b
46 kg N ha ⁻¹	0,40 a	72,0 a	46,6 a	6,7 a	4,6 a

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

A partir de la restricción del producto de amplificación del gen 16S ARNr con la enzima *HhaI* se obtuvieron 13 T-RFs diferentes. En promedio, entre 5 y 10 T-RFs diferentes de los mencionados anteriormente, estuvieron presentes en todas las muestras. A partir de la restricción con la enzima *MspI* se obtuvieron 26 T-RFs diferentes. En promedio, entre 21 y 24 T-RFs diferentes de éstos, estuvieron presentes en todas las muestras. El análisis discriminante de los T-RFLP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 4.4. Ambos ejes explicaron 75% y 21% de la varianza total de los datos. El eje 1 estuvo principalmente conformado por los T-RFs de 66 pb, 129-130 pb, 144 pb, 148 pb, 163-164

pb, 428-429 pb y 549-550 pb, obtenidos con la enzima *MspI* y el T-RF de 359-360 pb obtenido con la enzima *HhaI*. El eje 2 estuvo conformado principalmente por T-RFs de 132 pb, 139-140 pb, 158-159 pb y 498-495 pb, obtenidos con la enzima *MspI* y el T-RF de 359-360 pb obtenido con la enzima *HhaI*. El análisis discriminante de los T-RFLP mostró que la estructura de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de las plantas estuvo determinada por la interacción entre los tratamientos de inoculación y fertilización con el estado ontogénico del cultivo (Figura 4.4). El análisis del índice H' determinó que ni los tratamientos aplicados ni el estado ontogénico del cultivo modificaron la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosféricas, las que presentaron un valor promedio de H de 2,79.

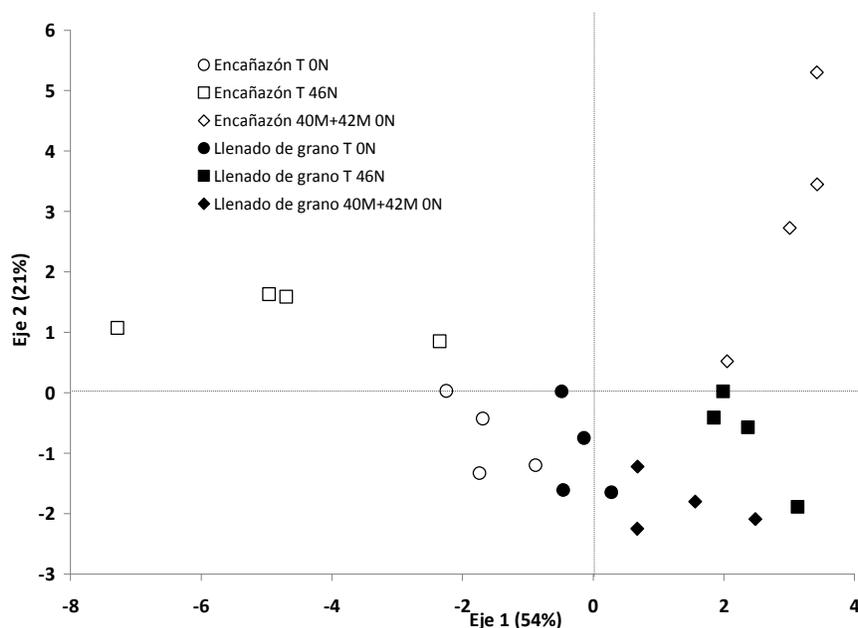


Figura 4.4 Análisis discriminante de los perfiles estructurales (T-RFLP) de las comunidades microbianas de rizósfera de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires, en dos estados diferentes del cultivo. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de la varianza total explicada por cada uno de los ejes.

Las Figuras 4.5 y 4.6 muestran la abundancia relativa de los T-RFs de las muestras rizosféricas analizadas, obtenidos con las enzimas *MspI* y *HhaI*, respectivamente. En ambos casos, se observa que todas las muestras presentaron los mismos T-RFs más abundantes aunque con abundancias relativas diferentes (Figuras 4.5 y 4.6). Además, la diferencia más destacable se

observó en el estado de encañazón en las plantas T 46N, las cuales no presentaron el grupo de tamaños de T-RFs "otros" obtenidos con la enzima *HhaI* (Figura 4.6), siendo éstos los T-RFs que presentaron señales menores al 10% de la señal total. Además, el T-RF de 144 pb obtenido con la enzima *MspI* no fue uno de los más abundantes (Figura 4.7) pero fue uno de los T-RFs considerados por el análisis discriminante como uno de los importantes para diferenciar las comunidades rizosféricas (sección 4.2). Este tamaño de T-RF estuvo presente en las plantas T 46N y en las plantas 40M+42M ON, en ambos estados ontogénicos del cultivo, y con una abundancia relativa promedio de 2,0%, pero no estuvo presente en las plantas T ON (Figura 4.7). Todos los resultados previamente mencionados confirman lo observado en el análisis discriminante (Figura 4.4). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles estructurales de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

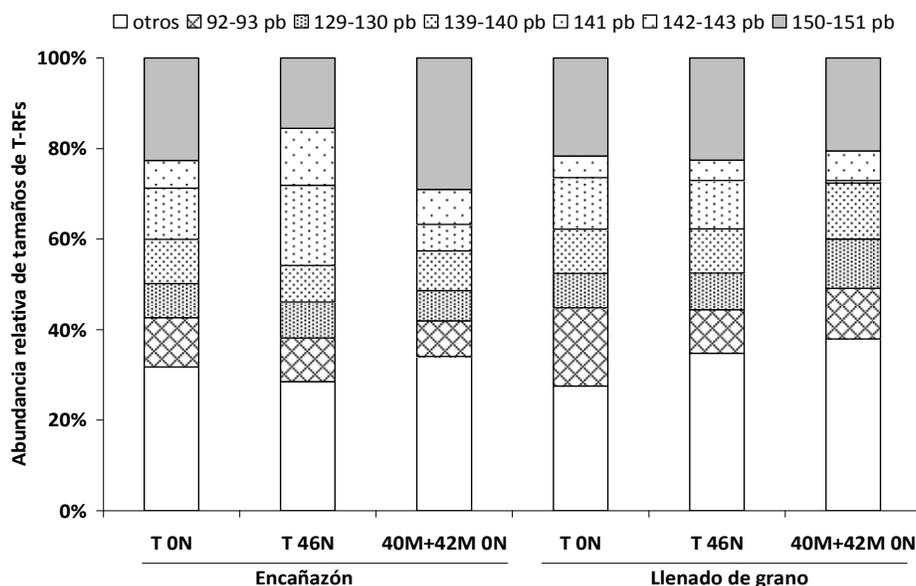


Figura 4.5 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) más abundantes obtenidos con la enzima de restricción *MspI*, para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires. En el grupo "otros" se encuentran los tamaños de T-RFs que presentaron porcentajes de señal menores del 10% del total: 51-52, 59-60, 62, 63-64, 66, 72, 126-127, 132, 136-137, 144, 146-147, 148, 158-159, 160-161, 163-164, 166, 428-429, 494-495, 546-547 y 549-550 pares de bases.

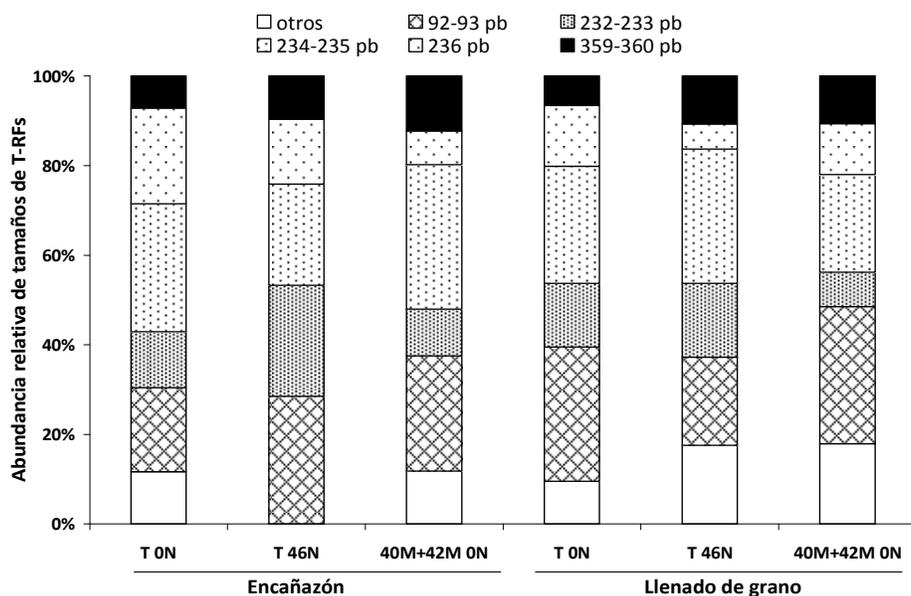


Figura 4.6 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) más abundantes obtenidos con la enzima de restricción *HhaI*, para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires. En el grupo "otros" se encuentran los tamaños de T-RFs que presentaron porcentajes de señal menores del 10% del total: 51-52, 54, 56, 70, 73, 202, 224 y 231 pares de bases.

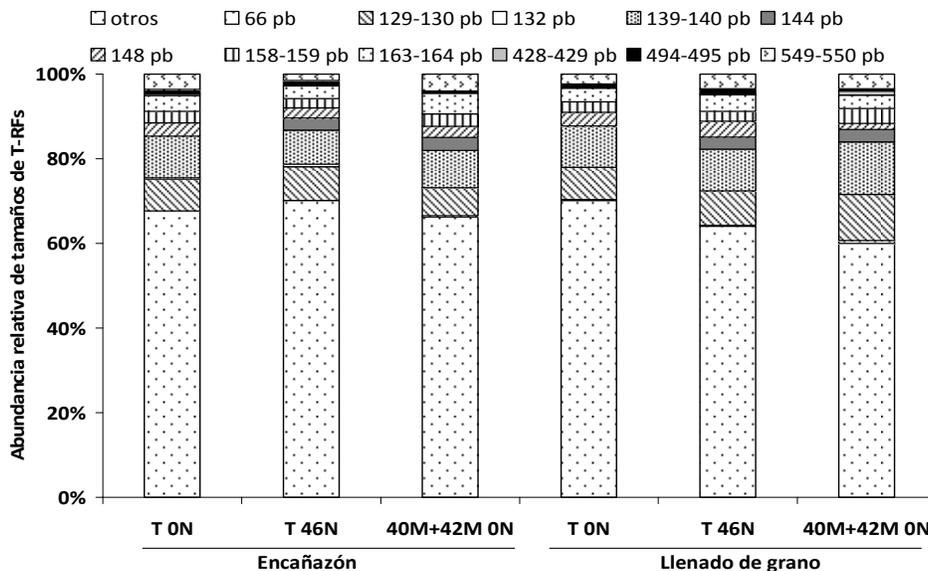


Figura 4.7 Abundancia relativa de los tamaños de fragmento de restricción (T-RF) obtenidos con la enzima de restricción *MspI*, para los tres tratamientos y los dos estados ontogénicos del cultivo de trigo, en la localidad de Villa Moll, partido de Navarro, provincia de Buenos Aires. Los fragmentos representados en la figura son los que fueron indicados por el análisis discriminante como los más importantes para diferenciar comunidades. En el grupo "otros" se encuentran los tamaños de T-RFs que no cumplieron con el requisito antes mencionado.

En resumen, en este ensayo se observó que el desarrollo del cultivo determinó variaciones en los parámetros agronómicos, en el número de microorganismos MFN, en la diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas y en la micorrización natural. En cuanto a los tratamientos aplicados, no se observaron respuestas significativas para los diferentes niveles de fertilización e inoculación en los parámetros agronómicos del cultivo, en la diversidad funcional y estructural y en recuento de microorganismos MFN. Por el contrario, sí se observaron aumentos estadísticamente no significativos en el rendimiento de grano y en la biomasa aérea debidos a la fertilización y/o a la inoculación, a la vez que la fertilización generó impacto en algunas de las estructuras de hongos micorrícicos evaluadas. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos en este capítulo serán discutidas más ampliamente en el capítulo 8.

Capítulo 5. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada y fosforada en cultivo de trigo.

5.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la interacción entre la inoculación con *A. brasilense*, la fertilización fosforada y la fertilización nitrogenada sobre las comunidades microbianas rizosféricas nativas y la micorrización natural del cultivo de trigo, se realizó un ensayo a campo en la campaña 2011-2012, en el establecimiento “El Correntino”, de la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires (36° 10' 23" latitud sur y 62° 20' 40" longitud oeste) (Figuras 3 y 4 del anexo 2). El lote en el que se realizó el ensayo correspondía a un suelo clasificado como Hapludol éntico de textura franco arenosa, serie Bolívar (Geolnta, 2013) (Figura 5 del anexo 2). El promedio de precipitaciones ocurridas en Anguil, La Pampa fue de 242 mm durante el ciclo del cultivo (SMN, 2014a).

La secuencia de cultivos en el lote utilizado era soja-trigo/soja-maíz, bajo siembra directa, siendo la soja el cultivo antecesor al cultivo de este ensayo. La siembra del cultivo del ensayo se realizó el 31 de Mayo de 2011. La densidad de siembra fue 128 kg ha⁻¹ con un espacio entre hileras de 21 cm. El cultivar de trigo utilizado en este ensayo fue Baguette 19 (Nidera®), cultivar de ciclo intermedio a largo con excelente comportamiento a vuelco y moderadamente susceptible a enfermedades foliares, con muy alto potencial de rendimiento. La semilla fue adquirida con los productos insecticidas y fungicidas ya aplicados, según el sistema Tratamiento Profesional de Semillas del convenio Nidera®-Bayer®.

El diseño utilizado en este ensayo fue parcelas subdivididas en arreglo factorial de tres factores. Se determinaron tres bloques en forma perpendicular a la pendiente topográfica, menor al 1%. Cada una de las parcelas experimentales tuvo una superficie total de 222,53 m² (6,09 m de ancho y 36,54 m de largo). Uno de los factores fue la inoculación con dos niveles: testigo (sin inoculación) e inoculado con 40M+42M. El segundo factor fue la fertilización nitrogenada realizada a la siembra, con tres niveles de urea incorporada al suelo con sembradora de grano fino, en sentido perpendicular al sentido de la siembra. Los niveles fueron: 0, 75 y 150 kg urea ha⁻¹ (con una concentración de 46% de N, las dosis equivalen a 0, 35 y 69 kg N ha⁻¹, respectivamente). El tercer factor fue la fertilización fosforada, con tres niveles de SPT incorporado junto a la semilla durante la siembra. Los niveles fueron: 0, 60 y 120 kg SPT ha⁻¹ (con una concentración de 20% de P, las dosis

equivalen a 0, 12 y 24 kg P ha⁻¹, respectivamente). La dosis de inoculación aplicada fue de 12 ml kg⁻¹ de semilla. El recuento de bacterias del inoculante 40M+42M fue de 4,3 x 10⁹ UFC ml⁻¹.

En este ensayo, los muestreos se realizaron a los 118 DDS, en estado de macollaje (Estado 2 de Zadoks, 1974) y a los 182 DDS, en estado de llenado de granos (Desarrollo pastoso del grano, Estado 8 de Zadoks, 1974). El muestreo de rendimiento se realizó a la cosecha del cultivo (197 DDS). Se realizaron las determinaciones de biomasa aérea y radical, componentes del rendimiento, micorrización natural, diversidad funcional, recuentos de microorganismos MFN, celulolíticos y nitrificadores.

5.2. Resultados y discusión.

El rendimiento promedio del cultivo fue de 5780 kg ha⁻¹. Estos valores son similares a los reportados para la misma campaña por otros establecimientos de la zona (Ridzo, 2015a). Asimismo, los rendimientos obtenidos fueron mayores al promedio obtenido para el cultivo de trigo en el partido de Trenque Lauquen, de 4200 kg ha⁻¹ (MAGyP, 2014). Probablemente, las diferencias observadas entre los valores promedios y el rendimiento obtenido en este ensayo se deban a que el promedio incluye cultivos realizados con diferentes variedades de trigo y bajo diversos manejos agrícolas, como aplicación o no de inoculantes y fertilizantes. Éstos no necesariamente son similares a los aplicados en este trabajo, lo que puede explicar las diferencias observadas. Esto se demuestra parcialmente cuando se analizan las parcelas testigo sin fertilización, las cuales presentaron el menor rendimiento en todo el ensayo, en un promedio de 4655 kg ha⁻¹. Por el contrario, aunque la triple interacción entre los factores no fue estadísticamente significativa, las parcelas que presentaron los mayores rendimientos fueron las inoculadas con *A. brasilense* y fertilizadas con la mayor dosis de fertilizante fosforado y con la dosis intermedia de fertilizante nitrogenado, con un rendimiento promedio de 7279 kg ha⁻¹. Las precipitaciones observadas en Anguil durante el período del ensayo fueron menores al promedio 1981-1990 de 404 mm, registrado en el mismo lapso del tiempo en Santa Rosa, La Pampa (SMN, 2014b). Sin embargo, en la zona del ensayo, el índice de precipitación estandarizado al período 1961-2010 para los meses de septiembre, octubre y noviembre fue entre 1.0 y 1.5, es decir, moderadamente húmedo (Skansi, 2011a). Durante este lapso de tiempo, se ubica el período crítico de definición del rendimiento del cultivo de trigo (Slafer *et al.*, 2004). Por ello, se determinó que el cultivo de este ensayo no se encontró limitado por agua.

Cabe mencionar que se consideraron los datos correspondientes a las estaciones meteorológicas de la EEA Anguil del INTA y de Santa Rosa, La Pampa del Servicio Meteorológico Nacional, por ser éstas las fuentes de información más cercana a la zona del ensayo y con características climáticas más similares a éste.

Se observó interacción significativa entre los factores fertilización nitrogenada y fertilización fosforada e interacción entre la inoculación y la fertilización fosforada, para las variables rendimiento y biomasa aérea. La aplicación de fertilizante fosforado produjo un aumento significativo del rendimiento (Figura 5.1) en las parcelas fertilizadas, independientemente de la dosis aplicada, con respecto al control sin fertilizar. Si bien no se observaron diferencias entre los niveles de fertilización fosforada de 75 y 150 kg urea ha⁻¹, es importante destacar con la aplicación de 150 kg urea ha⁻¹ y 60 kg SPT ha⁻¹ se maximizó la EUF. Los valores de eficiencia observados fueron 30 y 37 kg de grano kg⁻¹ de fertilizante nitrogenado y fosforado, respectivamente, mientras que las EUFs observadas en las parcelas con los mayores niveles de ambas fertilizaciones fueron 16 y 20 kg de grano kg⁻¹ de fertilizante nitrogenado y fosforado, respectivamente.

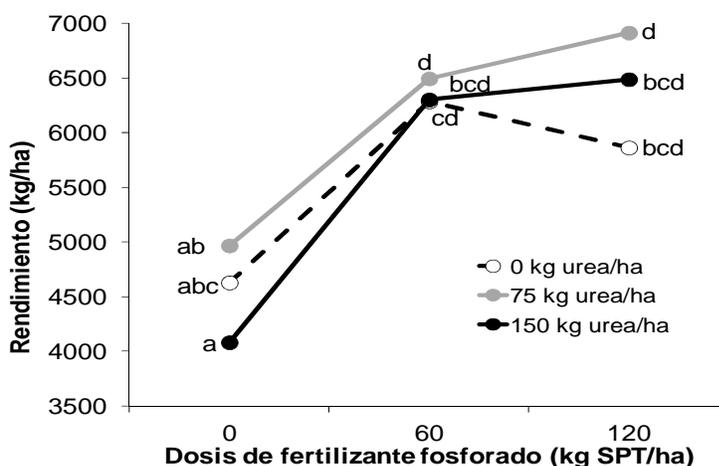


Figura 5.1. Rendimiento de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Además, se observó un aumento significativo del rendimiento en las parcelas fertilizadas con SPT, independientemente de la dosis aplicada, con respecto al control sin fertilizar, tanto en parcelas inoculadas como en las parcelas testigo no inoculadas (Figura 5.2). Sin embargo, la inoculación con *A. brasilense* aumentó la EUF del fertilizante fosforado. Con la aplicación de 60 kg SPT ha⁻¹ en las parcelas no inoculadas se observó la mayor EUF del fertilizante fosforado, siendo de 33 kg de grano kg⁻¹, mientras que con la inoculación se maximizó la EUF del fertilizante fosforado en las parcelas con el mayor nivel de fertilizaciones, siendo esta EUF de 15,8 kg de grano kg⁻¹ de fertilizante fosforado. Las diferencias observadas en el rendimiento del cultivo de trigo se explican con los dos componentes del rendimiento, número de granos ha⁻¹ (Figuras 5.3 y 5.4) y peso de 1000 granos (Figuras 5.5. y 5.6). Estas dos variables presentaron las mismas interacciones que para el rendimiento. Asimismo, la variable biomasa aérea, que corresponde a toda la biomasa aérea generada por el cultivo excluyendo las espigas, presentó las mismas interacciones que las variables anteriormente evaluadas (Figuras 5.7 y 5.8). Si bien se observaron diferencias en las variables rendimiento y biomasa aérea, el IC no presentó diferencias significativas entre tratamientos, que en promedio fue 0,43.

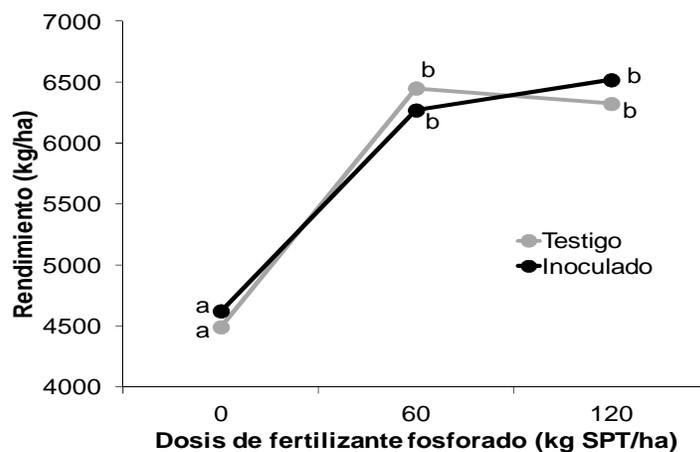


Figura 5.2. Rendimiento de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

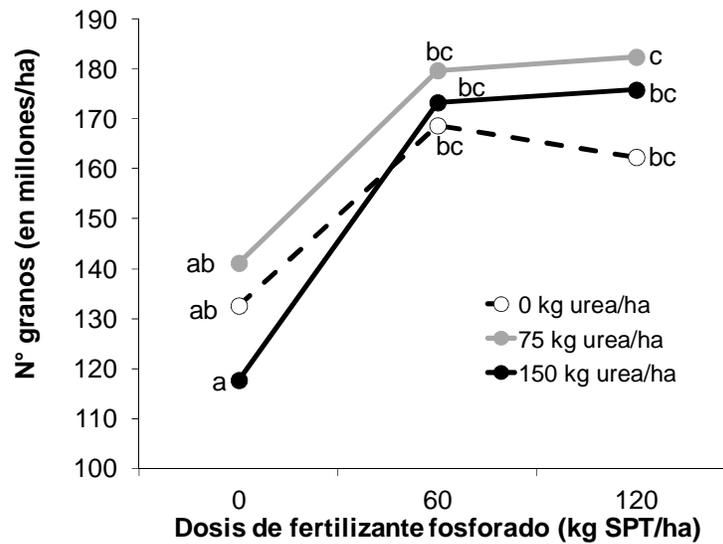


Figura 5.3. Número de granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

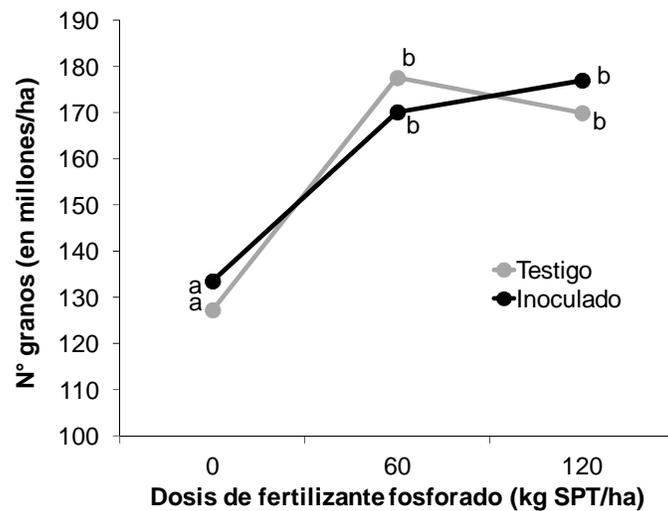


Figura 5.4. Número de granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

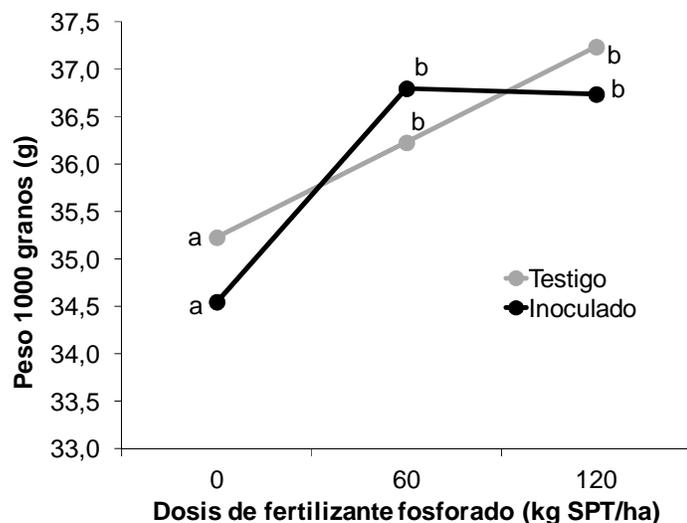


Figura 5.5. Peso de 1000 granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada una de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

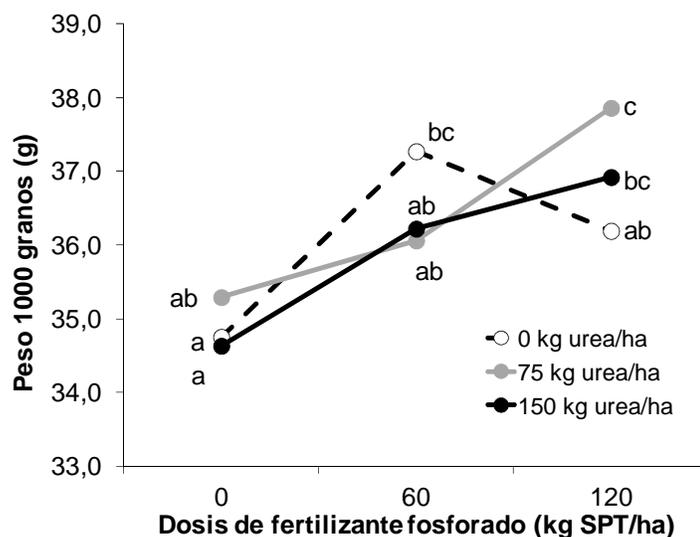


Figura 5.6. Peso de 1000 granos de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

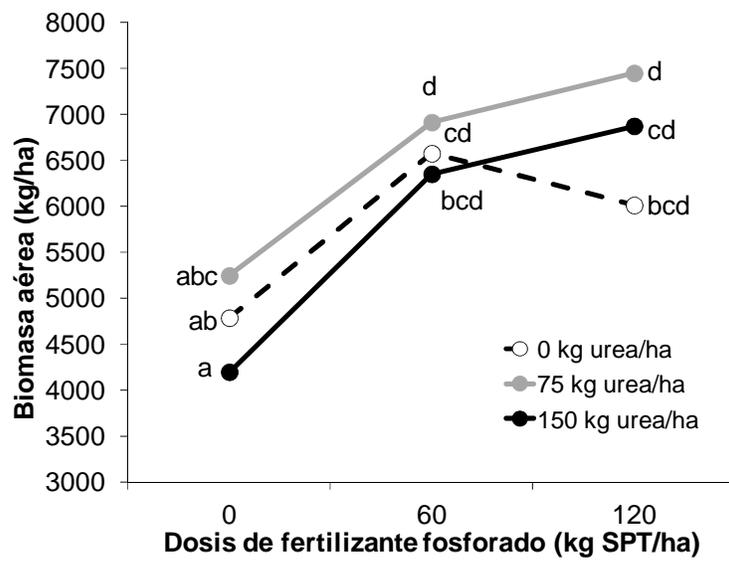


Figura 5.7. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, a la cosecha, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de fertilizante nitrogenado aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

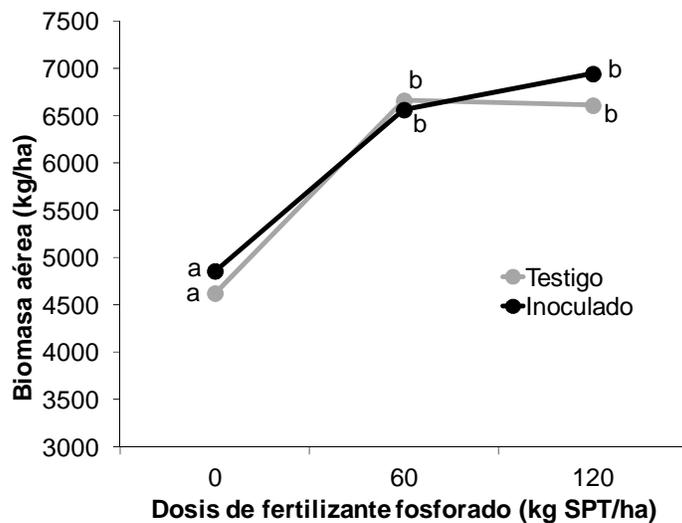


Figura 5.8. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, a la cosecha, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

El análisis de los recuentos de microorganismos no mostró diferencias entre tratamientos ni entre muestreos (Tabla 5.1). En cambio, y tal como resultaría esperable, se observó que la biomasa aérea y la biomasa radical difirieron significativamente entre los distintos estados ontogénicos del cultivo (Tabla 5.2). La biomasa radical no presentó diferencias significativas entre tratamientos. La biomasa aérea mostró interacción entre fertilización fosforada e inoculación en el muestreo de macollaje (Figura 5.9) y en el llenado de grano (Figura 5.10). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los recuentos microbianos y a la producción de biomasa y rendimiento, presentados anteriormente, serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

Tabla 5.1. Recuento de microorganismos microaerófilos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	MFN	Celulolíticos (Log NMP g ⁻¹ raíz seca)	Nitrificadores
Macollaje	6,01 a	7,33 A	6,42 a
Llenado de grano	5,87 a	7,52 A	6,47 a

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Tabla 5.2. Biomasa aérea y radical en dos estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Biomasa aérea (kg ha ⁻¹)	Biomasa radical de 0-20 cm de suelo (kg ha ⁻¹)
Macollaje	2377 a	522 a
Llenado de grano	6447 b	381 b

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de macollaje se presenta en la Figura 5.11. Ambos ejes explicaron el 53% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido oxálico, tween 20 y ácido láctico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ácido oxálico y tween 20. Se observó que la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas no estuvo determinada por ninguno de los factores aplicados ni por la interacción entre los mismos (Figura 5.11). En la Figura 5.12 se presenta el análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de llenado de granos. Ambos ejes explicaron el 49% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido cítrico, tween 20 y ácido láctico. El eje 2 estuvo conformado

principalmente por ácido oxálico. Al igual que lo observado en el estado de macollaje, en este muestreo, las comunidades microbianas rizosféricas presentaron patrones fisiológicos similares entre sí (Figura 5.12).

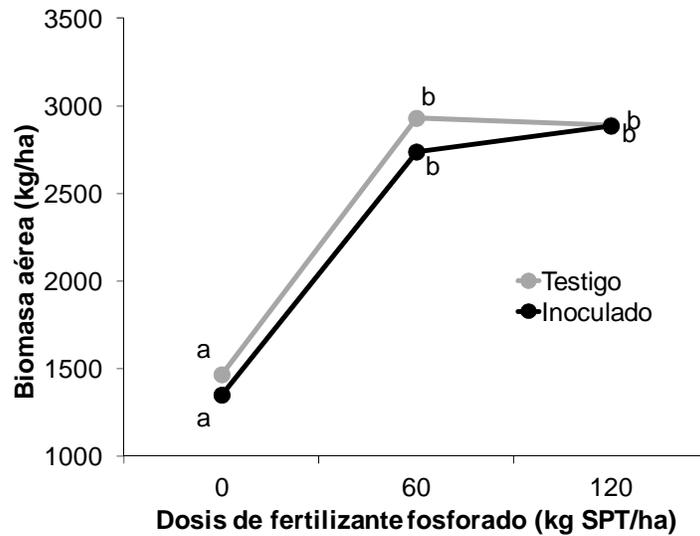


Figura 5.9. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

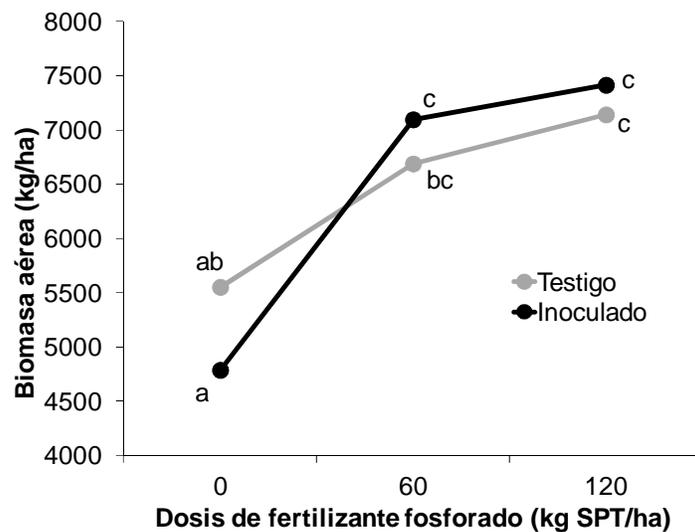


Figura 5.10. Biomasa aérea de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas para cada uno de los niveles de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

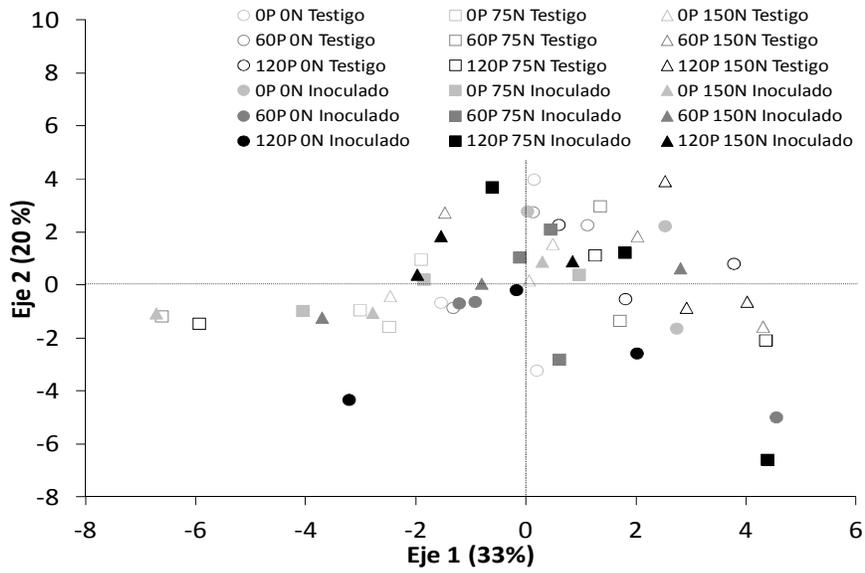


Figura 5.11. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

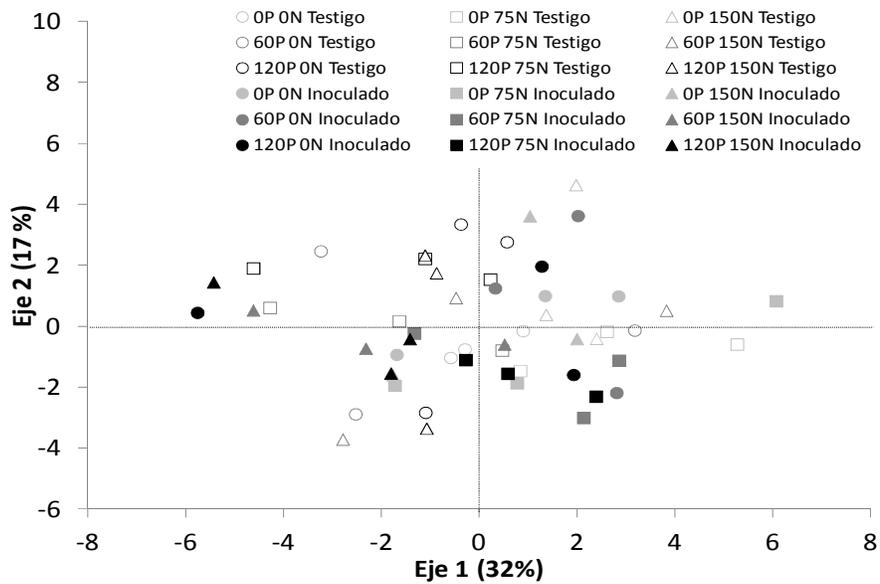


Figura 5.12. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de granos, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 5.13. Ambos ejes explicaron el 62% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido láctico, xilosa y glicina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por tween 20 y ácido salicílico. El análisis discriminante de los CLPP mostró que la fisiología de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera estuvo determinada, principalmente, por el estado ontogénico del cultivo (Figura 5.13) más que por los tratamientos de inoculación y fertilización aplicados (Figuras 5.11, 5.12 y 5.13). El análisis del índice H' no mostró diferencias significativas entre tratamientos. En cambio, se observó que la diversidad funcional fue significativamente menor durante el estado de macollaje (2,62) que durante el llenado de grano (2,85). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

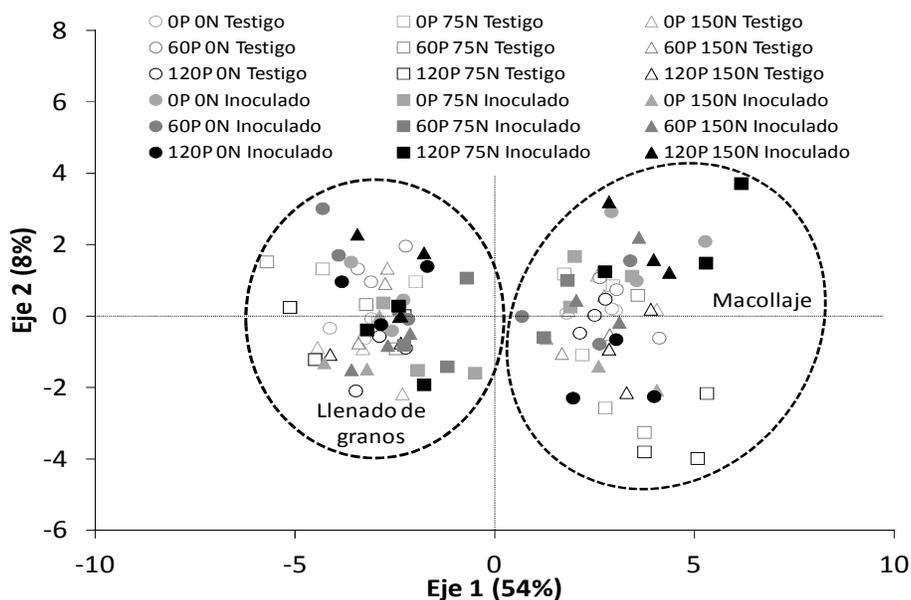


Figura 5.13. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada y nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El cultivo de trigo de este ensayo presentó un porcentaje alto de colonización radical en ambos estados ontogénicos evaluados (Tabla 5.3). La densidad de longitud radical fue un 233% mayor en el estado de llenado de grano, en comparación con el estado de macollaje. La micorrización mostró una dinámica temporal que acompañó el desarrollo del cultivo, observándose un 75% menos de arbusculos, un 111% mayor de vesículas y un 238% más de esporas en el estado de llenado de grano en comparación con el estado de macollaje (Tabla 5.3). Únicamente en el estado de macollaje se observó efecto de la interacción entre la inoculación y la aplicación de fertilizante fosforado (Figura 5.14) y de la interacción entre la fertilización fosforada y nitrogenada (Figura 5.15) sobre la densidad de longitud radical. La densidad de longitud radical de las plantas testigo fue menor en la situación de ausencia de fertilización fosforada, en comparación con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹, mientras que la densidad de longitud radical en las plantas inoculadas, si bien se incrementó debido al aumento de dosis de fertilizante de 0 a 60 kg SPT ha⁻¹, dichas diferencias no fueron significativas (Figura 5.14). Por otra parte, las plantas sin fertilización fosforada presentaron una menor densidad de longitud radical en comparación con las plantas fertilizadas con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹, en la situación de fertilización con 150 kg urea ha⁻¹, por lo que a menores dosis de este fertilizante dichas diferencias se vieron anuladas (Figura 5.15).

Tabla 5.3. Colonización radical y estructuras de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Densidad de Longitud Radical (cm/cm ³)	Colonización radical (%)	Arbusculos (%)	Vesículas (%)	Esporas (%)
Macollaje	0,52 a	66,1 a	33,0 b	16,3 a	1,3 a
Llenado de grano	1,73 b	59,6 a	8,2 a	34,4 b	4,4 b

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En el estado de macollaje, la aplicación de los diferentes tratamientos evaluados no generó diferencias en los niveles de colonización radical. En este estado, se registró la triple interacción entre los tres tratamientos evaluados sobre el porcentaje de arbusculos de las raíces de las plantas de trigo (Figura 5.16). Se observó una mayor cantidad de estas estructuras en las raíces de plantas testigo e inoculadas, fertilizadas con 150 kg urea ha⁻¹ y sin fertilización fosforada, en comparación con la cantidad de estructuras encontradas en las raíces de las plantas testigo e inoculadas, sin fertilización nitrogenada y fertilizadas con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹ y con las plantas testigo y fertilizadas con 60 kg SPT ha⁻¹, y 75 o 150 kg urea ha⁻¹ (Figura 5.16). Las diferencias observadas en el

porcentaje de vesículas se debieron a la interacción entre la fertilización fosforada y nitrogenada (Figura 5.17), por la cual las raíces de plantas que sin fertilización fosforada presentaron un mayor número de vesículas en comparación con las raíces de plantas fertilizadas con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹ en la situación de ausencia de fertilización nitrogenada, por lo que a mayores dosis de este fertilizante dichas diferencias se vieron anuladas (Figura 5.17).

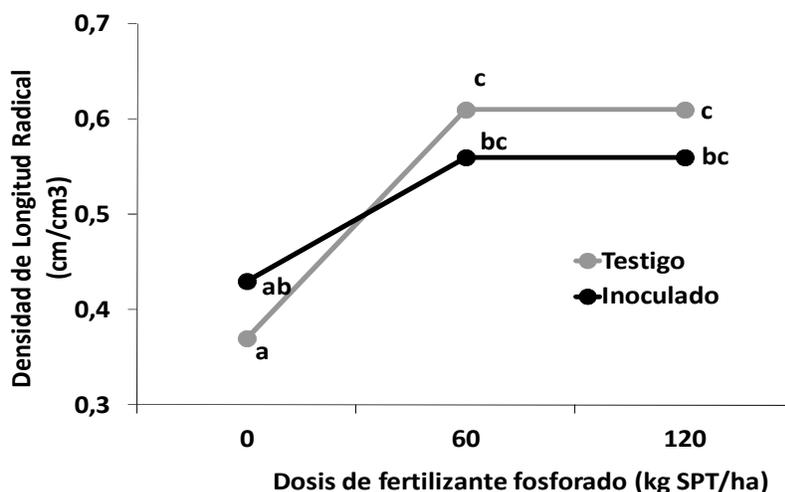


Figura 5.14. Densidad de longitud radical de plantas de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

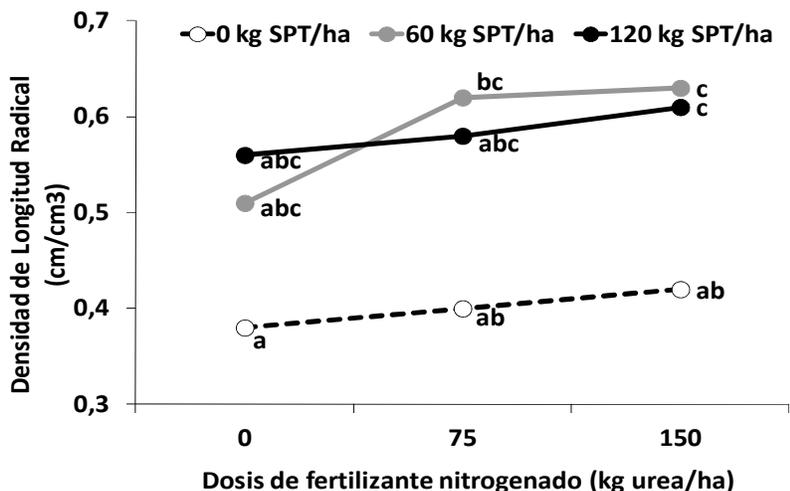


Figura 5.15. Densidad de longitud radical de plantas de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas, para cada nivel de fertilización fosforada. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

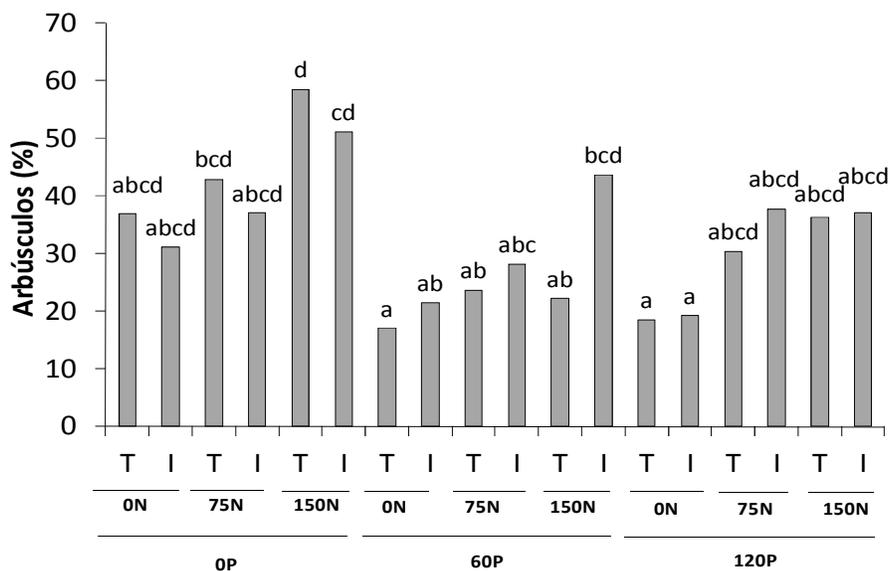


Figura 5.16. Porcentaje de arbúsculos presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función del tratamiento de inoculación, las dosis de fertilizante nitrogenado y las dosis de fertilizante fosforado aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

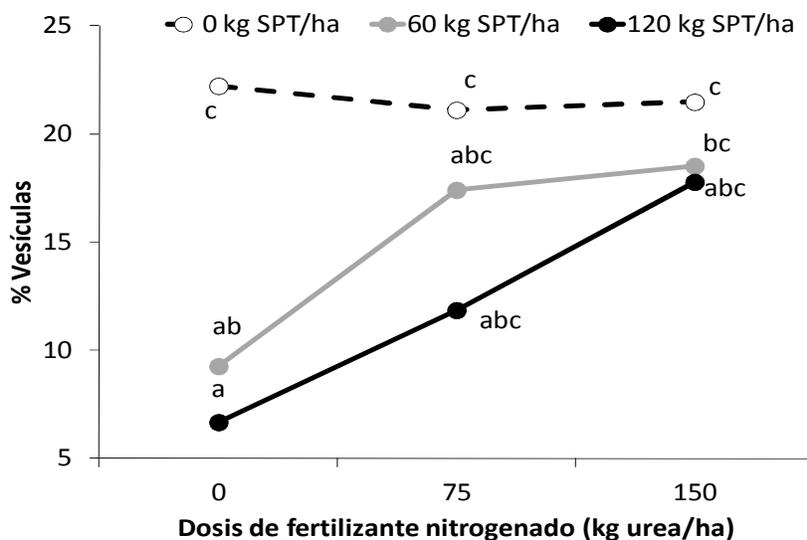


Figura 5.17. Porcentaje de vesículas presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de macollaje, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas, para cada nivel de fertilización fosforada. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En el estado de llenado de grano se observaron diferencias en los niveles de colonización radical debidas tanto a la interacción entre la inoculación y la fertilización fosforada (Figura 5.18) como a la interacción entre la fertilización fosforada y nitrogenada (Figura 5.19). La colonización radical de las plantas testigo fue mayor en la situación de ausencia de fertilización fosforada, en comparación con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹, mientras que la colonización radical de las plantas inoculadas, si bien se afectó negativamente debido al aumento de dosis de fertilizante fosforado, dichas diferencias no fueron significativas (Figura 5.18). Por otra parte, las plantas sin fertilización fosforada y con niveles de fertilización nitrogenada de 75 o 150 kg urea ha⁻¹ presentaron mayores niveles de colonización radical en comparación con las plantas fertilizadas con 0 o 75 kg urea ha⁻¹ y con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹ (Figura 5.19). También se observaron diferencias en el porcentaje de arbusculos debidas a la interacción entre la fertilización fosforada y nitrogenada (Figura 5.20), por lo cual la cantidad de arbusculos en las raíces de las plantas testigo fue mayor en la situación de ausencia de fertilización fosforada, en comparación con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹, mientras que la cantidad de arbusculos en las raíces de plantas inoculadas, si bien disminuyó debido al aumento de dosis de fertilizante, dichas diferencias no fueron significativas (Figura 5.20). Finalmente, la cantidad de esporas en las plantas inoculadas (5,4%) fue mayor respecto al testigo sin inocular (3,4%). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a la micorrización natural serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

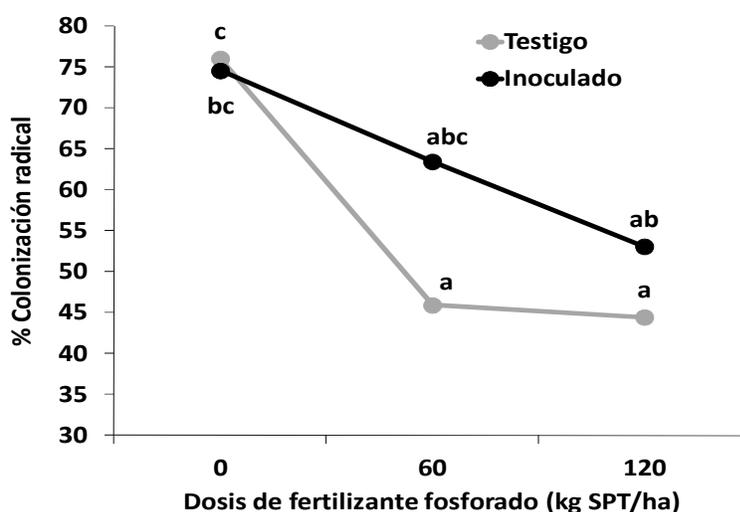


Figura 5.18. Porcentaje de colonización de las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

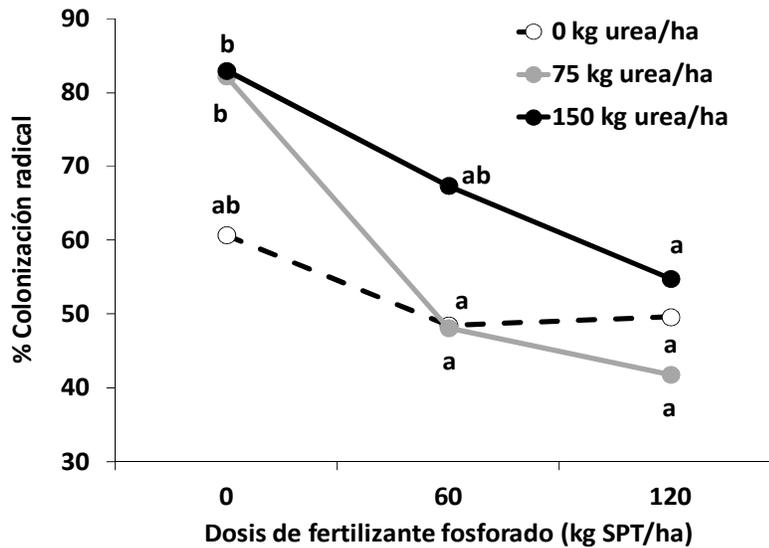


Figura 5.19. Porcentaje de colonización de las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada dosis de fertilizante nitrogenado. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

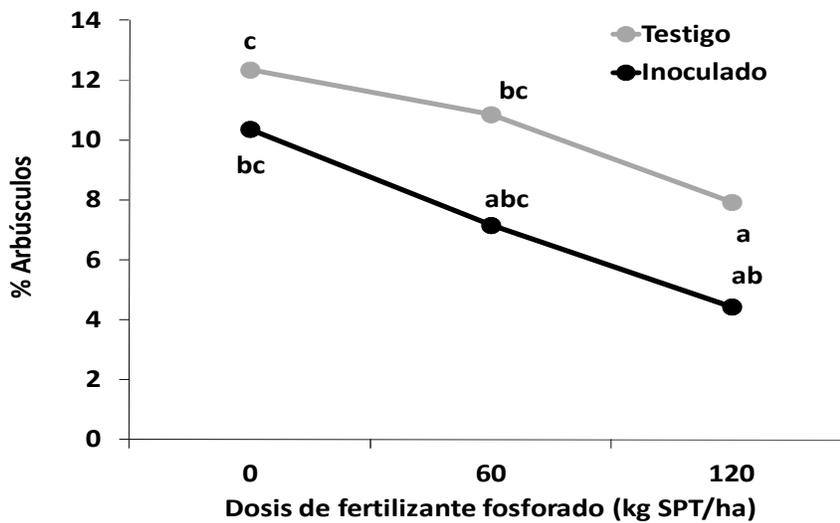


Figura 5.20. Porcentaje de arbusculos presentes en las raíces de trigo, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en estado de llenado de grano, en función de las dosis de fertilizante fosforado aplicadas, para cada tratamiento de inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas según pruebas de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En resumen, en este ensayo se observó un efecto significativo de la inoculación y la fertilización fosforada sobre el rendimiento del cultivo, sobre los componentes del mismo, sobre la generación de biomasa aérea y sobre la micorrización natural. Asimismo, y tal como resulta esperable, se observaron diferencias a lo largo del ciclo del cultivo en la generación de biomasa aérea y radical, como así también en las variables de micorrización evaluadas. Este trabajo muestra por primera vez los efectos de los tratamientos de inoculación y fertilización sobre la micorrización natural en dos estados ontogénicos del cultivo de trigo en condiciones de campo. No se observaron diferencias en los recuentos de microorganismos MFN, celulolíticos y nitrificadores adjudicables a los tratamientos aplicados, como así tampoco diferencias a lo largo del ciclo del cultivo. Se observaron diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas debidas al estado ontogénico del cultivo más que a los tratamientos aplicados. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos en este capítulo serán discutidas más ampliamente en el capítulo 8.

Capítulo 6. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada en cultivo de maíz.

6.1. Descripción del ensayo y determinaciones realizadas.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la interacción entre la inoculación con *A. brasilense* y la fertilización nitrogenada sobre las comunidades microbianas rizosféricas nativas y la micorrización natural del cultivo de maíz, se realizó un ensayo a campo en la campaña 2010-2011, en el establecimiento “El Coronel”, partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires (35° 30' 9" latitud sur y 61° 54' 24" longitud oeste) (Figura 6 del anexo 2). El suelo es clasificado como Hapludol éntico, de textura franco limosa, serie Norumbega (Geolnta, 2013) (Figura 7 del anexo 2). Las características químicas de los primeros 20 cm a la siembra fueron: pH 5.8 (1:2,5 suelo:agua), conductividad 0,92 dS m⁻¹, 3,2% de materia orgánica, 0,19% de N orgánico, 8,54 ppm de P Bray. El promedio de precipitaciones ocurridas en Pergamino fue de 610 mm durante el ciclo del cultivo (SMN, 2014a).

El híbrido de maíz utilizado fue AX886 MG (Nidera®), híbrido de ciclo intermedio con excelente comportamiento frente a roya y con resistencia genética a *Diatraea saccharalis* (barrenador del tallo). La semilla fue adquirida con el producto insecticida Poncho® (Clotianidina como principio activo; Bayer®) ya aplicado. El cultivo antecesor fue soja de primera. La siembra del cultivo del ensayo se realizó el 30 de Septiembre de 2010. La densidad de siembra fue 80000 semillas ha⁻¹ con un espacio entre hileras de 70 cm. Se realizó una fertilización a la siembra con 20 kg P ha⁻¹ (90 kg PMA ha⁻¹).

El diseño del ensayo fue en bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial de dos factores. Se establecieron tres bloques en forma perpendicular a la pendiente topográfica, menor al 0,5%. Cada una de las parcelas experimentales tuvo una superficie total de 222,53 m² (6,09 m de ancho y 36,54 m de largo). Uno de los factores fue la inoculación con cinco niveles: testigo (sin inoculación), y cuatro tratamientos que fueron un inoculante comercial formulado con *A. brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* (Rhizoflo Premium Maíz®, Laboratorios CKC, Argentina) y tres inoculantes experimentales formulados con las cepas 40M, 42M y 40M+42M. El segundo factor fue la fertilización nitrogenada incorporada en el estado vegetativo V4 (Ritchie y Hanway, 1982). Los niveles fueron: 0, 90 y 180 kg urea ha⁻¹ (con una concentración de 46% de N, las dosis equivalen a 0, 41 y 83 kg N ha⁻¹, respectivamente). La dosis de inoculación aplicada fue de 10 ml kg⁻¹ de semilla, en el caso de los inoculantes experimentales, y de 5 ml kg⁻¹ de semilla en el caso del inoculante comercial, según indicación del fabricante en el marbete. El recuento de bacterias del inoculante 40M fue 3,8 x 10¹⁰ UFC ml⁻¹, de 42M fue 2,9 x 10¹¹ UFC ml⁻¹, y de 40M+42M fue 4,5 x 10¹⁰ UFC ml⁻¹.

En este ensayo, los muestreos se realizaron a los 62 DDS, en etapa vegetativa (V5 de Ritchie y Hanway, 1982) y a los 132 DDS, en etapa reproductiva (Grano lechoso R3 de Ritchie y Hanway, 1982). El muestreo para estimar el rendimiento en grano se realizó a la cosecha del cultivo (225 DDS). Además, se realizaron las determinaciones de biomasa aérea y radical, micorrización natural, diversidad funcional, y recuento de microorganismos FBN, celulolíticos y nitrificadores. Además, a partir de 18 muestras de todo el ensayo, correspondientes a los tratamientos testigo e inoculadas con 40M+42M y los tres niveles de fertilización nitrogenada, considerando las tres repeticiones realizadas, se analizaron los perfiles estructurales mediante el análisis de T-RFLP del gen 16S ARNr.

6.2. Resultados y discusión.

El rendimiento promedio del cultivo fue de 10560 kg ha⁻¹. Los rendimientos obtenidos fueron mayores al promedio obtenido para el cultivo de maíz en el partido de Pehuajó, que fue de 6769 kg ha⁻¹ (MAGyP, 2014). Este híbrido rindió 13000 kg ha⁻¹ en Cónon, provincia de Buenos Aires (Ferraris y Couretot, 2012) y 13892 kg ha⁻¹ en San Francisco, Córdoba (Centeno *et al.*, 2010), ambos en la campaña 2009-2010, 10105 kg ha⁻¹ en Manfredí, Córdoba en la campaña 2010-2011 (Ferreira y Piatti, 2011) y 10153 kg ha⁻¹ en Marcos Juárez, Córdoba, en la campaña 2011-2012 (Vallone *et al.*, 2012). Probablemente, las diferencias observadas entre los valores promedios y el rendimiento obtenido en este ensayo se deban a que el promedio incluye cultivos realizados con diferentes híbridos de maíz y bajo diversos manejos agrícolas, como aplicación o no de inoculantes y fertilizantes. Éstos no necesariamente son similares a los aplicados en este trabajo, lo que puede explicar las diferencias observadas. Esto se demuestra parcialmente cuando se analizan las parcelas testigo sin fertilización, las cuales mostraron el menor rendimiento en todo el ensayo, que en promedio fue 8180 kg ha⁻¹. Por el contrario, los mayores valores de rendimiento en las parcelas se observaron con los mayores niveles de fertilización nitrogenada e inoculados con la mezcla de cepas de *A. brasilense* (12700 kg ha⁻¹). Sin embargo, la interacción entre los factores no fue estadísticamente significativa. Las precipitaciones observadas durante el período del ensayo fueron menores al promedio de 831 mm del período 1981-1990, observado en Pehuajó en el mismo lapso del tiempo (SMN, 2014b). Sin embargo, en la zona del ensayo, el índice de precipitación estandarizado al período 1961-2010 para los meses de diciembre, enero y febrero fue entre 1.0 y

1.5, es decir, moderadamente húmedo (Skansi, 2011a). Además, luego de un mes de diciembre con grandes déficits hídricos en toda la zona (Skansi, 2010a), en Pehuajó se registró el mes de enero con mayor cantidad de precipitaciones desde 1961 (Skansi, 2011b). En el trimestre mencionado se produjo la floración del cultivo, alrededor de la cual se ubica el período crítico de definición del rendimiento de maíz (Cárcova *et al.*, 2004a). Teniendo todo esto en cuenta, se puede concluir entonces que las precipitaciones observadas durante el período del ensayo no constituyeron una limitante para el crecimiento del cultivo.

La variable rendimiento mostró respuesta a los diferentes niveles de los factores inoculación y fertilización nitrogenada. La aplicación de fertilizante nitrogenado produjo un aumento significativo del rendimiento del 26 al 38%, con respecto al control sin fertilizar (Figura 6.1). Es importante destacar que con la aplicación de 90 kg urea ha⁻¹, la EUF del fertilizante nitrogenado fue mayor e igual a 25 kg kg⁻¹, respecto a los 19 kg kg⁻¹ observado en las parcelas fertilizadas con 180 kg urea ha⁻¹. Asimismo, se observó un aumento significativo del rendimiento en las parcelas inoculadas respecto a las parcelas testigo sin inocular. La magnitud de la respuesta observada en el rendimiento fue diferente en función del inoculante aplicado, siendo mayor la respuesta en las parcelas inoculadas con las dos cepas de *A. brasilense* (Figura 6.2). Debido a cuestiones operativas durante la conducción de este ensayo, no fue posible determinar la variable biomasa aérea a la cosecha del cultivo ni tampoco los componentes de rendimiento, número de granos ha⁻¹ y peso de 1000 granos, para poder analizar un poco más exhaustivamente la variable rendimiento.

La variable biomasa aérea, que corresponde a toda la biomasa aérea generada por el cultivo excluyendo las espigas, presentó diferencias entre estados ontogénicos del cultivo, como resultaría esperable (Tabla 6.1). Además, en el estado de R3 se observaron diferencias significativas en esta variable, en función del nivel de inoculación aplicado (Figura 6.3). En estado de V5, las parcelas fertilizadas con 90 kg urea ha⁻¹ presentaron una biomasa radical de 337,14 kg ha⁻¹. Este valor fue significativamente mayor que la biomasa radical observada en las parcelas no fertilizadas, las cuales presentaron 213,31 kg de biomasa radical por hectárea. El aumento de la dosis de fertilización a 180 kg urea ha⁻¹ no generó un aumento significativo de la biomasa radical generada, siendo éste de 268,23 kg ha⁻¹. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos respecto a la generación de biomasa y rendimiento del cultivo serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

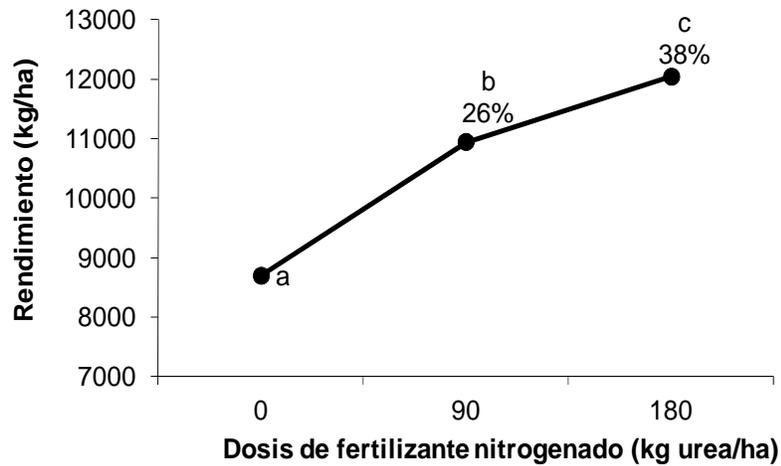


Figura 6.1. Rendimiento de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en función de las dosis de fertilizante nitrogenado aplicadas. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($P < 0,05$).

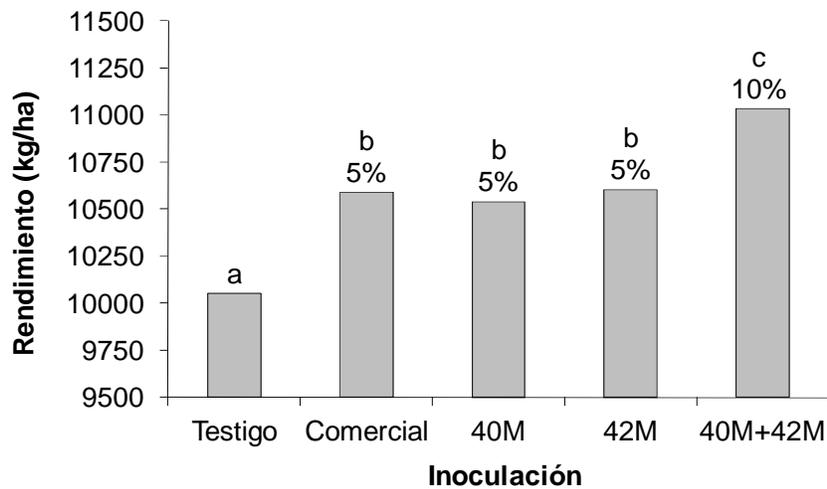


Figura 6.2. Rendimiento de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en función de los niveles de inoculación aplicados. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Tabla 6.1. Biomasa aérea y radical en dos estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Biomasa aérea (kg ha ⁻¹)	Biomasa radical de 0-20 cm de suelo (kg ha ⁻¹)
V5	2089 a	273
Llenado de grano (R3)	9392 b	nd

nd: no determinado

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

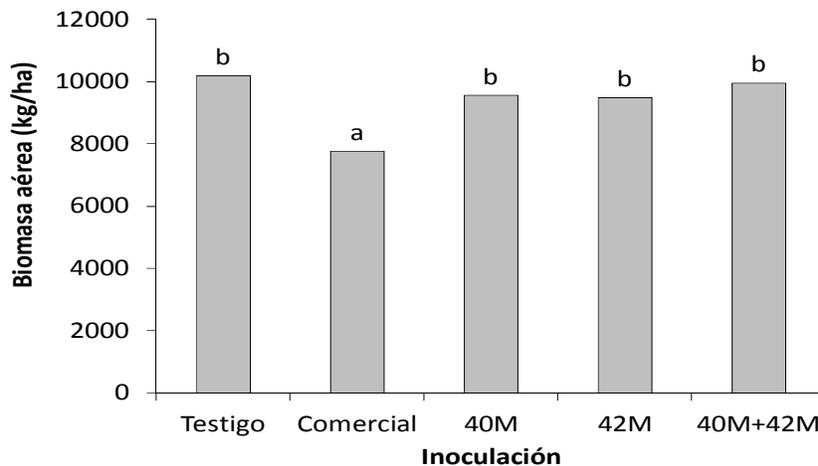


Figura 6.3. Biomasa aérea de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de R3, para cada nivel de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En el estado de V5 se observaron diferencias entre las diferentes dosis de fertilizante en los recuentos de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y MFN (Figura 6.4). En el estado de R3 se observaron diferencias entre los diferentes inoculantes en los recuentos de microorganismos MFN (Figura 6.5). En ambos estados ontogénicos se observaron diferencias entre muestreos únicamente en el recuento de microorganismos celulolíticos (Tabla 6.2). Este grupo microbiano parecería ser más sensible a los cambios producidos en la rizósfera durante cada estado ontogénico del cultivo. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los recuentos microbianos serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

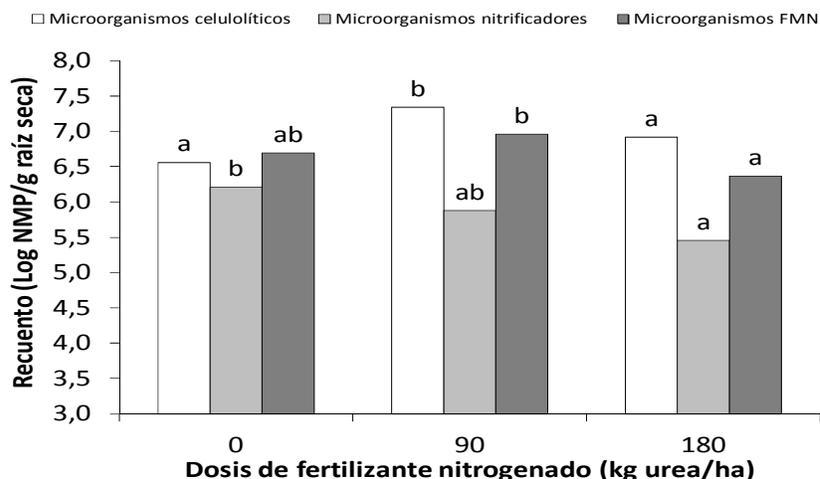


Figura 6.4. Recuentos de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y fijadores microaerofílicos de N₂ (MFN) en la rizósfera del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, para cada nivel de fertilización nitrogenada aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas para cada recuento según prueba de Tukey ($P < 0,05$).

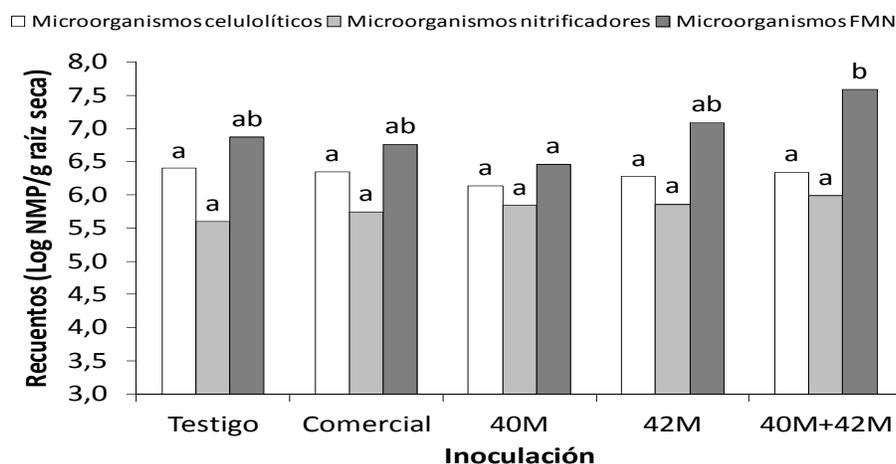


Figura 6.5. Recuentos de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y fijadores microaerofílicos de N₂ (MFN) en la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de R3, para cada nivel de inoculación aplicado. Letras distintas indican diferencias significativas para cada recuento según prueba de Tukey ($P < 0,05$).

Tabla 6.2. Recuento de microorganismos microaerofílicos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	MFN	Celulolíticos (Log NMP g ⁻¹ raíz seca)	Nitrificadores
V5	6,67 a	6,94 B	5,81 a
Llenado de grano (R3)	6,95 a	6,30 A	5,85 a

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de V5 se presenta en la Figura 6.6. Ambos ejes explicaron el 57% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido málico, histidina y glutamina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ácido oxálico, dextrosa y ácido láctico. Se observó que la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas estuvo determinada por la interacción de los factores inoculación y fertilización nitrogenada (Figura 6.6). En la Figura 6.7 se presenta el análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de llenado de granos (R3). Ambos ejes explicaron el 86% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por putrescina, dextrosa, glicina y celobiosa. El eje 2 estuvo conformado principalmente por glicerina y prolina. Las diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas en el estado de V5 se observaron más claramente en el estado de llenado de grano (R3) (Figura 6.7).

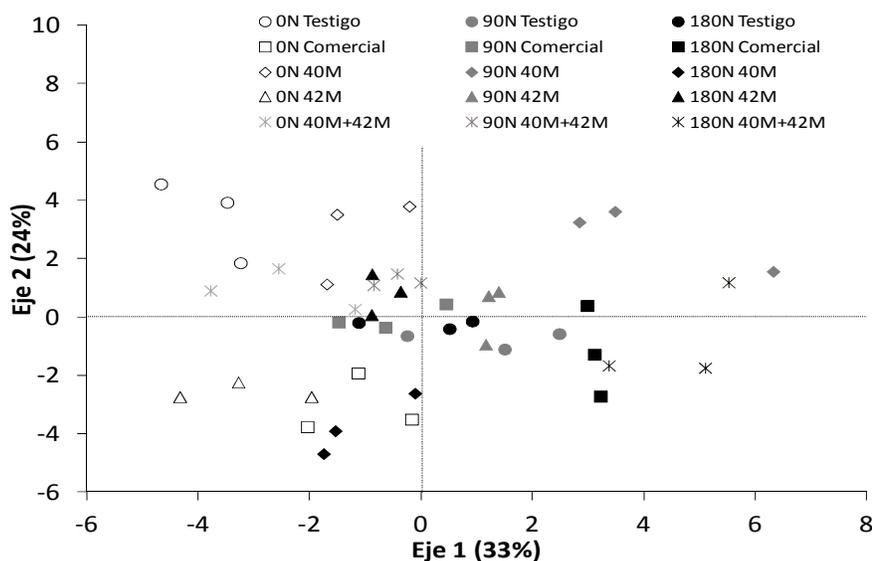


Figura 6.6. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 6.8. Ambos ejes explicaron el 72% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por arginina, ácido oxálico y tween 20. El eje 2 estuvo conformado principalmente por glutamina y putrescina. El análisis discriminante de los CLPP mostró que la fisiología de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera estuvo determinada, principalmente, por el estado ontogénico del cultivo (Figura 6.8) y por los tratamientos de inoculación y fertilización aplicados (Figuras 6.6, 6.7 y 6.8). El análisis del índice H' no mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, pero la diversidad funcional fue significativamente menor durante el estado de V5 (2,88) que durante el llenado de grano (R3) (2,99). En relación a la evaluación de la diversidad estructural mediante el análisis de los perfiles de T-RFLP del gen 16S ARNr, durante el transcurso de este trabajo fue posible realizar la extracción de ADN a partir de las muestras de este ensayo, pero no fue posible la amplificación del gen en el tiempo estipulado para la finalización del doctorado. Asimismo, las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

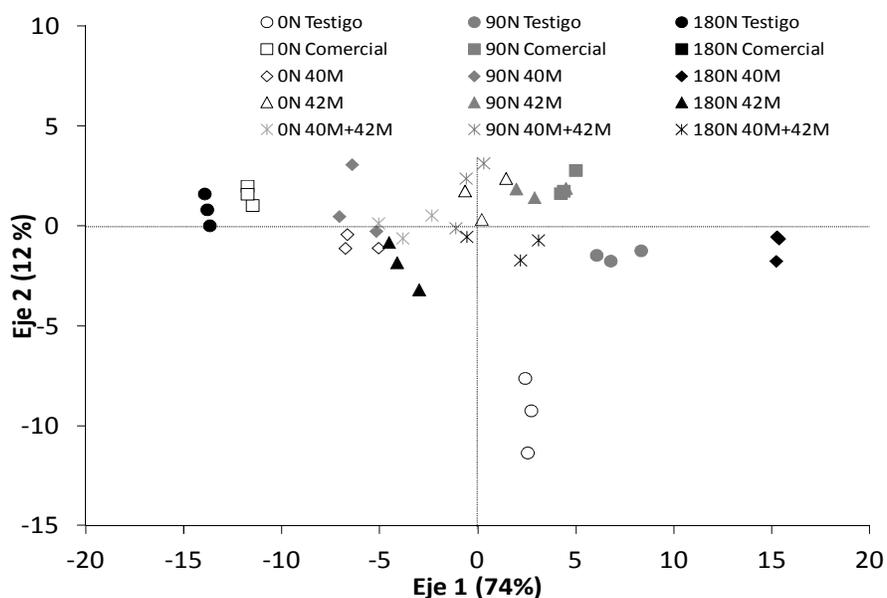


Figura 6.7. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

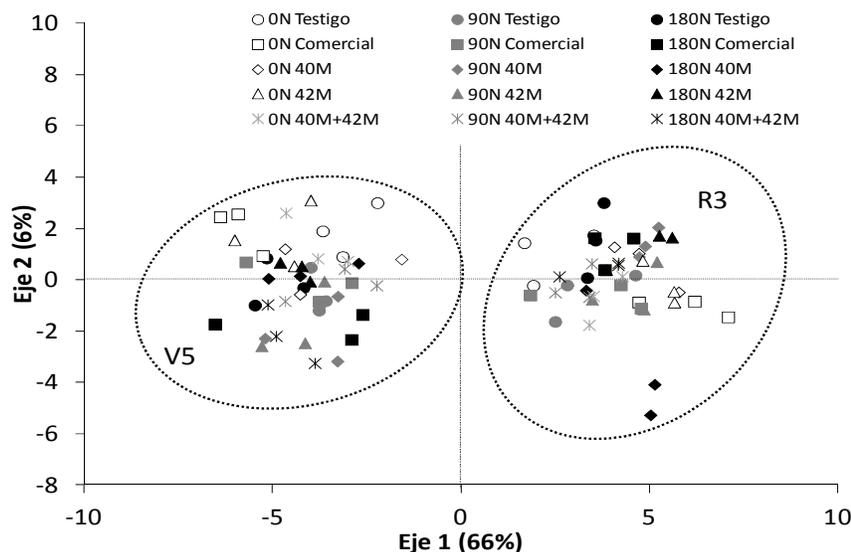


Figura 6.8. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El cultivo de maíz de este ensayo presentó un alto porcentaje de colonización radical en el estado de V5 (Tabla 6.3). La micorrización mostró una dinámica temporal que acompañó el desarrollo del cultivo, presentándose un 49% menos de colonización radical, 46% menos de arbusculos, y un 475% más de esporas en el estado de llenado de granos en comparación con el estado de V5 (Tabla 6.3). Únicamente en el estado de llenado de grano se observó que la inoculación afectó la densidad de longitud radical, por la cual las plantas inoculadas con el inoculante 40M presentaron mayor densidad de longitud radical respecto a las plantas testigo, con valores de 1,08 y 0,69, respectivamente. No se observaron diferencias en esta variable analizando las plantas inoculadas con todos los inoculantes en conjunto respecto a las plantas testigo, ni tampoco diferencias analizando las plantas inoculadas con inoculante comercial respecto a las plantas inoculadas con los inoculantes experimentales. Considerando únicamente los inoculantes experimentales, se observó que las plantas inoculadas con el inoculante 40M presentaron mayor densidad de longitud radical (1,08) respecto a las que presentaron las plantas inoculadas con el

inoculante 42M (0,84) y 40M+42M (0,73). Tampoco se observaron diferencias significativas en la densidad de longitud radical debidas a los tratamientos de fertilización. Finalmente, ninguno de los tratamientos evaluados presentó efectos significativos sobre las variables colonización radical y porcentaje de arbusculos, vesículas y esporas. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a la micorrización natural serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

Tabla 6.3. Colonización radical y estructuras de hongos micorrícicos arbusculares presentes en diferentes estados del cultivo de maíz, en el partido de Pehuajó, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Densidad de				
	Longitud Radical (cm/cm ³)	Colonización radical (%)	Arbusculos (%)	Vesículas (%)	Esporas (%)
V5	0,76 a	60,5 B	54,8 B	9,97 a	0,4 a
Llenado de grano (R3)	0,84 a	31,1 A	29,8 A	9,91 a	2,3 b

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).
 Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

En resumen, en este ensayo se observó un efecto significativo de la fertilización sobre la generación del rendimiento del cultivo y efectos significativos de la inoculación sobre el rendimiento y la generación de biomasa aérea. Estos factores también generaron cambios en el número de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y MFN y sobre la funcionalidad de las comunidades microbianas rizosféricas. Asimismo, y tal como resulta esperable, se observaron diferencias en la generación de biomasa aérea y radical a lo largo del ciclo del cultivo, acompañadas de cambios en la diversidad funcional de las comunidades microbianas asociadas y modificaciones en la micorrización. Este trabajo muestra por primera vez los efectos de los tratamientos de inoculación sobre la micorrización natural en dos estados ontogénicos del cultivo de maíz en condiciones de campo. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos en este capítulo serán discutidas más ampliamente en el capítulo 8.

Capítulo 7. Evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada y fosforada en cultivo de maíz.

7.1. Descripción de los ensayos y determinaciones realizadas.

Con el objetivo de evaluar los efectos sobre las comunidades microbianas rizosféricas nativas de la interacción entre la inoculación con *A. brasilense* y la fertilización nitrogenada, por una parte, y de la interacción entre la inoculación con *A. brasilense* y la fertilización fosforada, por otra, se realizaron dos ensayos a campo de maíz en la campaña 2010-2011 en el establecimiento “El Correntino”, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires (36° 11' 1" latitud sur y 62° 19' 38" longitud oeste) (Figuras 3 y 8 del anexo 2). Ambos ensayos fueron conducidos en un mismo lote cuyo suelo es clasificado como Hapludol éntico, de textura franco arenosa, serie Piedritas (Geolnta, 2013) (Figura 9 del anexo 2). Las características químicas de los primeros 20 cm a la siembra fueron: pH 5.3 (1:2,5 suelo:agua), conductividad 0,78 dS m⁻¹, 2,9% de materia orgánica, 0,16% de N orgánico, 11,8 ppm de P Bray. El promedio de precipitaciones ocurridas en Anguil, La Pampa fue de 470 mm durante el ciclo del cultivo (SMN, 2014a).

El híbrido de maíz utilizado fue DK190 MG RR2 (Dekalb®) con muy buen comportamiento al Mal de Río Cuarto y con resistencia genética a *Diatraea saccharalis* (barrenador del tallo) y al herbicida Roundup Ready 2® (Monsanto®). La semilla fue tratada con el insecticida Poncho® (Clotianidina como principio activo; Bayer®) antes de la siembra previamente a la aplicación del inoculante. La secuencia de cultivos en el lote utilizado era soja-trigo/soja-maíz, bajo siembra directa. La siembra del cultivo del ensayo se realizó el 1 de Octubre de 2010. La densidad de siembra fue 82000 semillas ha⁻¹ con un espacio entre hileras de 52,5 cm. El diseño de los ensayos fue en bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial de dos factores. Se determinaron tres bloques en forma perpendicular a la pendiente topográfica, menor al 1%. Cada una de las parcelas experimentales tuvo una superficie total de 222,53 m² (6,09 m de ancho y 36,54 m de largo). Uno de los factores fue la inoculación con dos niveles: testigo (sin inoculación) e inoculado con 40M+42M. El segundo factor, en uno de los ensayos, fue la fertilización nitrogenada realizada a la siembra, con tres niveles de urea incorporada al suelo con sembradora de grano fino, en sentido perpendicular al sentido de la siembra. En dicho ensayo, además, se aplicó una fertilización de base de 120 kg SPT ha⁻¹. Los niveles de fertilización nitrogenada aplicados fueron: 0, 100 y 200 kg urea ha⁻¹ (con una concentración de 46% de N, las dosis equivalen a 0, 46 y 92 kg N ha⁻¹, respectivamente). El segundo

factor del otro ensayo fue la fertilización fosforada, con tres niveles de SPT incorporado junto a la semilla durante la siembra. En este ensayo no se aplicó fertilización nitrogenada de base. Los niveles de fertilización fosforada aplicados fueron: 0, 60 y 120 kg SPT ha⁻¹ (con una concentración de 20% de P, las dosis equivalen a 0, 12 y 24 kg P ha⁻¹, respectivamente). La dosis de inoculación aplicada fue de 10 ml kg⁻¹ de semilla. El recuento de bacterias del inoculante 40M+42M fue de 2,0 x 10¹¹ UFC ml⁻¹.

En este ensayo, los muestreos se realizaron a los 61 DDS, en etapa vegetativa (V5 de Ritchie y Hanway, 1982) y a los 129 DDS, en etapa reproductiva (Grano lechoso R3 de Ritchie y Hanway, 1982). El muestreo de rendimiento se realizó a la cosecha del cultivo (214 DDS). Se realizaron las determinaciones de biomasa aérea, componentes del rendimiento, CLPP, y recuentos de microorganismos MFN, celulolíticos y nitrificadores.

7.2. Resultados y discusión.

7.2.1. Ensayo de evaluación de inoculación y fertilización fosforada.

En este ensayo se observaron valores promedio de rendimiento y biomasa aérea de 5830 y 11560 kg ha⁻¹, respectivamente. Los rendimientos obtenidos fueron menores al promedio obtenido para el cultivo de maíz en el partido de Trenque Lauquen, que fue de 6158 kg ha⁻¹ (MAGyP, 2014). Probablemente, esto se deba a los niveles muy bajos de precipitaciones registrados, dado que en ensayos de rendimiento realizados en el mismo campo, el híbrido AX886, utilizado en el ensayo de Pehuajó (sección 6.1), rindió 10809 kg ha⁻¹, mientras que el híbrido utilizado en este ensayo, rindió 9375 kg ha⁻¹ en un campo cercano, todos ellos en la campaña 2009-2010 (Ridzo, 2015b). En esta campaña, las precipitaciones fueron más favorables para el cultivo (Skansi, 2010b). En esta misma campaña, este híbrido rindió alrededor de 14000 kg ha⁻¹ en Cólón, provincia de Buenos Aires (Ferraris y Couretot, 2012) y 13463 kg ha⁻¹ en San Francisco, Córdoba (Centeno *et al.*, 2010), mientras que en Marcos Juárez, Córdoba rindió 12224 kg ha⁻¹, en la campaña 2011-2012 (Vallone *et al.*, 2012). En este ensayo, la información meteorológica disponible corresponde a datos de las estaciones meteorológicas de la EEA Anguil del INTA y de Santa Rosa, La Pampa del Servicio Meteorológico Nacional. Éstas son las fuentes de información más cercanas a la zona del ensayo que tienen similares características climáticas. Las precipitaciones registradas en Anguil durante el

período del ensayo fueron similares al promedio 1981-1990 de 485 mm, observado en Santa Rosa, La Pampa en el mismo período de tiempo (SMN, 2014b). Además, el índice de precipitación estandarizado al período 1961-2010 para los meses de diciembre, enero y febrero fue entre -0.5 y 0.5, es decir, normal (Skansi, 2011a), período en el cual se ubica el período crítico de definición del rendimiento del cultivo de maíz (Cárcova *et al.*, 2004a). Sin embargo, se registraron grandes déficits hídricos en el mes de diciembre, con un índice de precipitación estandarizado al período 1961-2010 para los meses de octubre, noviembre y diciembre entre -1.5 y -2.0, es decir, muy seco o sequía severa (Skansi, 2010a). Probablemente, las precipitaciones registradas en el segundo trimestre del cultivo no compensaron el déficit hídrico del primer trimestre, afectando el rendimiento del cultivo.

Se observó que ninguno de los factores evaluados produjo una respuesta significativa sobre el rendimiento o sobre la generación de biomasa aérea. Tampoco se observaron efectos la inoculación y la fertilización sobre los componentes del rendimiento, peso de 1000 granos y número de granos ha^{-1} , presentándose valores promedios de 0,29 kg y 22058073 granos ha^{-1} , respectivamente, ni diferencias significativas en los valores de IC, que fue en promedio de 0,51 para todos los tratamientos aplicados. Finalmente, no se observaron diferencias significativas debidas a los tratamientos sobre la producción de biomasa radical en el estado de V5 (Tabla 7.1). Si bien no se observó ningún efecto significativo de los tratamientos sobre las variables mencionadas, los mayores valores de rendimiento fueron obtenidos en las parcelas inoculadas y fertilizadas con 120 kg SPT ha^{-1} , observándose un 12% más de rendimiento que las parcelas testigo, mientras que la misma dosis de fertilización fosforada incrementó el rendimiento un 3%. Asimismo, la fertilización y la inoculación incrementaron la producción de biomasa aérea entre un 2,5 y 4,4%, mientras que sólo la fertilización la incrementó hasta un 5%. En los estados ontogénicos de V5 y R3 no se observaron efectos de los tratamientos evaluados sobre la producción de biomasa aérea pero sí, y como resultaría esperable, se observaron diferencias entre estados ontogénicos (Tabla 7.1). Tampoco se observaron diferencias en los recuentos del NMP de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y MFN debidas a los tratamientos evaluados, pero se registraron diferencias entre los diferentes estados ontogénicos del cultivo (Tabla 7.2). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los parámetros agronómicos del cultivo y los recuentos de microorganismos rizosféricos serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

Tabla 7.1. Biomasa aérea en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Biomasa aérea (kg ha ⁻¹)	Biomasa radical de 0-20 cm de suelo (kg ha ⁻¹)
V5	1826 a	111
Llenado de grano (R3)	13231 b	nd

nd: no determinado

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

Tabla 7.2. Recuento de microorganismos microaerófilos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	MFN	Celulolíticos (Log NMP g ⁻¹ raíz seca)	Nitrificadores
V5	7,43 b	7,40 b	6,22 b
Llenado de grano (R3)	5,49 a	5,39 a	4,72 a

Letras distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P < 0,05$).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de V5 se presenta en la Figura 7.1. Ambos ejes explicaron el 75% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido cítrico, maltosa e histidina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ramnosa, prolina y glutamina. En este muestreo, la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas estuvo determinada por la interacción entre la inoculación y los niveles de fertilización fosforada (Figura 7.1). En la Figura 7.2 se presenta el análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de llenado de granos (R3). Ambos ejes explicaron el 88% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por histidina y ácido cítrico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por xilosa y dextrosa. En este muestreo, contrariamente a lo observado en el estado vegetativo, las comunidades microbianas rizosféricas presentaron patrones fisiológicos similares (Figura 7.2).

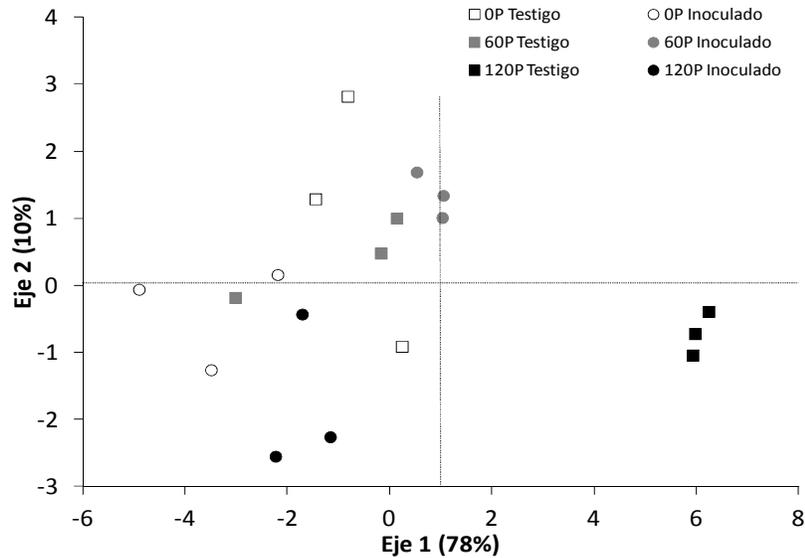


Figura 7.1. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

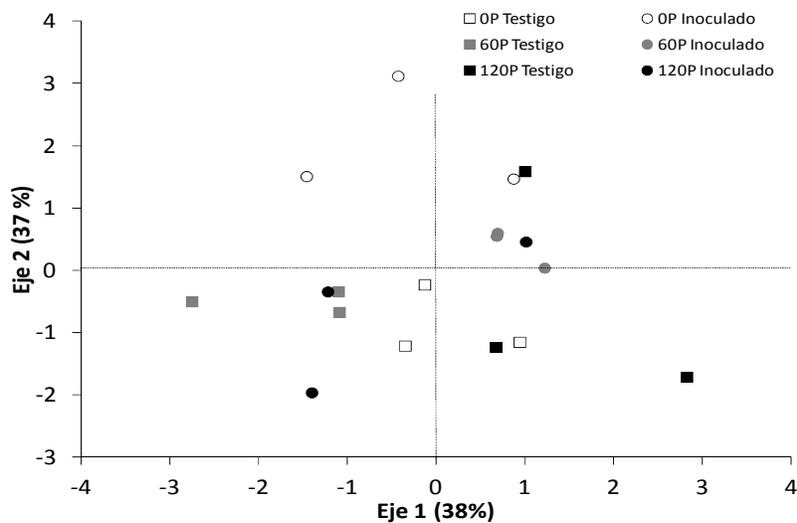


Figura 7.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 7.3. Ambos ejes explicaron el 89% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido málico, maltosa y putrescina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ácido oxálico y glutamina. El análisis discriminante de los CLPP mostró que la fisiología de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de las plantas estuvo determinada por el estado ontogénico del cultivo, en interacción con los tratamientos de inoculación y fertilización aplicados (Figura 7.3). El análisis del índice H' no mostró diferencias entre estados ontogénicos del cultivo, siendo el valor promedio de 3,03. Tampoco se observaron diferencias significativas para este índice entre los distintos tratamientos en ninguno de los dos momentos del ciclo del cultivo. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

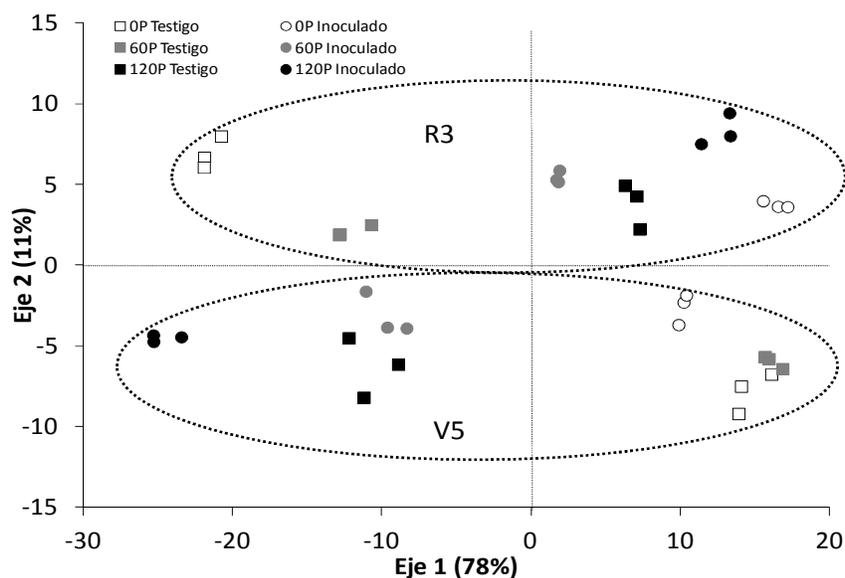


Figura 7.3. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización fosforada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

En resumen, en este ensayo se observó que el desarrollo del cultivo determinó variaciones en los parámetros agronómicos. En cuanto al efecto de la fertilización fosforada y la inoculación, no se observaron respuestas significativas en los parámetros agronómicos del cultivo, en los recuentos de los grupos microbianos evaluados, pero sí en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas rizosféricas, en interacción con el estado ontogénico del cultivo. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos en este capítulo serán discutidas más ampliamente en el capítulo 8.

7.2.2. Ensayo de evaluación de inoculación y fertilización nitrogenada.

En este ensayo se observaron valores promedio de rendimiento y biomasa aérea de 5920 y 11740 kg ha⁻¹, respectivamente. Los rendimientos obtenidos fueron menores al promedio obtenido para el cultivo de maíz en el partido de Trenque Lauquen, que fue de 6158 kg ha⁻¹ (MAGyP, 2014). Probablemente, esto se deba a los niveles muy bajos de precipitaciones registrados, como ya se discutió en la sección 7.2.1. Se observó que ninguno de los factores evaluados produjo una respuesta significativa sobre el rendimiento o sobre la generación de biomasa aérea. No se observaron efectos la inoculación o la fertilización sobre la producción de biomasa radical en el estado de V5 (Tabla 7.3) ni sobre los componentes del rendimiento, peso de 1000 granos y número de granos ha⁻¹, presentándose valores promedios de 0,30 kg y 22398592 granos ha⁻¹, respectivamente, ni sobre los valores de IC, siendo en promedio de 0,51 para todos los tratamientos aplicados. En los estados ontogénicos de V5 y R3 no se observaron efectos de los tratamientos evaluados sobre la producción de biomasa aérea pero sí, y como resultaría esperable, se observaron diferencias entre estados ontogénicos (Tabla 7.3). Tampoco se observaron efectos de la inoculación y la fertilización sobre el NMP de microorganismos celulolíticos, nitrificadores y MFN determinado en ambos muestreos, pero se observaron diferencias en el recuento de los diferentes grupos microbianos evaluados (Tabla 7.4). Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los parámetros agronómicos del cultivo y los recuentos de microorganismos rizosféricos serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

Tabla 7.3. Biomasa aérea en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	Biomasa aérea (kg ha ⁻¹)	Biomasa radical de 0-20 cm de suelo (kg ha ⁻¹)
V5	1989 a	111
Llenado de grano (R3)	13032 b	nd

nd: no determinado
 Letras distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P<0,05$).

Tabla 7.4. Recuento de microorganismos microaerófilos fijadores de nitrógeno (MFN), celulolíticos y nitrificadores en dos estados del cultivo de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires.

Estado del cultivo	MFN	Celulolíticos (Log NMP g ⁻¹ raíz seca)	Nitrificadores
V5	7,54 B	7,39 b	6,04 b
Llenado de grano (R3)	5,42 A	5,43 a	4,64 a

Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Tukey ($P<0,05$).
 Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas según test de Kruskal-Wallis ($P<0,05$).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de V5 se presenta en la Figura 7.4. Ambos ejes explicaron el 77% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido láctico, ácido salicílico y ácido málico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por manitol, ácido láctico, ácido cítrico y glicina. Se observó que las comunidades microbianas rizosféricas presentaron patrones fisiológicos similares entre sí (Figura 7.4). En la Figura 7.5 se presenta el análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en el estado de llenado de granos (R3). Ambos ejes explicaron el 70% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por glicerina y prolina. El eje 2 estuvo conformado principalmente por dextrosa y ácido cítrico. Al igual que en el estado de V5 (Figura 7.4), en R3 las comunidades microbianas rizosféricas presentaron patrones fisiológicos bastante similares entre sí (Figura 7.5).

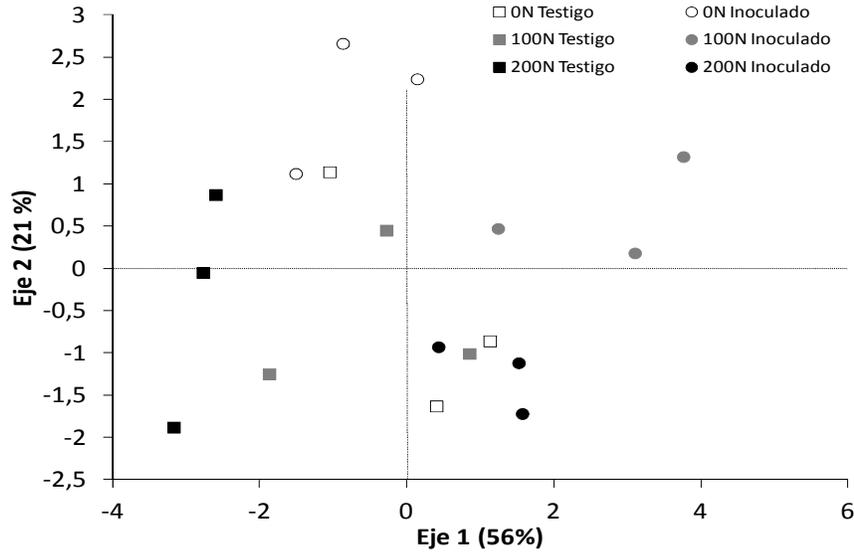


Figura 7.4. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de V5, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

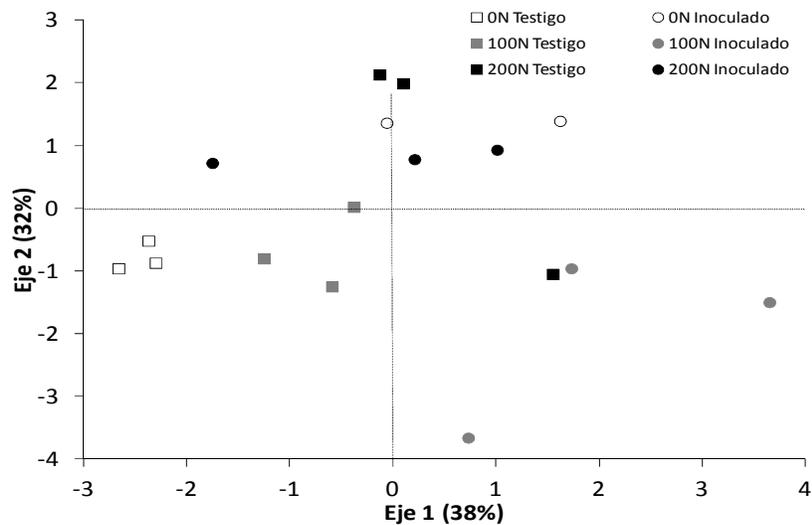


Figura 7.5. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en el estado de llenado de granos (R3), bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas rizosféricas presentes en ambos estados ontogénicos del cultivo se presenta en la Figura 7.6. Ambos ejes explicaron el 95% de la varianza total. El eje 1 estuvo principalmente conformado por ácido oxálico y ácido láctico. El eje 2 estuvo conformado principalmente por ácido málico e histidina. El análisis discriminante de los CLPP mostró que la fisiología de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de las plantas estuvo determinada por el estado ontogénico del cultivo, en interacción con los tratamientos de inoculación y fertilización aplicados (Figura 7.6). El análisis del índice H' no mostró diferencias entre estados ontogénicos del cultivo, siendo el valor promedio de 3,02. Tampoco se observaron diferencias significativas para este índice entre los distintos tratamientos en ninguno de los dos momentos del ciclo del cultivo. Las implicancias de los resultados obtenidos respecto a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas serán discutidas más detalladamente en el capítulo 8.

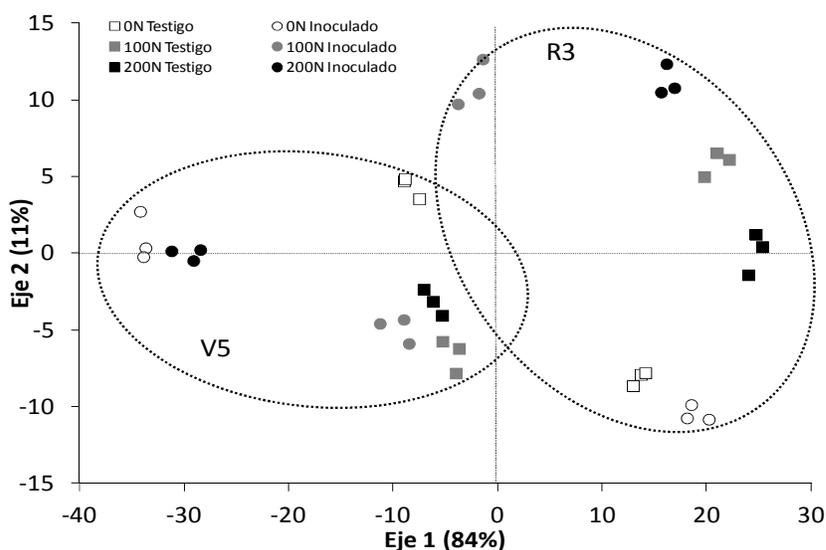


Figura 7.6. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas de rizósfera de maíz, en la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires, en dos momentos del ciclo del cultivo, bajo diferentes tratamientos de inoculación y fertilización nitrogenada. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

En resumen, en este ensayo se observó que el desarrollo del cultivo determinó variaciones en los parámetros agronómicos y en el número de microorganismos nitrificadores. En cuanto al efecto de la fertilización nitrogenada y la inoculación, no se observaron respuestas significativas en los parámetros agronómicos del cultivo y en los recuentos de microorganismos celulolíticos y MFN. Se observó que la fertilización nitrogenada afectó el número de microorganismos nitrificadores, y todos los tratamientos evaluados generaron modificaciones en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas rizosféricas, en interacción con el estado ontogénico del cultivo. Las implicancias agronómicas y ecológicas de los resultados obtenidos en este capítulo serán discutidas más ampliamente en el capítulo 8.

Capítulo 8. Discusión general y conclusiones.

En trabajos previos se han demostrado valores de respuesta en el rendimiento de los cultivos a la inoculación con *A. brasilense* del orden del 12% en trigo, y en maíz del 9% (Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2008), del 18% (Rodríguez-Cáceres, 2008), o incluso, reportes con incrementos en el rendimiento de maíz de más del 70% (García de Salamone, 2012a). En este trabajo, la práctica de inoculación con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M generó aumentos significativos del rendimiento en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó en la campaña 2010-2011 (Figura 6.2), y en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto en la campaña 2011-2012, en interacción con la práctica de fertilización (Figura 5.2). En estos ensayos, el nivel de respuesta a la inoculación estuvo en el rango del 3% al 30% para trigo sin y con fertilización fosforada, respectivamente, y del 10% al 50%, para maíz sin y con fertilización nitrogenada, respectivamente. En los otros ensayos, si bien no se generaron aumentos significativos, se logró un incremento del 9% del rinde de maíz y trigo. Este porcentaje corresponde a 90 y 75 U\$S ha⁻¹ de incremento en el ingreso de los productores con cada uno de los cultivos, respectivamente, teniendo en consideración el valor de los granos promedio de los años 2009 y 2011 (Agromercado, 2013), que fueron las campañas en las cuales se realizaron dichos ensayos. Si se comparan estos incrementos con el costo de los inoculantes (Tabla 8.1), se puede concluir que en ambos ensayos se logró cubrir los gastos de esta práctica agronómica y, aún así, tener mayores márgenes de ingreso. Entonces, a pesar de lograrse incrementos no significativos estadísticamente, no debe perderse de vista que la inoculación permitió incrementos económicamente significativos para el productor.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en este trabajo son acordes a lo reportado para el cultivo de trigo y de maíz respecto a valores de rendimiento (MAGyP, 2014) y de índices de cosecha (Calderini *et al.*, 1995; Cárcova *et al.*, 2004b), con las consideraciones pertinentes detalladas en la discusión del capítulo correspondiente a cada uno de los ensayos. En el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto, las diferencias observadas en el rendimiento (Figuras 5.1 y 5.2) pudieron ser explicadas por los componentes del rendimiento (Figuras 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6). Otros autores también han encontrado diferencias en los componentes del rendimiento generadas por la inoculación con *A. brasilense* de cultivos de trigo (García de Salamone *et al.*, 1990; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2009; Maddonni *et al.*, 2004b) y de arroz (García de Salamone *et al.*, 2010; 2012).

Tabla 8.1. Costos de los fertilizantes e inoculantes aplicados en cada uno de los ensayos realizados. Elaborado en base a datos de Mayo de 2013 (Fuente: Agromercado, 2013).

Cultivo y localidad del ensayo	Tipo de fertilizante y costo ³ (U\$S ha ⁻¹)	Costo inoculante ⁴ (U\$S ha ⁻¹)
Trigo V. Moll	Solmix: sd	30,6
Trigo 30 de Agosto	Urea: 45,8	20,9
	SPT: 39,0	20,9
Maíz 30 de Agosto (N) ¹	Urea: 61,0	7,5
Maíz 30 de Agosto (P) ²	SPT: 39,0	7,5
Maíz Pehuajó	Urea: 54,9	8,4

sd: sin dato

¹(N) ensayo en el cual se evaluó la interacción entre la inoculación y la fertilización nitrogenada.

²(P) ensayo en el cual se evaluó la interacción entre la inoculación y la fertilización fosforada.

³El costo del fertilizante corresponde a la dosis intermedia aplicada. Para calcular el costo por hectárea de la dosis máxima de fertilización se debe duplicar este valor.

⁴El costo del inoculante experimental de cada ensayo corresponde al costo de un inoculante comercial para el mismo cultivo y con similar formulación. El costo del inoculante del ensayo de Pehuajó corresponde al promedio entre el costo del inoculante comercial utilizado y el costo del inoculante experimental, estimado como se mencionó anteriormente.

De igual forma, en este trabajo se observaron aumentos de la biomasa aérea de los cultivos generados por la inoculación, significativos (Figuras 5.8 y 6.3) y no significativos (secciones 4.2 y 7.2), en concordancia con lo observado por otros autores para cultivos de trigo (Baldani *et al.*, 1987; Boddey *et al.*, 1986; Caballero-Mellado, 2008; Casaretto y Labandera, 2008; Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2008; Freitas y Germida, 1990; Naiman *et al.*, 2009), arroz (García de Salamone *et al.*, 2010; 2012; Ferraris y Couretot, 2008) y de maíz (Caballero-Mellado, 2004; Cappelletti *et al.*, 2004; Casaretto y Labandera, 2008; Díaz Zorita *et al.*, 2004; García de Salamone *et al.*, 1996, García de Salamone y Monzón de Asconegui, 2008). Estos aumentos en los niveles de biomasa aérea y también en la biomasa radical, significativos (sección 6.2) o no (secciones 4.2, 5.2, 7.2.1 y 7.2.2) generados por los tratamientos evaluados, constituyen un mayor aporte de residuos al suelo del lote, luego de la cosecha de los cultivos. Teniendo en cuenta que no sólo es mayor la cantidad de rastrojo, sino también de buena calidad para el proceso de humificación (Sisti *et al.*, 2004), y si el manejo de los residuos es acorde a las buenas prácticas, dejándolo en superficie para que su

degradación y la mineralización de nutrientes ocurran más lentamente, se favorecerá el proceso de acumulación de materia orgánica del suelo, mejorando la calidad y la salud del mismo, y contribuyendo a la sustentabilidad agrícola (Lal, 1997; Urquiaga *et al.*, 2004). Además, con un manejo adecuado de los rastrojos, el secuestro de CO₂ es más eficiente, con lo que se reducen las emisiones de este gas a la atmósfera, con la consecuente disminución del calentamiento global (Lal, 1997).

La respuesta de los cultivos a la inoculación con *A. brasilense* se encuentra determinada por las interacciones producidas entre la cepa bacteriana inoculada, el genotipo vegetal y el ambiente (Abril *et al.*, 2006; Caballero-Mellado, 2004; García de Salamone y Monzón de Asconegui, 2008; Lucy *et al.*, 2004), teniendo en cuenta también la microbiota nativa presente en ese ambiente (Aeron *et al.*, 2011; Bashan, 1999), que constituirá la competencia ecológica del inoculante (Cummins, 2009). En relación a esto, otros autores observaron interacciones entre la cepa bacteriana inoculada y el genotipo de maíz (García de Salamone y Döbereiner, 1996), de arroz (García de Salamone *et al.*, 2012), de trigo (García de Salamone *et al.*, 2009), de frutilla (Pedraza *et al.*, 2007) y de *Brachiaria* spp. (Reis *et al.*, 2004). En cuanto al mecanismo de la bacteria en sí, la hipótesis aditiva (Bashan y Levanony, 1990) indica que son varios los mecanismos de PGP de una PGPR que trabajan en forma simultánea o en sucesión durante el ciclo de vida de la planta, y que determinan los efectos observables en el crecimiento y rendimiento vegetal (Bashan *et al.*, 2004). Cuando uno o más mecanismos se encuentran inactivos debido a algunas de las interacciones antes mencionadas, como condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo del cultivo, puede que los beneficios de la asociación planta-bacteria no resulten tan evidentes (Bashan y Levanony, 1990; Kaushik *et al.*, 2002), lo que podría explicar la presencia y la ausencia de respuestas significativas a la inoculación con *A. brasilense* en los ensayos realizados en este trabajo. En relación a esto, Abril *et al.* (2006) mostraron que las campañas agrícolas con menores precipitaciones presentaron menor colonización rizosférica de microorganismos MFN, aunque no mencionan si esto finalmente generó diferencias o no en los parámetros agronómicos de los cultivos. Además, Reis *et al.* (2004) mostraron un menor NMP de microorganismos MFN en plantas, lo que fue asociado a períodos de sequía. Por el contrario, en condiciones de sequía simulada, Creus *et al.* (2004) mostraron disminuciones del rendimiento de trigo debido a la sequía, pero sin modificaciones significativas en el NMP de microorganismos MFN. En este trabajo, el mayor número de este grupo microbiano se observó en

los ensayos sometidos a estrés hídrico (Tablas 7.2 y 7.4), respecto a los recuentos realizados en los otros ensayos (sección 4.2 y Tablas 5.1 y 6.2).

De los resultados significativos sobre la generación de biomasa aérea y rendimiento obtenidos en los ensayos de este trabajo, el caso del ensayo de maíz realizado en Pehuajó merece una discusión más detallada. En dicho ensayo, en el estado reproductivo de llenado de grano (R3) se observaron diferencias significativas en la generación de la biomasa debidas a la inoculación (Figura 6.3), que no se observaron en el estado vegetativo de V5 (sección 6.2). Esto podría ser adjudicado a una diferencia en la duración del ciclo del cultivo generada por un retraso en la senescencia foliar, lo que ya ha sido documentado para *Azospirillum* sp. (Sarig *et al.*, 1990). Uno de los mecanismos para retrasar la senescencia implica la reducción de los niveles de etileno en el vegetal, mediante enzimas como la ACC desaminasa (Grichko y Glick, 2001). Si bien la actividad ACC desaminasa fue estimada en este trabajo para las cepas 40M y 42M (Tabla 3.1) en condiciones *in vitro*, y por primera vez para *A. brasilense*, esto no explicaría los resultados obtenidos debido a que los niveles de biomasa generados en las plantas inoculadas con estas cepas fueron similares a los producidos por las plantas testigo no inoculadas (Figura 6.3). Esto parecería contradecirse con las diferencias observadas en los niveles de rendimiento (Figura 6.2). Sin embargo, dichas diferencias podrían ser explicadas por un mayor aborto de flores en las plantas de las parcelas testigo no inoculadas, producto del ataque de *Ustilago maydis*, agente causal de la enfermedad conocida como “carbón común del maíz”. Si bien no se realizaron mediciones a campo tendientes a confirmar esta hipótesis, durante el muestreo de llenado de grano se observó una alta incidencia de esta enfermedad, que se caracteriza por el desarrollo de agallas dentro de las espigas, llevando a una reducción del rendimiento (Windauer *et al.*, 2004). La aparición de esta enfermedad se ve incrementada durante un tiempo húmedo, lluvioso, y de temperaturas cálidas (Pérez Fernández, 2011), el cual fue característico en la zona de este ensayo durante la etapa reproductiva del cultivo, realizado durante la campaña de 2010-2011. Si bien no existen antecedentes de una mayor resistencia a esta enfermedad debida a la inoculación con *Azospirillum* sp., se ha demostrado la resistencia sistémica inducida producida ante el ataque de otros agentes fitopatógenos, tales como *Magnaporthe oryzae* y *Xanthomonas oryzae* en arroz (Yasuda *et al.*, 2009), *Colletotrichum acutatum* en frutilla (Tortora *et al.*, 2012) y *Pseudomonas syringae* en tomate (Bashan y Bashan, 2002). Además, se ha reportado que *Azospirillum* sp. genera antibiosis (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006) y produce sideróforos (Pedraza

et al., 2007), habiéndose comprobado en este trabajo la producción de éstos últimos por las cepas 40M y 42M, en condiciones *in vitro* (sección 3.2.2). Si bien en este trabajo no se realizaron mediciones a campo tendientes a confirmarlo, todo lo antes mencionado sugiere que la inoculación con *A. brasilense* podría reducir el efecto negativo del ataque de *U. maydis* en el cultivo de maíz, lo que debería ser evaluado en trabajos posteriores.

En conjunto con la práctica agronómica antes mencionada, relacionada al mantenimiento del rastrojo en superficie para una mineralización más lenta que favorecería la acumulación de materia orgánica en el suelo, otra de las buenas prácticas agropecuarias es la utilización adecuada de los fertilizantes. Los mismos deben cubrir las necesidades de nutrientes de los cultivos, sin afectar significativamente la disponibilidad de esos nutrientes en el suelo, y reduciendo el riesgo de contaminación ambiental (Tilman *et al.*, 2002). En nuestro país, el consumo de fertilizantes aumentó un 50% en los últimos diez años (Fertilizar, 2014a), aplicándose fertilizantes nitrogenados en el 89% del área total sembrada con trigo y en el 91% del área total sembrada con maíz, con dosis promedio de 166 y 197 kg ha⁻¹, respectivamente, durante la campaña 2012-2013 (Fertilizar, 2014b). El trigo y el maíz son los dos cultivos que presentan mayor porcentaje de reposición de nutrientes en todas las campañas, correspondiendo este porcentaje al balance entre lo que se aplica y lo que se remueve por la cosecha de los granos. El porcentaje de reposición en la campaña 2011-2012 fue del 95% y 80%, para cada cultivo, respectivamente (González Sanjuan *et al.*, 2013). Esto demuestra que la aplicación de fertilizantes no siempre cubre las necesidades de fertilización, en parte debido a las fluctuaciones de los mercados, en relación al precio de los fertilizantes y de los granos. Además, bajo determinadas condiciones ambientales, la eficiencia de recuperación, es decir, la relación entre la cantidad aplicada y la cantidad absorbida por el cultivo, puede verse disminuida (Steinbach, 2005). Es por ello que se vuelve necesario aumentar la EUF (Tilman *et al.*, 2002).

En relación a lo anterior, se debe destacar que la FBN constituye una fuente esencial y potencial de N para el desarrollo de agroecosistemas sustentables (Urquiaga *et al.*, 2004). Se ha demostrado que ciertas cepas de *Azospirillum* pueden fijar N₂ en asociación con maíz en niveles de suministro equivalente a 100 kg N ha⁻¹ (García de Salamone y Döbereiner, 1996). Además, esta PGPR puede aumentar la cantidad de pelos radicales y raíces adventicias (Okon y Vanderleyden, 1997), aumentando la exploración del perfil del suelo y maximizando la absorción de nutrientes (Dardanelli *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2001). Esta combinación de mecanismos constituye una

posibilidad para mejorar la EUF aplicados en un gran número de cultivos y bajo diferentes condiciones climáticas y edáficas (Caballero-Mellado, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2001). En trabajos previos, se encontró que la aplicación de inoculantes comerciales formulados con bacterias del género *Azospirillum* produjo aumentos en el rendimiento de trigo, en combinación con la aplicación de fertilizante nitrogenado en forma de urea (Naiman *et al.*, 2009). Incluso la inoculación con las mismas cepas que las utilizadas en este trabajo también produjo incrementos de rendimiento en arroz, en combinación con la aplicación de fertilizante mezcla de micronutrientes (García de Salamone *et al.*, 2010). En relación a esto, y en línea con lo mencionado anteriormente respecto a que la respuesta a la inoculación depende de las condiciones ambientales, algunos autores mostraron mayores incrementos del rendimiento y más consistentes en condiciones de intermedios a bajos o medios niveles de fertilización (Dobbelaere *et al.*, 2001; Kaushik *et al.*, 2002). Los ensayos realizados durante este trabajo con respuesta significativa a la inoculación mostraron que la aplicación del inoculante 40M+42M mejoró la EUF del fertilizante fosforado por el cultivo de trigo (Figura 5.2) y del fertilizante nitrogenado por el cultivo de maíz (Figuras 6.1 y 6.2 y sección 6.2). Además, Hungria *et al.* (2010) reportaron respuestas en rendimiento de trigo del 30% bajo inoculación de dos cepas de *A. brasilense* combinadas, cuya aplicación individual generó respuestas del orden del 18%. En este trabajo, para el cultivo de trigo no se pudo arribar a una conclusión similar, debido a que en el ensayo realizado en la localidad de Villa Moll en el que se evaluaron los inoculantes monocepa y el inoculante mezcla, no se obtuvo una respuesta significativa en el rendimiento (sección 4.2). Sin embargo, en el cultivo de maíz realizado en Pehuajó, la inoculación de las cepas 40M y 42M en forma conjunta resultó más eficiente en términos de rendimiento, generación de biomasa aérea y EUF, en comparación con la inoculación de las cepas por separado (Figuras 6.1 y 6.2 y sección 6.2).

Si bien existen resultados contradictorios en los niveles de respuesta de los cultivos a la interacción entre la inoculación con *Azospirillum* y la fertilización (Lucy *et al.*, 2004), se ha establecido que esta bacteria mejora la EUFs de síntesis química (Caballero-Mellado, 2004; Hayat *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2004). En este sentido, en este trabajo, el aumento del rendimiento debido a la inoculación ocurrió en las parcelas con aplicaciones de dosis de fertilizaciones de medias a altas. Cabe mencionar que la denominación de dosis medias y altas utilizadas en este trabajo es exclusivamente en términos relativos a los ensayos, ya que las máximas dosis aplicadas

corresponden a las habitualmente utilizadas por los productores. Si bien las dosis de fertilizantes aplicadas a los cultivos están estrechamente relacionadas a los precios vigentes de los insumos en el mercado, la dosis promedio de fertilizantes nitrogenados y fosforados aplicados durante la campaña 2012-2013 en los cultivos de trigo y de maíz de nuestro país fueron de 167 y 197 kg ha⁻¹, respectivamente, mientras que en la provincia de Buenos Aires, las dosis promedio aplicadas correspondieron a 176 y 225 kg ha⁻¹, respectivamente para cada cultivo (Fertilizar, 2014b). Otro aspecto a tener en cuenta es que en ambos ensayos en los que se observaron efectos significativos de la inoculación, dicha práctica agronómica permitió obtener niveles de rendimiento con dosis intermedias de fertilizantes equivalentes a los rendimientos obtenidos con la mayor dosis de fertilización y sin inoculación (Figura 5.1 y sección 6.2). Aún sin considerar los gastos de las aplicaciones, el costo de los fertilizantes en las dosis utilizadas en los ensayos, como mínimo, duplica el costo de los inoculantes (Tabla 8.1). Considerando todo lo antes mencionado, la práctica de inoculación permite reducir las dosis de fertilización a la mitad, aumentando la EUF, asegurando los niveles de rendimiento, reduciendo los costos y disminuyendo el riesgo de contaminación ambiental. Todo esto contribuye a mejorar tanto el componente económico como ambiental de la sustentabilidad agroecosistémica.

Los análisis químicos de suelo, realizados luego de la cosecha de los cultivos de trigo y maíz, determinaron que la fertilización fosforada aplicada como tratamiento en algunos de los ensayos permitió, no sólo incrementar el rendimiento y la biomasa aérea del cultivo de trigo (Figuras 5.1, 5.2, 5.7 y 5.8), sino también aumentar los niveles de P disponible en el suelo en 2 y 10 ppm más respecto al control sin fertilización fosforada, en aquellas parcelas que recibieron 60 y 120 kg SPT ha⁻¹, respectivamente. En el caso del ensayo de maíz, si bien no se logró incrementar significativamente el rendimiento con la aplicación del fertilizante fosforado (sección 7.2.1), se logró aumentar los niveles de P disponible en el suelo en 7 y 19 ppm más respecto al control sin fertilización fosforada, en aquellas parcelas que recibieron 60 y 120 kg SPT ha⁻¹, respectivamente. Además, en este ensayo se observaron incrementos significativos en el nivel de P disponible en el suelo de las parcelas fertilizadas con ambas dosis, respecto a los niveles disponibles antes del inicio de cultivo (sección 7.1). Incluso en las parcelas no fertilizadas con P, el nivel de este nutriente disponible fue significativamente menor respecto a la cantidad inicial, producto del crecimiento del cultivo y la falta de reposición de este nutriente debida a la fertilización. Esto es coincidente con el

criterio de fertilización según reposición y enriquecimiento, aplicado para nutrientes poco móviles como el P. Según este criterio, en suelos con bajo niveles de este nutriente, se debe fertilizar según los requerimientos del cultivo y un poco más, de manera tal de ir enriqueciendo el suelo con P hasta lograr un nivel de suficiencia (Álvarez *et al.*, 2005).

En ambos ensayos de maíz realizados en la localidad de 30 de Agosto fue posible determinar las variables físico-químicas del suelo al inicio y al final del cultivo. Al final del ciclo del cultivo, se observó un aumento de la relación C/N de 10,3 a 11,1 y a 11,3, en el ensayo donde se evaluó el efecto de la fertilización fosforada y nitrogenada, respectivamente. En relación a esto, debido a que no se observaron diferencias en los porcentajes de materia orgánica, C orgánico y N orgánico, se estima que la diferencia en los valores de relación C/N se deban a una disminución en la cantidad de N mineral, principalmente nitratos, debido a la absorción del cultivo. Finalmente, se observó un aumento significativo en los niveles de P disponible al finalizar el cultivo de maíz (45,7 ppm de P Bray), respecto a los niveles determinados a la siembra del cultivo (11,8 ppm), en el ensayo donde se evaluó la interacción de la inoculación con el fertilizante nitrogenado. Este gran aumento en el contenido de P se explica, por un lado, por la dosis de 120 kg SPT ha⁻¹ como fertilización fosforada de base aplicada en el cultivo (sección 7.1), pero también por el bajo crecimiento del cultivo en este ensayo que fue la mitad de lo esperado (sección 7.2.2), debido, posiblemente, a un estrés hídrico sufrido por el cultivo. Esta situación seguramente provocó una disminución en sus requerimientos nutricionales, por lo cual, la cantidad de fertilizante requerido para reposición de esta menor demanda resultó menor, y así una mayor cantidad de nutriente quedó para enriquecer el suelo, según el criterio de fertilización de reposición y enriquecimiento previamente discutido.

En el caso del ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto, al finalizar el ciclo del cultivo se observó que en las parcelas en las que no se aplicó fertilización fosforada el valor promedio de pH fue de 6,7. Este valor fue significativamente mayor que el valor de pH de las parcelas fertilizadas, con valor promedio de pH de 6,3. Si bien todos estos valores de pH corresponden a un suelo ligeramente ácido (González *et al.*, 2000), puede resultar contradictorio que la fertilización haya reducido estos valores, si se tiene en cuenta que el fertilizante aplicado es SPT, que presenta un muy bajo índice de acidez (Rodríguez, 2007). Sin embargo, es importante no perder de vista que estas determinaciones se realizaron al finalizar el ciclo del cultivo de trigo, el cual presentó respuesta agronómica significativa a la fertilización fosforada (Figuras 5.1, 5.2, 5.7 y 5.8). En relación a esto,

otros autores han demostrado que las deficiencias de P modifican el patrón de exudados radicales, y con éstos, el pH de manera tal de aumentar la disponibilidad de P (Neumann y Römheld, 2007). Sin embargo, habría que considerar que la respuesta en condiciones de campo en interacción con otras variables pueda modificarse, ya que, como se discutirá posteriormente, un mayor crecimiento del cultivo debido a la fertilización fosforada, también implica mayor cantidad de exudados radicales secretados a la rizósfera. Esto explicaría el descenso observado del pH del suelo en el ensayo de trigo de 30 de Agosto, como así también, explicaría la ausencia de efectos sobre el pH del suelo en el ensayo de maíz, en el cual no se registró respuesta agronómica del cultivo a la fertilización fosforada (sección 7.2.1).

Continuando con la discusión de la influencia de las condiciones ambientales sobre la respuesta a la inoculación, algunos autores mostraron que ante condiciones de baja disponibilidad hídrica y/o nutricional, la respuesta a la inoculación con *A. brasilense* aumenta (Creus *et al.*, 2008; Okon y Labandera-González, 1994; Rodríguez-Cáceres *et al.*, 1996). Esta podría explicar la falta de respuesta significativa en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll, donde posiblemente el cultivo no sufrió ningún tipo de estrés, tanto hídrico como nutricional (sección 4.2). Sin embargo, no explicaría la falta de respuesta en los ensayos de maíz realizados en 30 de Agosto, donde claramente el cultivo se encontró bajo un intenso estrés hídrico. Este estrés comprometió el desarrollo vegetal que rindió la mitad de su potencial (sección 7.2). Las diferencias en la disponibilidad hídrica entre los ensayos de maíz realizados en 30 de Agosto respecto al ensayo realizado en Pehuajó, todos ellos realizados en la misma campaña agrícola, podrían explicar las diferencias observadas en el nivel de respuesta. Sin embargo, también hay que considerar que diferencias en el manejo de ambos establecimientos productivos pueden afectar la disponibilidad de nutrientes y el nivel de respuesta agronómica. Teniendo esto en consideración, resultaría esperable que el alto estrés hídrico haya condicionado la interacción planta-microorganismo (Abril *et al.*, 2006), pudiendo inactivar uno o más mecanismos PGP, propuestos en la hipótesis aditiva antes mencionada, enmascarando el efecto positivo de la inoculación (Creus *et al.*, 2008) sobre los parámetros agronómicos del cultivo de maíz en cuestión. Además, tanto en los cultivos de trigo como en los de maíz, la respuesta a la fertilización nitrogenada es altamente dependiente a la disponibilidad de agua durante todo el ciclo del cultivo, mientras que la respuesta a la fertilización fosforada está determinada por la disponibilidad de N (Álvarez, 2005a; 2005b). Esto explicaría, en gran parte, las respuestas a la

fertilización nitrogenada y/o fosforada (Figuras 5.1, 5.2, 5.7, 5.8 y 6.1) y la falta de las mismas (secciones 4.2 y 7.2) en los ensayos realizados en este trabajo. Otros autores han discutido previamente las aparentes discrepancias en la respuesta a la inoculación, estableciendo que en realidad en esos ensayos lo que se refleja es una alta heterogeneidad ambiental, incluyendo diferencias en los tipos de suelo y la microflora nativa, que influyen en dicha respuesta (Aeron *et al.*, 2011; Babalola, 2010). En este trabajo, dicha heterogeneidad en la microflora nativa pudo observarse en las diferencias en los recuentos del NMP de los microorganismos MFN anteriormente discutidas y en las diferencias en los perfiles fisiológicos de las comunidades presentes en la rizósfera de los cultivos, que será discutido posteriormente.

La rizósfera es un pequeño volumen de suelo que se localiza rodeando las raíces de las plantas, y se encuentra bajo su influencia directa (Minz y Ofek, 2011; Morgan *et al.*, 2005). Constituye un microambiente altamente dinámico y de gran diversidad (Hisinger *et al.*, 2009; Pliego *et al.*, 2011). Se ha dicho que los cambios en la diversidad microbiana generados por la introducción de un microorganismo mediante su inoculación son temporarios debido a que el suelo constituye un "buffer biológico" (Bashan, 1999). Sin embargo, aún se desconocen muchos de los procesos que se producen en la rizósfera (Hisinger *et al.*, 2009) y de las comunidades microbianas responsables de los mismos (Kent y Triplett, 2002). Es por ello que resulta necesario mejorar el conocimiento sobre la ecología microbiana de la rizósfera (García de Salamone, 2012a; Minz y Ofek, 2011), principalmente en pos de dos objetivos. Por un lado, teniendo en cuenta el rol preponderante que desempeñan los microorganismos en las funciones ecosistémicas (Winding *et al.*, 2005), y considerando que la abundancia y la diversidad biológica favorecen una producción agrícola sustentable (Altieri, 1999; Zhu *et al.*, 2012), es necesario evaluar y establecer si la inoculación de los cultivos efectivamente es, o bien inocua para la diversidad microbiana nativa o bien que la modificación que genere sea temporaria. Por otro lado, teniendo en cuenta que el inoculante se aplica en un ambiente con una microbiota nativa establecida (Bashan, 1999), cualquier aporte al conocimiento de la misma brindaría herramientas para mejorar la respuesta de los cultivos a la inoculación con microorganismos del tipo PGPR. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte significativo al conocimiento de la fisiología y la estructura de las comunidades microbianas rizosféricas de cultivos de trigo y maíz bajo diferentes prácticas agronómicas.

El medio de cultivo Nfb ss fue diseñado para el aislamiento y caracterización de *A. brasilense* (Döbereiner, 1998) mediante un tipo de crecimiento característico (Figura 3.1E). Sin embargo, en este medio de cultivo pueden desarrollarse también otros microorganismos con capacidad de FBN distintos de *A. brasilense* (Fischer *et al.*, 2007; Forchetti *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2002a). Teniendo en cuenta esto, de todas maneras resultaría esperable que aquellas parcelas inoculadas con esta bacteria presenten un recuento mayor de microorganismos MFN en este medio de cultivo, acorde a lo encontrado por otros autores para el cultivo de arroz (García de Salamone *et al.*, 2010; Pedraza *et al.*, 2009), maíz (Abril *et al.*, 2006; Cappelletti *et al.*, 2004; Casaretto y Labandera, 2008), entre otros. En este trabajo, en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó se observó un mayor número de este tipo de microorganismos en las parcelas inoculadas con la mezcla de las dos cepas de *A. brasilense* en el estado de R3 (Figura 6.5), lo que podría estar evidenciando una ventaja competitiva en esta situación. Por el contrario, en todos los ensayos de trigo y en los ensayos de maíz realizados en 30 de Agosto no se observaron diferencias significativas en este recuento entre las parcelas inoculadas y las parcelas testigo. En relación a esto, algunos autores demostraron que no en todos los ensayos a campo suelen observarse diferencias en el número de microorganismos MFN mediante recuentos en medios de cultivo (Abril *et al.*, 2006). El desarrollo en este medio de cultivo de bacterias diferentes de *A. brasilense*, como también el desarrollo de cepas nativas de esta bacteria en el suelo podrían explicar estos resultados. Además, la respuesta a la inoculación depende también de la comunidad de microorganismos nativos, entre ellos, los microorganismos con capacidad de FBN. En este trabajo, debido a que *A. brasilense* corresponde a este tipo de microorganismos, el objetivo fue realizar el recuento de los microorganismos MFN, un grupo particular de bacterias con capacidad de FBN. Sin embargo, la utilización de diferentes medios de cultivo para la estimación del número de microorganismos con capacidad de FBN podría mejorar la caracterización de la respuesta a la inoculación, lo que debería ser tenido en cuenta para futuros trabajos.

En relación a las diferencias en el recuento de microorganismos MFN debidas a la fertilización, únicamente en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó se observaron diferencias, únicamente en el estado de V5 (Figura 6.4). Es sabido que la disponibilidad de N en el ambiente inhibe la FBN (Cocking, 2003), pero no necesariamente el crecimiento de los microorganismos MFN heterótrofos o la respuesta del cultivo a la inoculación (Bashan y Levanony, 1990). En ese sentido,

en este trabajo se observó que el NMP de este grupo microbiano bajo la dosis de urea de 90 kg ha⁻¹ fue significativamente mayor. A su vez, la reducción del NMP de microorganismos MFN bajo la dosis de urea de 180 kg ha⁻¹ podría deberse a que estos microorganismos presentan menor capacidad competitiva en ambientes con alta disponibilidad de N comparado con otros microorganismos heterótrofos. Algunos autores demostraron que la aplicación conjunta de urea a la siembra y el inoculante de *A. brasilense* sobre la semilla afectó la supervivencia de la bacteria, mientras que otros fertilizantes no la afectaron (Puente *et al.*, 2008), pero en los ensayos realizados en este trabajo la aplicación de la urea se realizó unos días antes de la siembra. De todas maneras, es una cuestión muy importante a tener en cuenta al momento de seleccionar el grupo de prácticas agrícolas, asociadas al correcto manejo del cultivo (Díaz Zorita *et al.*, 2004). Algunos autores han reportado que una mejor nutrición nitrogenada de la planta genera mayor secreción de compuestos carbonados a través de los exudados radicales, promoviendo la proliferación de otros microorganismos heterótrofos y afectando a los microorganismos MFN por competencia (Reis *et al.*, 2000a; Dobbelaere *et al.*, 2002).

Los resultados encontrados en este trabajo en relación al NMP de MFN coinciden plenamente con los encontrados por Roesch *et al.* (2006) para un cultivo de maíz bajo dos dosis de fertilización nitrogenada diferentes. Si bien en la mayoría de los ensayos de este trabajo no se observaron diferencias significativas debidas a los tratamientos aplicados, el recuento de este grupo microbiano fue elevado en todos ellos y se observaron diferencias significativas en este recuento a lo largo del ciclo ontogénico del cultivo en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll (sección 4.2) y en los ensayos de maíz realizados en 30 de Agosto (Tablas 7.2 y 7.4). Estos resultados están acorde a lo informado por otros autores (Cappelletti *et al.*, 2004; García de Salamone *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2000b). La mayor demanda de N en forma de nitratos por parte de la planta promueve la FBN, demostrándose que ésta aumenta hacia la floración (Kapulnik *et al.*, 1981). Por el contrario, en los ensayos donde se observó respuesta significativa a la inoculación no se observaron diferencias significativas para este recuento a lo largo del ciclo de los cultivos (Tablas 5.1 y 6.2). Es interesante destacar que a pesar de no observarse diferencias respecto al número de células bacterianas, probablemente se podrían registrar diferencias en la estructura de la comunidad de microorganismos con capacidad de FBN en particular (Soares *et al.*, 2006), aunque esto último no fue determinado en este trabajo.

La determinación del recuento de NMP de microorganismos celulolíticos y nitrificadores se realizó mediante la incubación de las muestras rizosféricas en medios de cultivo específicos y bajo condiciones de incubación en aerobiosis, para permitir el crecimiento de los microorganismos aerobios de ambos grupos funcionales. Previamente, se determinó que en cultivos de trigo y arroz inoculados con *A. brasilense* aumentó la actividad y el número de microorganismos asociados al ciclo del N, observándose incrementos en el número de microorganismos nitrificadores y en la cantidad de N potencialmente mineralizable (García de Salamone *et al.*, 2009). En este trabajo, la aplicación de inoculantes formulados con cepas de *A. brasilense* no generó efecto alguno sobre las comunidades microbianas rizosféricas evaluadas asociadas a los ciclos de C o del N. Asimismo, únicamente en el ensayo de maíz de Pehuajó se observó que la aplicación de diferentes dosis de urea aumentó la cantidad de microorganismos celulolíticos, asociados a la degradación de celulosa, y disminuyó la cantidad de microorganismos nitrificadores, responsables de la transformación del amonio a nitratos, únicamente en la etapa vegetativa del cultivo (Figura 6.4). La incorporación del fertilizante nitrogenado en el estado fenológico de V4 pudo haber permitido un mayor crecimiento de los microorganismos del suelo, los cuales generalmente se encuentran en un estado de déficit nutricional (Madigan *et al.*, 2000; Paul y Clark, 1996), observándose diferencias significativas en el recuento de microorganismos celulolíticos en el estado de V5 (Tabla 6.2), inmediatamente posterior al momento en el que se realizó la fertilización. Entonces, la fertilización nitrogenada puede promover la degradación de la materia orgánica (Treseder, 2008), fenómeno conocido como “positive priming-effect” (Kuzyakov *et al.*, 2000), pudiendo producir el aumento en el NMP de microorganismos celulolíticos (Figura 6.4). La actividad de estos microorganismos heterótrofos pone a disposición de otros microorganismos también heterótrofos, tales como algunos fijadores de N₂, compuestos carbonados de menor peso molecular. Esto genera una mayor actividad heterotrófica (Kumar y Goh, 1999), lo que redundaría en una mayor cantidad de biomasa microbiana y, en consecuencia, una mayor inmovilización de compuestos nitrogenados como el amonio, principalmente. La inmovilización de estos nutrientes provoca que haya menor disponibilidad de amonio para los microorganismos nitrificadores. Siendo que los microorganismos nitrificadores son, principalmente, quimioautótrofos, la mayor disponibilidad de amonio debida a la fertilización podría haber sido la causa de la reducción del NMP de este grupo funcional (Figura 6.4). Esto podría ser el resultado de una menor capacidad competitiva de este grupo funcional frente a la inmovilización de los heterótrofos (Verhagen y Laanbroek, 1991) y la asimilación de las plantas (Kaye y Hart, 1997).

Por otra parte, se observó una reducción en los NMP de los microorganismos celulolíticos y nitrificadores cuando se aplicó la dosis de 180 kg de urea ha⁻¹ (Figura 6.4) debido, probablemente, al efecto tóxico del amonio (Bollmann y Laanbroek, 2001; Koops *et al.*, 2006). Si bien en bacterias se ha demostrado que existen mecanismos de protección al efecto tóxico del amonio, estos estudios están realizados con sólo tres géneros bacterianos (Müller *et al.*, 2006). Otros autores mostraron que otros grupos bacterianos presentan mayor sensibilidad a altas concentraciones de amonio (Dennis Sprott y Patel, 1986).

Asimismo, en este trabajo se observaron variaciones de los recuentos del NMP de microorganismos asociados a los ciclos del C y del N a lo largo del ciclo de los cultivos de maíz, y no se observaron diferencias a lo largo del ciclo del cultivo de trigo. En el estado reproductivo del cultivo de maíz el número de microorganismos celulolíticos fue menor respecto al observado en el estado vegetativo (Tablas 6.2, 7.2 y 7.4). Durante las primeras etapas del ciclo de este cultivo estival, aún pueden encontrarse residuos del cultivo antecesor disponibles en cantidades mayores respecto a la cantidad disponible en estados posteriores del cultivo. Estos residuos constituyen el sustrato para los microorganismos celulolíticos, los cuales pueden degradarlos bajo condiciones ambientales favorables, con temperaturas ambientales óptimas para el desarrollo de los microorganismos mesófilos. A medida que el cultivo crece, sus exudados radicales constituyen el suministro de fuentes carbonadas de bajo peso molecular (Aulakh *et al.*, 2001; Badri y Vivanco, 2009) que posibilita el crecimiento de otros microorganismos heterótrofos que compiten con los microorganismos celulolíticos en la rizósfera. Esto estaría explicando las diferencias observadas en el recuento de este grupo microbiano en los ensayos de maíz. En el caso del cultivo de trigo, al ser un cultivo invernal, el residuo del cultivo antecesor se encuentra disponible como sustrato para los microorganismos celulolíticos, pero las condiciones ambientales no son tan favorables para la actividad de los microorganismos mesófilos. Entonces, resultaría esperable que el recuento de este grupo microbiano sea mayor en estados más avanzados del cultivo, bajo temperaturas ambientales más favorables. Sin embargo, el efecto rizosférico (Bais *et al.*, 2006; Doornbos *et al.*, 2012) que favorece el desarrollo de otros microorganismos heterótrofos mediante los exudados radicales explicaría la ausencia de diferencias significativas en este recuento (Tabla 5.1).

La mayor degradación de los residuos de cultivos que se produce en el estado de V5 de los cultivos de maíz implicaría una mayor inmovilización de nutrientes en la biomasa microbiana

producida a expensas de dicha degradación. Entonces, resultaría esperable que el recuento de microorganismos nitrificadores en este estado del cultivo sea menor respecto al recuento del estado de R3, debido al fenómeno de competencia con los microorganismos heterótrofos antes discutido. Sin embargo, también la demanda de nitratos por el cultivo es mayor en estado vegetativo hasta floración, respecto al estado de llenado de granos (Kapulnik *et al.*, 1981), donde se produce la mayor removilización del N dentro de la planta. Las mencionadas diferencias en el recuento de microorganismos nitrificadores a lo largo del ciclo del cultivo podrían haberse observado en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó. Sin embargo, en dicho ensayo no se observaron diferencias significativas en el recuento de este grupo microbiano (Tabla 6.2), posiblemente debido al efecto de la fertilización nitrogenada aplicada en V4, que produjo efectos significativos sobre este recuento en el estado de V5 (Figura 6.4). Por otra parte, otros autores demostraron que en algunas situaciones, los nitrificadores presentan mayor competitividad por el amonio adicionado al suelo que los microorganismos heterótrofos (Shi y Norton, 2000), lo que podría explicar el mayor NMP de microorganismos nitrificadores en el estado de V5 respecto al estado de R3 observado en los ensayos de maíz de 30 de Agosto (Tablas 7.2 y 7.4).

Probablemente debido a lo laborioso del método, no es común encontrar antecedentes de trabajos en los cuales se haya realizado la determinación de la variable densidad de longitud total de raíces en condiciones de campo. Debido a ello, el presente trabajo es uno de los pocos trabajos en establecer valores de densidad de longitud total de raíces para los cultivos de trigo y maíz en ambientes productivos. Esto constituye un valioso aporte al conocimiento de los sistemas radicales, ya que con esta variable se consideran los distintos grosores de las raíces, a diferencia de las mediciones más frecuentes de biomasa, en la que las raíces finas no son relevantes para la obtención del dato. En relación a esto, en este trabajo se observó que ambas variables presentaron resultados opuestos en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto. Por un lado, la variable biomasa radical fue mayor en estado de macollaje que en llenado de grano (Tabla 5.2). Por otro lado, la densidad de longitud total de raíces fue mayor en llenado de grano respecto a macollaje (Tabla 5.3). Además, en dicho ensayo, los tratamientos de inoculación y fertilización produjeron cambios en la densidad de longitud radical (Figuras 5.14 y 5.15) que no se observaron en el análisis de la biomasa radical (sección 5.2). Asimismo, en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó se observaron diferencias en la densidad de longitud total de raíces debidas a la inoculación y

diferencias en la biomasa radical debidas a la fertilización (sección 6.2). Todo esto demuestra que ambas variables son complementarias para evaluar el efecto de las prácticas agronómicas y para demostrar diferencias en la morfología de las raíces a medida que avanza el ciclo del cultivo.

Además, en este trabajo se observó que la densidad de longitud total de raíces en los cultivos de trigo aumentó, como era esperable, a medida que las plantas crecían a lo largo del ciclo de los cultivo (Tablas 4.1 y 5.3). En comparación, las plantas del ensayo de trigo realizado en Villa Moll presentaron menores valores de densidad de longitud radical (Tabla 4.1) respecto a los obtenidos para las plantas del ensayo realizado en 30 de Agosto (Tabla 5.3). Probablemente, esto se deba, por un lado, a diferencias texturales en los perfiles edáficos de ambos ensayos, que ofrecen diferentes grados de resistencia a la penetración radical (Taboada y Micucci, 2004; Rich y Watt, 2013) y, por otro lado, a que en el primer caso el cultivar utilizado fue de ciclo corto mientras que en el otro ensayo se utilizó un cultivar de ciclo intermedio a largo, por lo cual la dinámica de exploración del perfil de suelo por parte de las raíces es más extensa.

En los ensayos donde se obtuvo respuesta significativa a la inoculación o la fertilización se observó que estos tratamientos también generaron respuesta sobre la densidad de longitud total de raíces. En el caso del ensayo de trigo realizado 30 de Agosto, en el estado vegetativo del cultivo se observó que bajo la situación de máxima fertilización nitrogenada, la fertilización fosforada aumentó la densidad de longitud radical, lográndose valores similares de esta variable con las dosis media y alta de fertilizante fosforado (Figura 5.15). En relación a esto, otros autores mostraron la cantidad de P disponible modifica el número de raíces laterales del cultivo de trigo, mientras que el cultivo de maíz modifica en mayor medida el largo de sus raíces laterales (Mollier y Pellerin, 1999). Además, en el ensayo de trigo realizado 30 de Agosto, también se observó que el aumento en esta variable generado por la aplicación de fertilizante fosforado fue significativo únicamente en las plantas testigo no inoculadas, por lo que la inoculación de las plantas logró niveles de densidad de longitud radical similares independientemente de la dosis de fertilizante fosforado aplicada (Figura 5.14).

Se ha reportado que las plantas, creciendo en condiciones de buena disponibilidad hídrica y nutricional, exploran en profundidad el perfil del suelo (Taboada y Micucci, 2004), alcanzándose la máxima profundidad al comienzo de llenado de grano (Dardanelli *et al.*, 2004). Por su parte, bajo condiciones de estrés hídrico leve y menor disponibilidad de nutrientes, el sistema radical se vuelve más denso, a expensas de destinar una mayor cantidad de fotoasimilados para su crecimiento y

mantenimiento (Dardanelli *et al.*, 2004). Este aumento en la densidad radical se produce en mayor medida a la profundidad del suelo en la cual la disponibilidad de nutrientes es mayor (Rich y Watt, 2013; Robinson, 1994), siendo este efecto muy importante para compuestos como el fosfato (Rich y Watt, 2013) y el amonio (Robinson, 1994). Dado que en todos los ensayos la fertilización se realizó en pre-siembra, y que el fertilizante fue incorporado a una profundidad similar a la de la semilla, o en el momento de la siembra, incorporando el fertilizante con las semillas en los primeros 10 cm del suelo, esto podría explicar el efecto de los fertilizantes sobre la densidad de longitud radical en los ensayos donde se produjeron respuestas a la fertilización. Además, el aumento de la densidad de longitud radical observado en este trabajo implica que las plantas en mejor estado nutricional presentan mayor crecimiento de sus partes aéreas y de las raíces, debido al equilibrio funcional (Cárcova *et al.*, 2004b). Esto coincide con lo ya discutido en relación a las diferencias observadas en la generación de biomasa aérea (Figuras 5.9 y 5.10). Si bien en el estado reproductivo del cultivo de trigo realizado en 30 de Agosto no se observaron las diferencias que sí se observaron en el estado vegetativo (sección 5.2), éstas resultan interesantes si se tiene en cuenta la importancia de una temprana y buena implantación del cultivo para una mejor eficiencia de los recursos radiación (Cárcova *et al.*, 2004b), nutrientes y agua (Dardanelli *et al.*, 2004).

Según lo presentado en trabajos anteriores, resultaba esperable que la inoculación con *A. brasilense* aumente la cantidad y/o longitud de pelos radicales y raíces adventicias (Okon y Vanderleyden, 1997). En este trabajo, dicho efecto se observó tanto en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó, con diferencias en el estado reproductivo del cultivo en los niveles de densidad de longitud radical debidas a la inoculación con la cepa 40M (sección 6.2), como en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto, observándose interacción entre la inoculación con 40M+42M y la fertilización fosforada (Figura 5.14). El mencionado efecto de la inoculación podría explicar la menor cantidad de biomasa aérea de las plantas inoculadas con el inoculante comercial respecto a las plantas inoculadas con los otros inoculantes (Figura 6.3). Este inoculante comercial se encuentra formulado con cepas de dos especies bacterianas diferentes, *A. brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, con el objetivo del uso combinado de diferentes mecanismos de PGP. Otros autores han reportado los beneficios de esta co-inoculación en cultivos de maíz (Faggioli *et al.*, 2003) y arroz (García de Salamone *et al.*, 2012). Algunos de los mecanismos presentes en *P. fluorescens* son la solubilización del P (Rodríguez y Fraga, 1999) y la producción de citoquininas

(García de Salamone *et al.*, 2001), las cuales favorecen la elongación radical y el desarrollo de raíces laterales (Salisbury y Ross, 1991). Entonces, la menor generación de biomasa aérea de las plantas inoculadas con el inoculante comercial podría deberse, posiblemente, a un mayor desarrollo radicular en detrimento de la biomasa aérea. Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad de longitud radical debidas a la inoculación con el inoculante comercial (sección 6.2). En relación a esto, es importante considerar que la variable densidad de longitud radical evaluada aquí determina la densidad de raíces en un volumen específico de suelo, correspondiente a los primeros 20 cm del perfil del suelo. Por lo que la ausencia de diferencias en esta variable no significa que no hayan presentado un patrón de exploración del suelo diferente. Este mismo razonamiento puede explicar la ausencia de diferencias en la densidad de longitud radical observada a lo largo del ciclo del cultivo de maíz del mismo ensayo (Tabla 6.3).

En relación al segundo mecanismo PGP mencionado para *P. fluorescens*, la solubilización de fosfatos, en este trabajo se determinó que las cepas de *A. brasilense* utilizadas en este trabajo no poseen la capacidad de solubilizar fosfato en condiciones *in vitro* en el medio Pikovskaya (sección 3.3.2). De todas formas, el fertilizante presenta una forma de P más fácilmente soluble, en comparación a la utilizada en el medio de cultivo mencionado, lo que podría explicar, en parte, la mejor EUF observado en los ensayos a campo (Figuras 5.2 y 5.4). Igualmente, la inclusión de *P. fluorescens* constituiría una ventaja del inoculante comercial utilizado en el ensayo de maíz de Pehuajó, respecto al inoculante experimental mezcla, para un mejor aprovechamiento de las formas más insolubles del P. Si bien en este ensayo el contenido de P extractable del suelo al momento de la siembra fue relativamente bajo (sección 6.1), la aplicación de fertilizante fosforado de base a todas las parcelas (sección 6.1) podría haber afectado la respuesta del cultivo a la inoculación con *P. fluorescens*, siendo el cultivo menos dependiente del aporte de P por la intervención de dicha bacteria y explicaría los menores niveles de producción de biomasa aérea (Figura 6.3) y rendimiento (Figura 6.2) de las plantas inoculadas con este inoculante. Esto, en cierta medida, descartaría la intervención de los demás mecanismos de PGP para esta bacteria, tales como la producción de antibióticos y sideróforos (Rodríguez y Fraga, 1999), siendo estos últimos también producidos, al menos en condiciones *in vitro*, por las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M utilizadas en este ensayo (sección 3.3.2). De todas formas y en base a todo lo antes mencionado, teniendo en cuenta la respuesta obtenida en biomasa aérea y rendimiento, resultan evidentes las desventajas de los

inoculantes monocepa respecto a los inoculantes combinados, aunque en las condiciones de este ensayo, el inoculante mezcla de dos cepas de *A. brasilense* se destacó respecto al inoculante que contenía dos especies bacterianas diferentes (Figuras 6.2 y 6.3).

Los hongos micorrícicos arbusculares son organismos biótrofos obligados (Barea *et al.*, 2005). Por esta razón, se esperaba que el desarrollo de la micorrización acompañe el ciclo de vida anual de los cultivos analizados en este trabajo, en concordancia por lo reportado por otros autores (Pongrac *et al.*, 2007). En relación a esto, se observó que en el cultivo de maíz, el porcentaje de colonización disminuyó a medida que el ciclo del cultivo avanzó (Tabla 6.3), mientras que en el cultivo de trigo se observó que aumentó (Tabla 4.1), o que no presentó diferencias entre los dos estados ontogénicos del cultivo evaluados (Tabla 5.3). Resultados similares fueron reportados por otros autores para el cultivo de trigo y otros cereales de invierno (Covacevich *et al.*, 2007; Dodd y Jeffries, 1986), asociados a la fenología del cultivo y a las condiciones ambientales (Abbott y Robson, 1991; Mohammad *et al.*, 1998). Cabe destacar, además, que el porcentaje de colonización de los cultivos de trigo estuvieron en el rango del 60 a 66% a lo largo de todo el ciclo (Tablas 4.1 y 5.3), mientras que en el ensayo de maíz disminuyó del 60 al 30% (Tabla 6.3). Estos resultados son consistentes con resultados previamente reportados, donde se mostraron porcentajes de colonización radical bajos para el cultivo de maíz y altos para el cultivo de trigo, en relación a la longitud radical total de los cultivos (García de Salamone *et al.*, 2006).

A lo largo del ciclo de los cultivos se observó que el porcentaje de arbusculos, estructura de intercambio de sustancias entre los simbioses (Willis *et al.*, 2013), y el porcentaje de vesículas, estructura de almacenamiento del hongo (Willis *et al.*, 2013), también presentaron diferencias entre los distintos estados ontogénicos, con respuestas variables entre ensayos (Tabla 4.1, 5.3 y 6.3). Por otra parte, el porcentaje de raíces con presencia de esporas, es decir la cantidad de estructuras de perpetuación del hongo (Willis *et al.*, 2013), fue mayor en el estado reproductivo de los cultivos, tanto de trigo como de maíz (Tablas 4.1, 5.3 y 6.3). Además, se observó que el porcentaje de arbusculos y de esporas presentes en las raíces del ensayo de trigo realizado en Villa Moll fue mayor (Tabla 4.1) respecto a los porcentajes observados en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto (Tabla 5.3) y más sostenido en el tiempo, observándose una alta colonización y porcentaje de arbusculos aún en el estado reproductivo del cultivo (Tabla 4.1). Por todo lo antes mencionado, se podría concluir que la dinámica de la micorrización presenta diferencias entre los distintos cultivos y, más aún, dentro de

un mismo cultivo, como las diferencias observadas en ambos ensayos de trigo. Esto es coincidente con lo reportado por otros autores para distintas especies vegetales (Abbott y Robson, 1991; Siqueira y Saggin-Júnior, 2001; Trindade *et al.*, 2001).

La asociación entre plantas y hongos micorrícicos arbusculares es la más antigua de las simbiosis micorrícicas, establecida, principalmente, para una mejora nutricional de los simbiontes (Lambers *et al.*, 2009). Se ha establecido que la dependencia a la micorrización y la colonización radical por parte del HFMA, así como la respuesta de éste a la cantidad de P y N disponibles para el crecimiento vegetal es variable entre especies vegetales (Corkidi *et al.*, 2002; Klironomos, 2003; Siqueira y Saggin-Júnior, 2001). También se ha demostrado que estas variables presentan diferentes respuestas entre variedades de una misma especie vegetal (Trindade *et al.*, 2001) y que se encuentran determinadas por las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta (Johansson *et al.*, 2004). Además, se ha reportado efectos negativos de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosforados sobre la colonización radical en distintos ambientes (Treseder, 2004). Teniendo esto en consideración, en este trabajo se evaluó el efecto de los tratamientos de fertilización e inoculación sobre las variables asociadas a la micorrización natural. Se observó que ni la fertilización nitrogenada ni la inoculación produjeron efectos significativos sobre la colonización radical y porcentajes de arbusculos, vesículas y esporas en el cultivo de maíz (sección 6.2). En cambio, sí se observaron respuestas significativas de los tratamientos sobre estas variables en los ensayos de trigo realizados. Algunos autores establecieron que la fertilización fosforada afecta negativamente las estructuras del hongo internas de la raíz, como los arbusculos y las vesículas, mientras que la fertilización nitrogenada afecta las estructuras fúngicas extrarradicales, como las hifas y esporas (Blanke *et al.*, 2005; Collins-Johnson *et al.*, 2003). En este trabajo se pudo observar que la fertilización nitrogenada disminuyó el porcentaje de arbusculos presentes en las raíces de las plantas en estado de encañazón en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll (Tabla 4.2). Por el contrario, en el ensayo de trigo realizado 30 de Agosto, se observó que en el estado de llenado de grano, el porcentaje de arbusculos fue mayor en las plantas que fueron fertilizadas con la máxima dosis de urea, sin fertilización fosforada y habiendo o no sido inoculadas con el inoculante 40M+42M (Figura 5.16). En este mismo ensayo, en estado de llenado de grano, también se observaron diferencias en el porcentaje de arbusculos debidas a la interacción entre la fertilización fosforada y nitrogenada (Figura 5.20), por lo cual la cantidad de arbusculos en las raíces de las plantas testigo

fue mayor en la situación de ausencia de fertilización fosforada, en comparación con 60 o 120 kg SPT ha⁻¹. La cantidad de arbusculos en las raíces de plantas inoculadas, si bien disminuyó debido al aumento de dosis de fertilizante, dichas diferencias no fueron significativas (Figura 5.20). Algunos autores demostraron efectos de la aplicación de fertilizantes con resultados variables entre ensayos; mientras que en algunos de ellos la fertilización nitrogenada disminuyó el número de arbusculos, en otros, dicha fertilización aumentó el número de éstos, enfatizando el rol de la micorriza en la absorción de nutrientes como el P (Collins-Johnson *et al.*, 2003).

Asimismo, en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto se observó que la fertilización nitrogenada y la inoculación afectaron positivamente el porcentaje de colonización radical y el porcentaje de vesículas presentes en las raíces, mientras que la fertilización fosforada afectó negativamente estas variables (Figuras 5.17, 5.18 y 5.19). Otros autores mostraron las mismas respuestas de la micorrización del cultivo de maíz a la fertilización fosforada y nitrogenada (Liu *et al.*, 2000) y del cultivo de trigo a la fertilización fosforada (Covacevich *et al.*, 2007). Contrariamente, algunos autores han mostrado un efecto positivo de la fertilización fosforada en la colonización radical de maíz (García de Salamone *et al.*, 2006) y en la micorrización de trigo (Rubio *et al.*, 2003), mientras que otros reportaron efectos negativos de la fertilización nitrogenada sobre esta variable (Blanke *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 1992; Treseder, 2004).

Independientemente del efecto individual de cada uno de esos nutrientes, es interesante el efecto simultáneo de ambos nutrientes sobre la micorrización. En este sentido, algunos autores reportaron aumentos en la colonización radical y porcentaje de arbusculos debidos a la fertilización nitrogenada bajo condiciones de P limitantes, pero disminuciones bajo condiciones de P no limitante (Blanke *et al.*, 2005; Collins-Johnson *et al.*, 2003; Sylvia y Neal, 1990; Treseder y Allen, 2002). En condiciones limitantes para el crecimiento vegetal, la planta destina fotoasimilados a las raíces para mantener la simbiosis, debido a los beneficios de ésta en relación al aporte del nutriente que se encuentra limitante (Douds y Schenck, 1990a). Si ese nutriente limitante es el P, este efecto es más importante comparado a la situación de limitación por N (Blanke *et al.*, 2005; Treseder y Allen, 2002), muy posiblemente debido a que los HFMA son más eficientes para facilitarle a la planta el P inorgánico pero menos eficientes para el N inorgánico (Treseder, 2004). Teniendo en cuenta que los niveles de micorrización del ensayo de trigo realizado en Villa Moll fueron más elevados en comparación a los niveles observados en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto, y que en el

primero se observó un efecto negativo significativo de la fertilización nitrogenada, mientras que en el segundo se observó un efecto negativo de la fertilización fosforada, podrían concluirse dos cosas. Por un lado, en el ensayo realizado en 30 de Agosto, la fertilización nitrogenada afectó positivamente la micorrización y la fertilización fosforada la afectó negativamente, en concordancia con lo mencionado y discutido previamente, en relación a la disponibilidad de nutrientes y a los beneficios que implica esta simbiosis en relación a estos nutrientes. Por otro lado, en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll, la fertilización nitrogenada afectó negativamente a la micorrización de plantas de trigo debido a que este nutriente ya se encontraba disponible, por lo que el crecimiento vegetal y la simbiosis no se encontraba limitada por N sino por C (Douds y Schenck, 1990a; 1990b; Muthukumar y Udaiyan, 2000; Treseder y Allen, 2002). Los resultados de este trabajo significan un aporte al conocimiento sobre el establecimiento de las micorrizas naturales en sistemas productivos, y adquieren gran relevancia para el manejo de los cultivos en pos de aumentar la eficiencia de los recursos disponibles.

Se ha reportado que las PGPR interactúan con otros microorganismos del suelo tales como los HFMA, demostrándose que pueden interaccionar y estimular el crecimiento de éstos (Antoun y Prévost, 2006; Johansson *et al.*, 2004; Meyer y Linderman, 1986), promoviendo el crecimiento vegetal y el aumento del rendimiento en diversas especies vegetales (Arthurson *et al.*, 2011; Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Bellone y Carrizo de Bellone, 2008; Cosme y Wurst, 2013; Marulanda *et al.*, 2009; Muthukumar *et al.*, 2001; Vessey, 2003; Wang *et al.*, 2011). Debido a esto, algunas bacterias PGPR han sido catalogadas como MHB (Barea *et al.*, 2005; Frey-Klett *et al.*, 2007; Garbaye, 1994), incluyendo *A. brasilense* (Antoun y Prévost, 2006; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2011). Las MHB presentan diversos mecanismos de promoción de colonización, crecimiento y actividad de los HFMA, los cuales han sido detallados extensamente por otros autores (Artursson *et al.*, 2006; Mallik y Williams, 2008; Miransari, 2011; Sarabia Ochoa *et al.*, 2010). Entre ellos se incluye un mejor aprovechamiento de los nutrientes adicionados mediante la fertilización (Adesemoye *et al.*, 2008). En este sentido, únicamente en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto se observaron efectos beneficiosos de la inoculación con *A. brasilense* sobre la micorrización natural (Figuras 5.16 y 5.18, sección 5.2), mientras que en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll y en el ensayo de maíz realizado en Pehuajó, la inoculación no produjo efectos sobre las variables evaluadas (secciones 4.2 y 6.2). Otros autores demostraron efectos benéficos de la inoculación con *A. brasilense* sobre la

colonización radical y el crecimiento de plantas de arroz (Ruíz-Sánchez *et al.*, 2011), de mijo (Subba Rao *et al.*, 1985) y el crecimiento de plantas de maíz (Vázquez *et al.*, 2000). Además, en este trabajo también se observó que la inoculación con el inoculante 40M+42M interactuó con la fertilización fosforada, reduciendo parcialmente los efectos negativos de la fertilización sobre el desarrollo de la micorriza arbuscular (Figuras 5.18 y 5.20), siendo éste un aspecto interesante para continuar evaluando y analizando en trabajos posteriores. Finalmente, es interesante destacar que en ninguno de los ensayos realizados en el marco de este trabajo, ya sea de trigo o de maíz, se observó interacción significativa entre la fertilización nitrogenada y la inoculación con las cepas 40M y 42M, tanto sobre la micorrización natural como sobre los parámetros agronómicos de los cultivos (secciones 4.2, 5.2 y 6.2). Cabe mencionar, además, que este trabajo constituye uno de los pocos en los cuales se evalúa la respuesta a la inoculación y en interacción con la fertilización, sobre parámetros relacionados a la micorrización natural en condiciones de campo.

Un HFMA puede producir mayor cantidad de esporas en plantas que se encuentran creciendo en condiciones de estrés (Bothe *et al.*, 2010) o de alta disponibilidad de nutrientes, debido a la alta cantidad de fotoasimilados producidos por la planta y destinados a la simbiosis (Douds y Schenck, 1990a), aunque esta respuesta es variable según la especie vegetal (Saito *et al.*, 2011) y la especie del HFMA (Douds y Schenck, 1990b). Esto podría explicar las diferencias en la cantidad de esporas presentes en las raíces de los ensayos de trigo. En el ensayo de trigo realizado en Villa Moll, las plantas con menor disponibilidad de N presentaron menor porcentaje de esporas (Tabla 4.2), en concordancia con lo observado por otros autores en condiciones controladas (Douds y Schenck, 1990a) y a campo (Douds *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente, en relación al efecto favorable de la fertilización nitrogenada sobre la micorrización en condiciones de no limitación de P, en este ensayo se observó que la simbiosis se encontraba muy activa, reflejado en el alto porcentaje de arbusculos (Tabla 4.2). Esto podría generar al HFMA una limitación de C u otro nutriente, colocándolo en una situación de estrés, que es lo que podría estar reflejando la cantidad de esporas en las plantas fertilizadas (Tabla 4.2).

Por otra parte, en el ensayo de trigo realizado en 30 de Agosto, las plantas inoculadas con el inoculante 40M+42M presentaron aumentos de biomasa aérea y rendimiento en respuesta a la inoculación (Figuras 5.2 y 5.8). Debido a ello, los fotoasimilados estarían siendo traslocados preferentemente a los órganos reproductivos, por lo que es probable que el menor C traslocado a las

raíces haya limitado el mantenimiento de la simbiosis (Treseder y Allen, 2002), según lo ya discutido previamente. Esta situación de estrés para el HFMA podría explicar la diferencia observada en el porcentaje de esporas debidas a la inoculación (sección 5.2). Además de los efectos analizados, algunos autores han reportado que la adición de fertilizantes, así como de otras prácticas agrícolas, pueden afectar positiva o negativamente las diferentes especies HFMA presentes en los ecosistemas (Collins-Johnson, 1993; Johansson *et al.*, 2004; Oehl *et al.*, 2003; Schalamuk y Cabello, 2010). Teniendo en cuenta esto, en este trabajo se evaluó la respuesta generada sobre el porcentaje de esporas presentes en las raíces en los ensayos, pero no la diversidad de hongos micorrícicos, lo que debería ser tenido en cuenta en futuros trabajos.

El estudio de la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas, mediante el análisis de los CLPP, constituye una estimación del catabolismo potencial de aquellos microorganismos cultivables presentes en la comunidad original (Di Salvo y García de Salamone, 2012). Numerosos trabajos han demostrado la utilidad de las microplacas comerciales de Biolog®, para la evaluación de la fisiología de comunidades microbianas de distintos orígenes o bajo diferentes tratamientos (Campbell *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2004; Preston-Mafham *et al.*, 2002; Zak *et al.*, 1994). En este sentido, Di Salvo y García de Salamone (2012) estandarizaron esta metodología de manera tal de obtener resultados similares que los que se obtienen con las microplacas comerciales. Utilizando esta estandarización, se evaluaron y diferenciaron comunidades microbianas sometidas a diferentes niveles de compactación de suelos (García de Salamone *et al.*, 2004), a diferentes tratamientos de biorremediación (Di Salvo y García de Salamone, 2012) y diferentes manejos agrícolas (García de Salamone *et al.*, 2010; 2012). En algunos trabajos se demostró que la inoculación genera una modificación, al menos temporaria, de las comunidades microbianas (Conn y Franco, 2004; García de Salamone *et al.*, 2010; 2012; Minz y Ofek, 2011; Naiman *et al.*, 2009). En este trabajo, en todos los ensayos en mayor o menor medida, se observó cierto grado de modificación de la fisiología de las comunidades microbianas de la rizósfera de trigo y maíz debidas a los tratamientos evaluados (Figuras 4.1, 4.2, 5.11, 5.12, 6.6, 6.7, 7.1, 7.2, 7.4 y 7.5). Sin embargo, dicha modificación resultó de menor magnitud que la modificación de la comunidad microbiana a lo largo del ciclo del cultivo (Figuras 4.3, 5.13, 6.8, 7.3 y 7.6). En concordancia, otros autores también observaron diferencias en los perfiles fisiológicos a lo largo del ciclo fenológico de las plantas (Benizri y Amiaud, 2005; Houlden *et al.*, 2008).

Las fuentes de C manitol, prolina, sorbitol, ácido oxálico, glutamina, ácido láctico, histidina y arabinosa fueron consideradas como las más importantes por el análisis discriminante de los perfiles fisiológicos para la diferenciación de las cepas de *A. brasilense* evaluadas (Figura 3.2). Además, las fuentes de C arginina, fructosa, ácido itacónico, prolina, glutamina y arabinosa fueron utilizadas en forma diferencial a las 72 horas de incubación por las cinco cepas (Tabla 8.2). En base a las diferencias observadas en estos sustratos se trató de relacionar las diferencias observadas en los análisis discriminantes de los CLPP de los ensayos realizados a campo con el uso diferencial de las fuentes de C por parte de las cepas utilizadas en los ensayos. Así, la fuente carbonada arabinosa fue utilizada de forma diferente por las cepas 40M y 42M en condiciones *in vitro* (Tabla 8.2). Esto llevaría a pensar que, gracias a este sustrato, se podrían realizar distinciones entre los perfiles metabólicos de las diferentes muestras rizosféricas de plantas inoculadas con cada una de las cepas. Sin embargo, en los ensayos a campo donde se evaluaron los inoculantes monocepa por separado se observó cierto grado de diferenciación entre los perfiles fisiológicos de las diferentes comunidades microbianas rizosféricas (Figuras 4.1, 6.6 y 6.7) pero el sustrato carbonado arabinosa no fue uno de los principales entre los destacados por los análisis discriminantes realizados (secciones 4.2 y 6.2).

Tabla 8.2 Valores de absorbancia (590 nm) de las fuentes de carbono (C) utilizados por las cinco cepas de *Azospirillum brasilense* a las 72 horas de incubación.

Fuentes de C	Sp7	Cd	Az39	40M	42M
Arginina	0,08 a	0,06 a	0,15 b	0,10 a	0,09 a
Fructosa	0,24 b	0,36 c	0,20 ab	0,16 a	0,18 a
Ácido itacónico	0,11 a	0,28 c	0,20 b	0,12 a	0,09 a
Glutamina	0,07 a	0,15 c	0,11 b	0,09 ab	0,08 ab
Prolina	0,16 b	0,08 a	0,24 c	0,19 b	0,17 b
Arabinosa	0,08 ab	0,23 c	0,14 b	0,05 a	0,15 bc

En relación a las restantes fuentes de C analizadas, éstas fueron utilizadas en forma similar por las cepas 40M y 42M pero en diferente magnitud, respecto al resto cepas evaluadas (Tabla 8.2). Esto podría llevar a pensar que, debido a la inclusión de estos sustratos en los análisis, se podrían realizar distinciones entre los perfiles metabólicos de las diferentes muestras rizosféricas de plantas inoculadas respecto a las plantas no inoculadas. En los ensayos donde fue posible distinguir diferencias en los perfiles fisiológicos debidas a la inoculación, las fuentes de C histidina, glutamina, ácido oxálico, ácido láctico, prolina, arginina y fructosa fueron destacados como fuentes de C

importantes para la diferenciación de las muestras por los análisis discriminantes realizados (Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 6.6, 6.7 y 6.8), pero también fueron destacados los sustratos ácido málico, dextrosa, putrescina, glicina, celobiosa, glicerina y tween 20, ácido cítrico y xilosa. Las diferentes cepas evaluadas no presentaron diferencias en el nivel de utilización de estos últimos sustratos mencionados. Asimismo, es importante mencionar que estas fuentes carbonadas (Tabla 8.2) fueron destacadas por los diferentes análisis discriminantes como algunas de las principales para el agrupamiento de las muestras, aún cuando en dichos análisis no se llegaron a distinguir similitudes en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas rizosféricas de las plantas sometidas a los cada uno de los diferentes tratamientos (Figuras 5.11, 5.12, 5.13, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6).

En resumen, en aquellos ensayos donde se observaron diferencias en los perfiles metabólicos debidas a la aplicación de los diferentes inoculantes, dichos resultados estarían indicando que la inoculación genera modificaciones en las comunidades microbianas rizosféricas no sólo debidas a la colonización de la bacteria inoculada, sino también de la modificación de otras comunidades microbianas presentes en la rizósfera de los cultivos de trigo y maíz, tal como se presentó en el análisis de las fuentes de C anteriormente discutidas. Es necesario aquí destacar una vez más, y tal como se mencionó anteriormente, que la modificación generada por los tratamientos aplicados fue de menor magnitud que la generada por la propia modificación de la comunidad microbiana a lo largo del ciclo del cultivo (Figuras 4.3, 5.13, 6.8, 7.3 y 7.6).

El análisis de componentes principales realizado con los datos de CLPP de todos los ensayos en conjunto mostró diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas debidas, fundamentalmente, a las características de cada uno de los ensayos y al estado ontogénico de los cultivos (Figura 8.1). Ambos ejes explicaron el 58% de la varianza total de los datos. El CP1 estuvo conformado principalmente por ácido láctico (0,28), maltosa (0,28), putrescina (0,27), manitol (0,26) y arginina (0,26). Este eje permitió diferenciar la fisiología de las comunidades microbianas de los cultivos de maíz de los de trigo, y a los diferentes estados ontogénicos de éstos últimos. Las diferencias observadas entre los distintos cultivos no deben ser adjudicadas únicamente a los diferentes materiales genéticos utilizados en los ensayos, sino que, dentro de esas diferencias se encuentran también, diferentes condiciones ambientales de crecimiento de los cultivos, como pueden ser suelo, temperatura y precipitaciones, entre otras características. Respecto a eso, algunos autores establecieron diferencias en las comunidades microbianas rizosféricas de diferentes

tipos de suelos (Bossio *et al.*, 2005; Minz y Ofek, 2011), mientras que la especie vegetal definió más claramente la comunidad rizosférica asociada, en comparación al efecto del tipo de suelo en el cual crecían dichas especies (Miethling *et al.*, 2000; Roesti *et al.*, 2006; Wieland *et al.*, 2001), debido a diferencias en la estructura radical (Houlden *et al.*, 2008) y en los exudados radicales (Rengel, 2002). En cuanto a las diferencias debidas al estado fenológico de los cultivos, resulta interesante observar que las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de los cultivos de trigo en estado de llenado de grano presentaron mayor similitud en sus perfiles fisiológicos con las comunidades de los cultivos de maíz y menor similitud con las comunidades del cultivo respectivo en estado de macollaje o encañazón (Figura 8.1). Como se mencionó anteriormente, otros autores demostraron modificaciones en la diversidad microbiana rizosféricas a lo largo del ciclo de crecimiento vegetal, adjudicadas principalmente, a las diferencias en la calidad y cantidad de exudados radicales (Benizri y Amiaud, 2005; Houlden *et al.*, 2008; Wieland *et al.*, 2001).

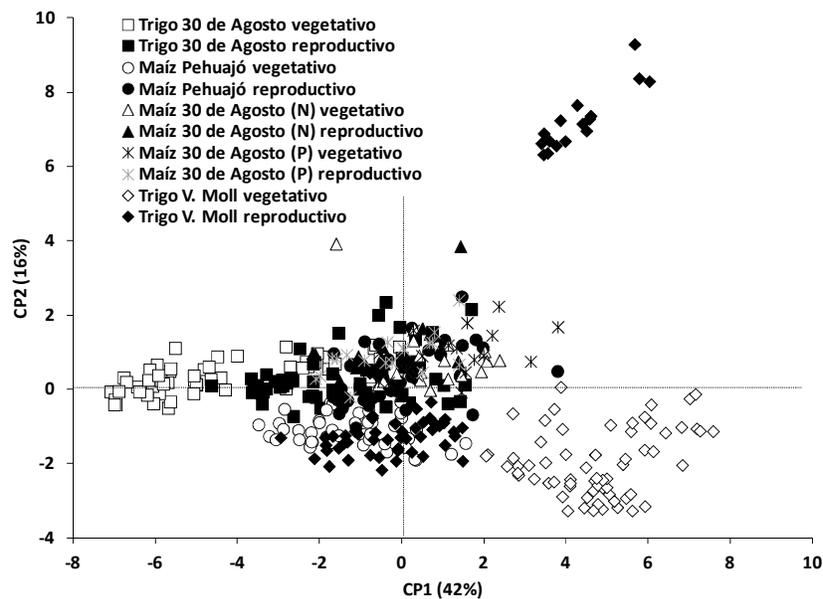


Figura 8.1. Análisis de componentes principales de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes ensayos y estados ontogénicos de los cultivos de maíz y trigo. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

Por su parte, el CP2 del análisis de componentes principales estuvo conformado principalmente por tween 20 (0,45) y ácido oxálico (0,35). Este eje permitió diferenciar algunas repeticiones correspondientes al ensayo de trigo de Villa Moll en estado reproductivo de llenado de grano (Figura 8.1). Estas repeticiones corresponden a un bloque entero del ensayo, por lo que resulta esperable que estas diferencias se deban a características edafológicas que interaccionaron con el cultivo en el estado de llenado de grano, las que produjeron que la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas fuese diferente a los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas del resto del ensayo. Cabe mencionar que las variables fisicoquímicas determinadas a partir de las muestras de suelo de este ensayo, las cuales corresponden a las determinaciones de rutina, no mostraron ningún valor destacable en el bloque en cuestión, en comparación al resto de los bloques del ensayo, que pueda explicar estas diferencias. Debido a esto, es que se presentaron los valores promedio de las variables fisicoquímicas del suelo de todo el lote del ensayo (sección 4.1).

El análisis discriminante realizado con los datos de CLPP de todos los ensayos en conjunto (Figura 8.2) mostró las mismas diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas rizosféricas debidas, fundamentalmente, a las características de cada uno de los ensayos y al estado ontogénico de los cultivos que se observaron en el análisis de componentes principales (Figura 8.1). Sin embargo, el análisis discriminante determinó que las diferencias entre los diferentes cultivos de trigo, y entre ambos estados ontogénicos de cada uno de ellos se debieron, principalmente, al uso diferencial del ácido oxálico (13,86) y del ácido láctico (13,4). Además, este análisis determinó que las comunidades microbianas rizosféricas de los cultivos de maíz utilizan en forma diferencial las distintas fuentes de C evaluadas, en particular, celobiosa (9,96), manitol (-8,96) y prolina (-7,09).

Ninguno de los dos análisis realizados permitió observar diferencias en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de todos los cultivos de maíz. Esto resulta interesante si se tiene en cuenta que la diversidad genotípica dentro de los cultivos de maíz es muy baja o nula, considerando que las semillas comerciales corresponden a híbridos. Por el contrario, la diversidad genotípica de un cultivo de trigo es más elevada, ya que corresponden a variedades comerciales. En conclusión, la variabilidad genotípica y su relación con las comunidades microbianas asociadas (Kristin y Miranda, 2013) podría estar explicando, en gran parte, el hecho de

que no se observen diferencias entre los diferentes ensayos de maíz pero sí entre los distintos ensayos de trigo realizados en este trabajo (Figuras 8.1 y 8.2). Finalmente, tanto el análisis de componentes principales como el análisis discriminante determinaron que los tratamientos aplicados, tanto de inoculación (Figura 8.3) como de fertilización (Figura 8.4), no generaron modificaciones de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas rizosféricas más significativos que los generados por la interacción planta-ambiente, o aquellos generados por la fisiología del cultivo en sí misma. En relación a esto, otros autores demostraron el efecto de la especie vegetal y su fenología en la diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas (Baudoin *et al.*, 2003; Grayston *et al.*, 1998; Houlden *et al.*, 2008; Kent y Triplett, 2002; Kristin y Miranda, 2013; Söderberg *et al.*, 2002).

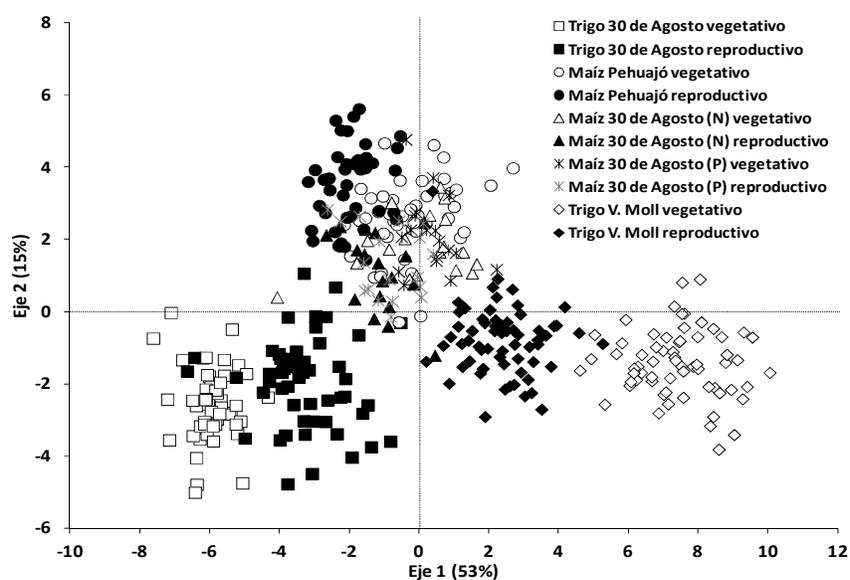


Figura 8.2. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes ensayos y estados ontogénicos de los cultivos de maíz y trigo. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

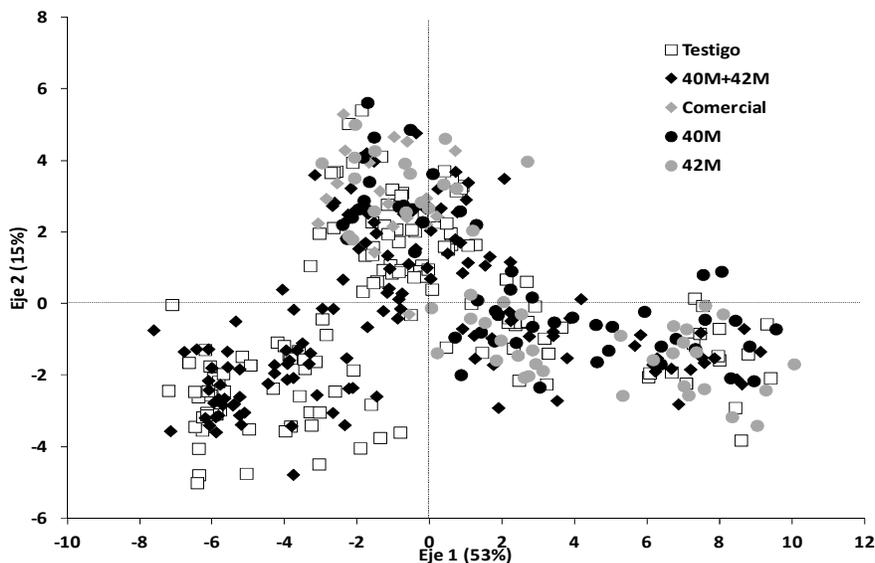


Figura 8.3. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes tratamientos de inoculación aplicados en los ensayos. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

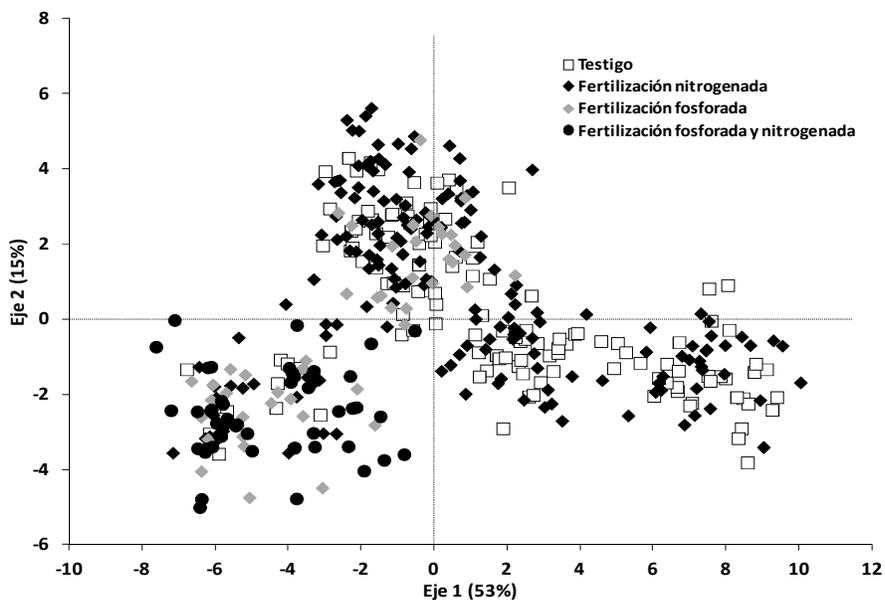


Figura 8.4. Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos (CLPP) de las comunidades microbianas rizosféricas, representados según los diferentes tratamientos de fertilización aplicados en los ensayos. Los valores de absorbancia correspondientes a las 72 hs de incubación fueron utilizados para realizar el análisis. Entre paréntesis se presenta el porcentaje de varianza total explicada por cada uno de los ejes.

Se han reportado efecto de las prácticas agrícolas sobre la diversidad estructural de las comunidades microbianas (Bossio *et al.*, 2005; García de Salamone *et al.*, 2010; Ibekwe *et al.*, 2002; Kent y Triplett, 2002; Nogales, 2005). Una de las herramientas utilizadas para la evaluación de la misma es el análisis de los perfiles de T-RFLP, el cual se basa en la restricción enzimática de los productos de la amplificación por PCR y en la cuantificación de los fragmentos terminales de cada secuencia amplificada, obteniéndose un patrón de digestión específico para cada comunidad microbiana (Tiedje *et al.*, 1999). Una completa descripción de la técnica se encuentra en Marsh (1999) y los detalles metodológicos se encuentran detallados en Liu *et al.* (1997). Esta técnica posee las limitaciones de cualquier herramienta molecular dependiente de la amplificación por PCR (Liu *et al.*, 2006; Kirk *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 2000). Además, debe considerarse que un mismo T-RF puede representar varias especies o géneros diferentes (Smalla *et al.*, 2007), lo que puede generar que no se perciban algunos cambios o sustitución específica, tal como sucede con el fenómeno de redundancia de los CLPP mencionado anteriormente. Esta limitación puede reducirse utilizando más de una enzima de restricción (Clement *et al.*, 1998). A pesar de dichas limitaciones, se ha señalado y demostrado que esta metodología constituye una de las técnicas más robustas y confiables para la caracterización de la diversidad estructural de las comunidades microbianas (Osborn *et al.*, 2000; Smalla *et al.*, 2007; Torsvik *et al.*, 1998). Presenta las ventajas de otras técnicas basadas en la restricción enzimática, pero con una mayor simplificación de los patrones de restricción (Tiedje *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2004), lo que resulta sumamente útil para muestras con una alta diversidad, como las comunidades microbianas edáficas (Nogales, 2005). Por este motivo, entre otros, numerosos autores han utilizado esta metodología para la evaluación de la diversidad de comunidades microbianas de suelos (Fierer y Jackson, 2006; Lukow *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2009; Ying *et al.*, 2010) y otros ambientes (Clement *et al.*, 1998; Moeseneder *et al.*, 1999; Sawamura *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2009).

Para que un T-RF pueda ser asignado a una determinada especie bacteriana, a partir de los productos de PCR se debe generar una librería de clones y realizar la secuenciación de cada uno de ellos para una posterior comparación de secuencia con la base de datos disponible (Marsh, 1999; Ranjard *et al.*, 2000). En lugar de generarse una librería de clones, en este trabajo se realizó una asignación potencial de los principales T-RFs obtenidos, siendo ésta una de las herramientas de análisis que posibilita la técnica de T-RFLP (Dunbar *et al.*, 2001). Esta asignación resulta potencial

debido a que, tal como se mencionó anteriormente, un mismo T-RF puede representar varias especies o géneros diferentes (Smalla *et al.*, 2007). Además, para que un T-RF pueda ser asignado a una determinada especie, ésta debe haber sido previamente aislada e identificada, y su secuencia depositada en la base de datos para utilizarse luego durante las digestiones *in silico* y la subsiguiente comparación con la secuencia a ser identificada. Es por ello que una especie aún desconocida y no disponible en la base de datos no puede ser comparada con las secuencias a ser identificadas. Teniendo en cuenta estas limitantes, en este trabajo se realizó una asignación potencial de algunos de los T-RF obtenidos a partir de las muestras rizosféricas del ensayo de trigo realizado en Villa Moll, en forma similar al análisis realizado por otros autores en trabajos previos (Sawamura *et al.*, 2010).

El T-RF de 150-151 pb obtenido con la enzima *MspI* fue uno de los más abundantes, en un 22,0% de abundancia relativa, en promedio, en todas las muestras (Figura 4.5). Además, este T-RF resultó ser el más abundante en todas las muestras, a excepción de las muestras de plantas en enzañazón, sin inocular y fertilizadas con N, en las que este T-RF fue el segundo en orden de abundancia relativa. En estas muestras, el primero en orden de abundancia relativa fue el T-RF de 141 pb obtenido con la misma enzima de restricción (Figura 4.5), el cual se discute posteriormente. Luego de la digestión *in silico* con *MspI* de las secuencias de la base de datos, 727 de éstas presentaron un T-RF de 150-151 pb y correspondieron a 67 especies diferentes, en su mayoría pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Erythrobacter*, *Nostoc*, *Methylobacterium* y *Azospirillum*. Algunos autores mostraron que *Paenibacillus* sp. se encuentra presente en la rizósfera de trigo (Germida y Siciliano, 2001). El género *Erythrobacter* fue aislado de hábitats marinos (Koblížek *et al.*, 2003) y hasta el momento no se ha reportado la presencia del mismo en el ambiente rizosférico. El género *Methylobacterium* es ubicuo, habiendo sido encontrado en una gran variedad de ambientes, incluyendo rizósfera de trigo (Höflich *et al.*, 1999; Sanguin *et al.*, 2009) y el género *Nostoc* ha sido propuesto como inoculante para trigo (Karthikeyan *et al.*, 2007) y arroz (Mallik y Williams, 2008).

Es interesante analizar que, por un lado, el T-RF 150-151 pb obtenido con *MspI*, el cual podría ser asignado a *Azospirillum* sp., se encontró en todas las muestras (Figura 4.5) Por otro lado, el NMP de microorganismos MFN en la rizósfera de plantas de trigo fue similar en los tres tratamientos evaluados, en promedio 5,80 log NMP g⁻¹ de raíz seca. Por ello, ambos resultados podrían ser considerados como consistentes y relacionados. Sin embargo, esta aseveración no es apropiada

debido a que, por un lado, el T-RF 150-151 pb no es exclusivo de las bacterias con capacidad de FBN similares a *Azospirillum* sp., y, por otro lado, en el medio de cultivo utilizado para determinar el NMP de este grupo funcional pueden crecer bacterias con capacidad de FBN, como fue discutido previamente, incluso con T-RFs de 150-151 pb o diferentes.

En orden de abundancia relativa de todas las muestras, los siguientes T-RFs que le siguieron al de 150-151 pb fueron: 92-93 pb (promedio de abundancia relativa en todas las muestras de 11,1%), 139-140 pb (9,8%), 141 pb (9,6%), 129-130 pb (8,1%) y 142-143 (7,0%) (Figura 4.5). Luego de la digestión *in silico* con *MspI* de las secuencias disponibles en la base de datos, 48 de éstas presentaron un T-RF de 92-93 pb y correspondieron a 21 especies diferentes, en su mayoría pertenecientes al género *Bacteroides*. Este género fue encontrado en la rizósfera de algunos cultivos, tales como pepino (Ibekwe *et al.*, 2010) y soja (Xu *et al.*, 2009). Otras 22 secuencias presentaron un T-RF de 139-140 pb y correspondieron a 43 especies diferentes, en su mayoría los géneros *Micromonospora* y *Salinispora*. El género *Micromonospora* se encuentra en la rizósfera de plantas de cultivo (Carro *et al.*, 2012; El-Tarabily *et al.*, 2008), mientras que el género *Salinispora* fue aislado de hábitats marinos (Maldonado *et al.*, 2005) y, hasta el momento, no se ha reportado como habitante del ambiente rizosférico. Otras 212 secuencias presentaron un T-RF de 141 pb y correspondieron a 21 especies diferentes, en su mayoría al género *Burkholderia*. Éste es un género PGPR frecuentemente encontrado en la rizósfera de plantas cultivadas, tales como maíz (Di Cello *et al.*, 1997; Bevivino *et al.*, 1998), arroz (Gillis *et al.*, 1995) y tomate (Caballero-Mellado *et al.*, 2007). Otras 173 secuencias presentaron un T-RF de 129-130 pb y correspondieron a 34 especies diferentes, en su mayoría los géneros *Paracoccus*, *Thiothrix*, *Anaeromyxobacter* y *Gluconacetobacter*. Todos los géneros mencionados han sido encontrados en la rizósfera de diversas plantas de cultivo, tales como arroz (Eller y Frenzel, 2001; Lu *et al.*, 2006) y café (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001), entre otras (Kämpfer *et al.*, 2012). Finalmente, otras 46 secuencias de la base de datos presentaron un T-RF de 142-143 pb y correspondieron a 16 especies diferentes, en su mayoría a los géneros *Nocardioide*s, *Cryptobacterium* y *Burkholderia*. Algunos autores mostraron incrementos en el rendimiento de maíz con la inoculación con *Burkholderia cepacia* y la fertilización nitrogenada (Riggs *et al.*, 2001). Otros autores reportaron el género *Nocardioide*s en rizósfera de trigo (Conn y Franco, 2004). El género *Cryptobacterium* fue aislado de cavidades orales

humanas (Nakazawa *et al.*, 1999) y, hasta el momento, no se ha reportado como habitante del ambiente rizosférico.

Los T-RFs obtenidos con la enzima de restricción *HhaI* que presentaron mayor abundancia en todas las muestras corresponden a 234-235 pb (promedio de abundancia relativa en todas las muestras de 26,9%), 92-93 pb (25,5%), 232-233 pb (14,3%), 236 pb (12,0%) y 359-360 pb (9,5%) (Figura 4.6). Este último T-RF fue considerado por el análisis discriminante como uno de los importantes para diferenciar las comunidades rizosféricas. Luego de la digestión *in silico* con *HhaI* de las secuencias disponibles en la base de datos, 36 de éstas presentaron un T-RF de 234-235 pb y correspondieron a 7 especies diferentes, en su mayoría a *Paenibacillus*, género ya mencionado y discutido previamente. Otras 157 secuencias presentaron un T-RF de 92-93 pb y correspondieron a 33 especies diferentes, en su mayoría al género *Flavobacterium*, *Geobacter*. y *Desulfovibrio*. El género *Flavobacterium* ha sido encontrado en el ambiente rizosférico (Grayston *et al.*, 1998) y fue descrito como biorremediador de agroquímicos (Sethunathan y Yoshida, 1973) e hidrocarburos (Daane *et al.*, 2001). Los géneros *Geobacter* y *Desulfovibrio* corresponden a bacterias anaerobias estrictas, reductoras del hierro (Lovley *et al.*, 1993) y del sulfato (Devereux *et al.*, 1990). Finalmente, otras 34 secuencias presentaron un T-RF de 359-360 pb y correspondieron a 17 especies diferentes, en su mayoría al género *Streptomonospora*, actinomicete halófilico encontrado en suelos (Li *et al.*, 2003) pero, hasta el momento, no en ambientes rizosféricos de plantas de cultivo.

Es interesante destacar que el análisis de los fragmentos más abundantes, como usualmente se encuentra en la bibliografía, no resultaron muy útiles para evidenciar diferencias entre tratamientos o estados ontogénicos del cultivo (Figuras 4.5 y 4.6). Por el contrario, cuando se consideraron dentro del análisis T-RFs menos abundantes, se distinguieron mejor las diferencias entre los perfiles estructurales de las comunidades microbianas (Figuras 4.4 y 4.7). En relación a esto, el T-RF de 144 pb obtenido con la enzima *MspI* no fue uno de los más abundantes en las muestras (Figura 4.7), pero fue uno de los T-RFs considerados por el análisis discriminante como uno de los más importantes para diferenciar las comunidades rizosféricas (sección 4.2). Este fragmento estuvo presente en todas las muestras y estados ontogénicos, excepto en las plantas testigo no fertilizadas en ambos estados (Figura 4.7). Luego de la digestión *in silico* con *MspI* de las secuencias de la base de datos, 25 de éstas presentaron el T-RF de 144 pb y correspondieron a 12 especies diferentes, entre los que se encontraban los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales

son frecuentemente aislados de suelos y ampliamente reconocidos como PGPR (Gamalero y Glick, 2011). Aparentemente, las prácticas agrícolas de inoculación y fertilización favorecieron la abundancia de este tipo de especies bacterianas, lo que hace más interesante su inclusión en potenciales estudios como bacterias PGPR para el cultivo de trigo, tanto como inoculantes simples como en co-inoculación con *A. brasilense* y, en interacción con la aplicación de fertilizantes nitrogenados.

La relación entre la composición genética de las comunidades microbianas, o diversidad estructural, y las funciones ecosistémicas que llevan a cabo dichas comunidades, también conocida como diversidad funcional, no es del todo conocida (Bastida *et al.*, 2008) ni simple de determinar (Beck *et al.*, 2005), constituyendo el siguiente desafío de la microbiología de suelos (Nogales, 2005; Torsvik y Øvreås, 2002). Debido a ello, numerosos autores destacan la utilidad de combinar diversas técnicas, incluso técnicas cultivables tradicionales, para la evaluación de la diversidad microbiana de suelos (Bastida *et al.*, 2008; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Kirk *et al.*, 2004; Ranjard *et al.*, 2000; Torsvik y Øvreås, 2002; Winding *et al.*, 2005). Al respecto, algunos autores combinaron varias técnicas, entre ellas de la evaluación de perfiles fisiológicos y moleculares, para evaluar diferencias en las comunidades microbianas de diferentes especies vegetales (Houlden *et al.*, 2008; Miethling *et al.*, 2000), tipos suelos (Bossio *et al.*, 2005; Miethling *et al.*, 2000; Øvreås y Torsvik, 1998; Widmer *et al.*, 2001), tamaños de agregados (Väisänen *et al.*, 2005) y prácticas de manejo agrícola (Bossio *et al.*, 2005; Ibekwe *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2008). En este trabajo, se analizaron conjuntamente los perfiles funcionales y estructurales de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera de plantas de trigo bajo diferentes manejos agrícolas. Los tratamientos aplicados en el ensayo realizado en Villa Moll no generaron efectos sobre los perfiles funcionales de las comunidades microbianas rizosféricas (Figura 4.3), aunque se observaron modificaciones en los perfiles estructurales de las mismas (Figura 4.4). Cambios en la diversidad genética de la comunidad microbiana podrían no afectar las funciones ecosistémicas debido a que una comunidad puede estar conformada por diferentes taxas que pueden realizar el mismo proceso, lo que se conoce como la teoría del fenómeno de redundancia (Bossio *et al.*, 2005; Allison y Martiny, 2008). Si bien otros autores mostraron que la inoculación con *A. brasilense* no modificó los miembros dominantes de las comunidades microbianas endofíticas (Pedraza *et al.*, 2009), los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado previamente por otros autores (Kirk *et al.*, 2004; Miethling *et al.*, 2003) y con los

resultados obtenidos en trabajos previos en los que se evaluó el efecto de la inoculación de plantas de arroz sobre la diversidad estructural de comunidades bacterianas presentes (García de Salamone *et al.*, 2010). Asimismo, otros autores reportaron que la fertilización del cultivo de arroz disminuyó la abundancia de microorganismos con capacidad de FBN (Tan *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009) y modificó la estructura de las comunidades de microorganismos desnitrificadores (Chen *et al.*, 2010), evaluados mediante análisis de T-RFLP de los genes *nifH* y *NirS/K*, respectivamente.

Los perfiles estructurales de las comunidades bacterianas rizosféricas mostraron diferencias entre tratamientos en el estado de encañazón del cultivo, pero no en el estado de llenado de grano (Figura 4.4). Luego de un disturbio, como pueden ser las prácticas agrícolas de inoculación o fertilización (Bruggen y Semenov, 2000), las comunidades microbianas presentes pueden alterarse (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Kent y Triplett, 2002; Minz y Ofek, 2011), pudiendo retornar a una composición similar a la presente antes del disturbio, dependiendo de su resiliencia (Allison y Martiny, 2008). Al respecto, otros autores demostraron que aplicaciones repetidas en el tiempo de un producto formulado con una bacteria biocontroladora al suelo de una plantación cítrica, no generó modificaciones significativas de las comunidades microbianas presentes (Steddom *et al.*, 2002). Otros autores mostraron que la estructura de la comunidad microbiana de suelos sometidos a prácticas de laboreo periódicas presentó diferencias respecto a la del suelo bajo prácticas de laboreo reducido, siendo éstas últimas similares a la estructura de la comunidad presente en el suelo original de bosque (Peixoto *et al.*, 2006). Asimismo, en ambos estados fenológicos del cultivo evaluado, los perfiles funcionales de las comunidades microbianas fueron diferentes entre sí (Figura 4.3). Sin embargo, estos resultados no son suficientes para determinar que dichos cambios en la diversidad funcional (Figura 4.3) hayan sido permanentes o no luego de la cosecha del cultivo.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar los efectos de la aplicación de las prácticas agrícolas sobre la diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas nativas. Como fue previamente discutido, en este trabajo se demostró que el efecto de la especie vegetal y su fenología, en interacción con el ambiente determina la diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas en mayor medida que las prácticas agronómicas evaluadas. En relación a la evaluación de la diversidad estructural, debido a algunas dificultades acontecidas durante la realización del trabajo de amplificación a partir de las muestras de ADN extraídas, en el lapso de tiempo determinado para la realización de este trabajo únicamente pudo evaluarse este parámetro

en uno de los ensayos de trigo realizados. Esto determina que no se haya podido realizar la comparación de la diversidad estructural entre diferentes ensayos, de manera similar a lo realizado con los perfiles funcionales (Figuras 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4). Aún así, en base a los resultados obtenidos en el ensayo de trigo y discutidos anteriormente, y considerando además lo demostrado anteriormente por otros autores (Aulakh *et al.*, 2001; Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Herschkovitz *et al.*, 2005; Houlden *et al.*, 2008; Kristin y Miranda, 2013; Marschner *et al.*, 2002; Roesti *et al.*, 2006), hubiese sido esperable observar diferencias en los perfiles estructurales determinadas, principalmente, por las diferentes especies vegetales, su fenología y la interacción de éstas con el ambiente, y en segundo lugar, por los niveles de inoculación y fertilización evaluados. Considerando que estos resultados resultarían interesantes, novedosos y complementarios a la información obtenida hasta el momento en este trabajo, es importante señalar que se encuentra previsto realizar la determinación faltante para completar el trabajo previo a la publicación de los mismos en revistas científicas.

Algunos autores encontraron diferencias en los índices H' calculados a partir de perfiles funcionales y genéticos entre diferentes tipos de suelo (Øvreås y Torsvik, 1998) y prácticas de manejo agrícola (Xue *et al.*, 2008) y otros autores no (Bossio *et al.*, 2005). En ninguno de los ensayos realizados en este trabajo se observaron diferencias significativas debidas a los tratamientos evaluados sobre la diversidad funcional, mediante el índice H' calculado a partir de los datos de los perfiles de CLPP (secciones 4.2, 5.2, 6.2, 7.2.1 y 7.2.2). Otros autores, aunque en condiciones controladas, también reportaron que la inoculación con *A. brasilense* no generó efectos significativos sobre la diversidad estructural de la rizósfera de maíz (Herschkovitz *et al.*, 2005). Tampoco se observaron diferencias en este índice H' entre estados fenológicos en los ensayos de maíz realizados en 30 de Agosto (secciones 7.2.1 y 7.2.2), presentado valores promedio de alrededor de 3. Debido a las características de este índice, en relación al tipo de diversidad que determina, no pueden realizarse comparaciones estadísticas entre los diferentes ensayos, pero se pudo observar que dicho valor fueron los más altos obtenidos en todos los ensayos realizados. Estos valores de diversidad funcional pueden estar indicando una situación de estrés (Degens *et al.*, 2001) que concuerda con lo discutido anteriormente en relación al estrés hídrico sufrido por los cultivos en estos ensayos.

Por el contrario, se observaron modificaciones en la diversidad funcional en las diversas etapas ontogénicas de los cultivos, observándose aumentos de diversidad a medida que avanzó el cultivo de trigo realizado en 30 de Agosto (sección 5.2) y el cultivo de maíz realizado en Pehuajó (sección 6.2). Tal como se mencionó previamente en la discusión de los resultados de las comunidades de microorganismos MFN y celulolíticos, a medida que el ciclo del cultivo avanza, se modifica la cantidad y calidad de exudados radicales (Aulakh *et al.*, 2001; Kamilova *et al.*, 2006), modificándose las comunidades microbianas presentes en la rizósfera (Kristin y Miranda, 2013; Houlden *et al.*, 2008; Marschner *et al.*, 2002). El pH del suelo es la variable edáfica que mejor explica la diversidad y los perfiles estructurales de las comunidades microbianas a escala continental (Fierer y Jackson, 2006), mientras que a escala local se explican por la vegetación y la disponibilidad de C y otros nutrientes (Benizri y Amiaud, 2005), en concordancia con lo observado en este trabajo (Figura 8.4) y previamente discutido. Los resultados mencionados coinciden con lo reportado por otros autores que mostraron modificaciones en la estructura y funcionalidad de comunidades rizosféricas de maíz a lo largo del tiempo (Baudoin *et al.*, 2002). Resultados opuestos se observaron en el ensayo de trigo realizado en Villa Moll (sección 4.2), en el cual la diversidad funcional fue mayor en el estado de encañazón respecto al estado de llenado de grano. Esto pueda deberse a que la primer determinación se realizó en estado de encañazón y no en macollaje, siendo ésta última una etapa vegetativa del cultivo más temprana. Además, en este ensayo se distinguieron diferencias entre estados ontogénicos en el índice H' calculado a partir de los perfiles funcionales pero no en el índice H' calculado a partir de los perfiles estructurales. Considerando que otros autores demostraron un efecto significativo de la fenología del cultivo en la diversidad estructural de las comunidades microbianas rizosféricas (Herschkovitz *et al.*, 2005), los resultados de este trabajo indicarían que la técnica de CLPP está revelando una diversidad funcionalidad potencial que no demostró el análisis de diversidad genética.

A modo de síntesis, bajo las condiciones evaluadas en este trabajo y a partir de los resultados obtenidos durante el mismo, se concluye que:

1. La inoculación de plantas de trigo y maíz con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M aumentó el rendimiento y la producción de biomasa de los cultivos de trigo y maíz. Esta respuesta se observó en algunos de los ensayos realizados y no en todos, en relación a la interacción producida entre el genotipo vegetal, de la bacteria y las condiciones ambientales.

Esto demuestra que estas cepas poseen el potencial para ser utilizadas como bioinsumos para la producción de trigo y maíz, superando incluso la respuesta obtenida con un inoculante comercial. El nivel máximo de respuesta en el rendimiento obtenido en esos ensayos fue del 50%. En los ensayos en los cuales las respuestas a la inoculación no fueron estadísticamente significativas se produjo un incremento del rendimiento y la generación de biomasa, económico y ambientalmente sustentable. La respuesta de los cultivos a la inoculación con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M se encontró determinada por las interacciones producidas entre las cepas bacterianas inoculadas, el genotipo vegetal y el ambiente. Teniendo en cuenta la respuesta obtenida en rendimiento, biomasa aérea, densidad de longitud radical y EUF resultan evidentes las ventajas de los inoculantes combinados respecto a los inoculantes monocepa. Finalmente, este trabajo es uno de los pocos trabajos en establecer valores de densidad de longitud total de raíces para los cultivos de trigo y maíz en ambientes productivos, demostrándose que esta variable complementa la determinación de biomasa radical, más frecuentemente utilizada, para la evaluación del efecto de las prácticas agronómicas como la fertilización y la inoculación con bacterias PGPR, como así también para demostrar diferencias en la morfología de las raíces a medida que avanza el ciclo del cultivo.

2. La fertilización fosforada y nitrogenada de plantas de trigo y maíz aumentó el rendimiento y la producción de biomasa de los cultivos. Esta respuesta se observó en algunos de los ensayos realizados y no en todos, en relación a la interacción producida entre el genotipo vegetal y las condiciones ambientales. El inoculante experimental combinado mejoró la EUF del fertilizante fosforado por parte del cultivo de trigo, y del fertilizante nitrogenado por parte del cultivo maíz. Además, la inoculación permitió obtener altos rendimientos con dosis intermedias de fertilización, permitiendo reducir a la mitad la dosis aplicada, aumentando la EUF, asegurando los niveles de rendimiento, reduciendo los costos y disminuyendo el riesgo de contaminación ambiental.
3. La inoculación con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M aumentó el recuento de microorganismos MFN únicamente en uno de los ensayos, lo que podría estar evidenciando una ventaja competitiva de estas cepas en estas condiciones. La fertilización nitrogenada modificó el recuento de microorganismos MFN presentes en la rizósfera de maíz, aunque el

efecto fue dosis dependiente. En los restantes ensayos, la inoculación y la fertilización no produjeron efectos significativos, considerándose las condiciones del medio de cultivo utilizado, en el que pueden desarrollarse cepas nativas de esta bacteria y otras diferentes a *A. brasilense*. Asimismo, bajo las condiciones de los medios de cultivo utilizados en la cuantificación se pudo determinar que la inoculación de las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M no generó efecto alguno sobre las comunidades microbianas rizosféricas evaluadas asociadas a los ciclos de C o del N. Además, únicamente en uno de los ensayos se observó que la fertilización nitrogenada modificó el recuento de microorganismos celulolíticos y nitrificadores presentes en la rizósfera de maíz. Asimismo, se observaron modificaciones en los recuentos de microorganismos MFN, celulolíticos y nitrificadores a lo largo del ciclo de los cultivos, muy probablemente asociados a la modificación de la cantidad y calidad de exudados radicales, aunque esto último no fue determinado en este trabajo.

4. La inoculación de plantas de trigo y maíz con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M generó modificaciones en las comunidades microbianas rizosféricas no sólo debidas a la colonización de la bacteria inoculada, sino también de la modificación de otras comunidades microbianas presentes en la rizósfera de los cultivos de trigo y maíz. Sin embargo, dicha modificación resultó de menor magnitud que la modificación de la comunidad microbiana a lo largo del ciclo del cultivo y entre cultivos diferentes. Estas últimas no deben ser adjudicadas únicamente a los diferentes materiales genéticos utilizados en los ensayos, sino que, dentro de esas diferencias se encuentran también, diferentes condiciones ambientales de crecimiento de los cultivos, las cuales no fueron puestas a prueba ni consideradas en el diseño de los ensayos. Es interesante destacar que ninguno de los análisis realizados evidenció diferencias en los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de la rizósfera de todos los cultivos de maíz, por lo que la variabilidad genotípica y su relación con las comunidades microbianas asociadas podrían explicar las diferencias observadas entre los distintos ensayos de trigo y no observadas entre los diferentes ensayos de maíz.
5. Los tratamientos de fertilización e inoculación no modificaron los perfiles funcionales de las comunidades microbianas rizosféricas pero modificaron en los perfiles estructurales de las mismas, lo que podría constituir un ejemplo del fenómeno de redundancia de las comunidades microbianas. Asimismo, dichos efectos se observaron durante el desarrollo

vegetativo del cultivo y no se observaron en el estado reproductivo, pudiendo ser una muestra de la resiliencia de las comunidades microbianas rizosféricas. Entre estados ontogénicos se registraron diferencias en el índice H' determinado a partir de los datos de los perfiles funcionales pero no en el índice H' determinado a partir de los datos de los perfiles estructurales, indicando que la técnica de CLPP está revelando una diversidad funcionalidad potencial que no se observa en un análisis de diversidad genética. Finalmente, ni la fertilización ni la inoculación modificaron el índice H' de diversidad funcional, pero se observaron diferencias entre estados ontogénicos del cultivo, asociados a la modificación de la cantidad y calidad de exudados radicales, aunque esto no fue determinado en este trabajo. Si bien se observaron diferencias en los perfiles fisiológicos en ambos estados fenológicos del cultivo de trigo, estos resultados no son concluyentes para determinar que dichos cambios en la diversidad funcional hayan sido permanentes o no luego de la cosecha del cultivo.

6. En relación a la determinación de los perfiles estructurales de las comunidades microbianas, es interesante destacar que mediante un análisis de los fragmentos más abundantes, de acuerdo a la forma de análisis más usual en la bibliografía, no resultaron tan útiles para evidenciar diferencias entre tratamientos o estados ontogénicos del cultivo, respecto a los análisis realizados con la inclusión de T-RFs menos abundantes. Dichos fragmentos estuvieron presentes en las comunidades microbianas asociadas a plantas de trigo que habían sido fertilizadas o inoculadas con las cepas 40M y 42M. Esto las convierte en objetivos inmediatos de secuenciación e identificación para trabajos posteriores en los que se analicen bacterias PGPR como inoculantes de trigo, tanto en formulaciones monocepa como en formulaciones con *A. brasilense* y, en interacción con la aplicación de fertilizantes. Finalmente, es importante destacar que la ausencia de las determinaciones de la diversidad estructural en otros ensayos hace que este trabajo no sea del todo concluyente sobre el objetivo de evaluar los efectos de la aplicación de inoculación y fertilización fosforada y/o nitrogenada sobre la diversidad estructural de las comunidades microbianas nativas.
7. Los cultivos de trigo y maíz presentaron diferencias en la dinámica de la micorrización natural. La inoculación con las cepas de *A. brasilense* 40M y 42M produjo efectos benéficos en uno de los ensayos, mientras que en los restantes no se observaron efectos de la misma

sobre la micorrización natural. En relación a la respuesta de estas variables a la fertilización, resulta más importante la disponibilidad de ambos nutrientes y los beneficios que implica esta simbiosis, en relación a estos nutrientes y al estado general de la planta, más que la dosis aplicada de un fertilizante en particular. Además, se observó que el la aplicación del inoculante formulado con ambas cepas redujo parcialmente los efectos negativos de la fertilización fosforada sobre el desarrollo de la micorriza arbuscular, siendo éste un aspecto interesante para continuar evaluando y analizando en trabajos posteriores. Se observaron efectos de la inoculación y la fertilización sobre el porcentaje de esporas presentes, las que constituyen uno de los mecanismos de perpetuación del HFMA en el ambiente. Sin embargo, es importante considerar que en este trabajo no se evaluó el efecto sobre la diversidad de HFMA, lo que deberá ser tenido en cuenta en futuros trabajos. Los resultados de este trabajo significan un aporte al conocimiento sobre el establecimiento de las micorrizas naturales en sistemas productivos, lo que adquiere gran relevancia para el manejo de los cultivos en pos de aumentar la eficiencia de los recursos disponibles.

8. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte significativo al conocimiento de la fisiología y la estructura de las comunidades microbianas rizosféricas de cultivos de trigo y maíz, con el objetivo de mejorar la respuesta de los cultivos a la inoculación con microorganismos del tipo PGPR en interacción con la fertilización y para la caracterización del riesgo ambiental de ambas prácticas agronómicas. Estos resultados no sólo aportan información al conocimiento científico, sino que resulta directamente transferible a asesores y productores agropecuarios, bajo el actual paradigma de una producción agrícola más sustentable.

Referencias bibliográficas.

Abbott LK, Robson AD (1991) Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35:121-150.

Abril A (2003) ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral* 13:195-204.

Abril A, Biasutti C, Maich R, Dubbini L, Noe L (2006) Inoculación con *Azospirillum* spp. en la región semiárida-central de la Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica. *Ciencia del Suelo* 24:11-19.

Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology* 54:876-886.

Aeron A, Kumar S, Pandey P, Maheshwari DK (2011) Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiología. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in Agrobiología: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg. Pp. 1-36.

Agromercado (2013) *Revista Agromercado* 337:47-49. ISSN: 1515-223X.

Alef K (1998) Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. En: Alef K, Nannipieri P (eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, California, USA. Pp 123-191.

Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS* 105:11512–11519.

Alten H von, Blal B, Dodd JC, Feldmann F, Vosatka M (2002) Quality control of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum in Europe. En: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds.), *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser Verlag. Basel, Suiza. Pp. 281–296.

Altieri MA (1999) The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:19-31.

Altieri MA, Nicholls CI (2000) Applying agroecological concepts to development of ecologically based pest management strategies. En: National Research Council (ed.), Professional societies and ecologically based pest management: proceedings of a workshop. National Academy Press, Washington DC, USA. 60 pp.

Álvarez R (2005a) Fertilización de trigo. En: Álvarez R (coord.), Fertilización de cultivos de granos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. Pp. 55-80.

Álvarez R (2005b) Fertilización de maíz. En: Álvarez R (coord.), Fertilización de cultivos de granos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. Pp.91-110.

Álvarez R, Gutiérrez Boem FH, Rubio G (2005) Recomendación de fertilización. En: Álvarez R (coord.), Fertilización de cultivos de granos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. Pp. 37-51.

Anderson TH (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98:285-293.

Antoun H, Prévost D (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: Siddiqui ZA (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, The Netherlands. Pp. 1-38.

Arias ME, González-Pérez JA, González-Vila FJ, Ball AS (2005) Soil health—a new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology* 8:13-21.

Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8:1–10.

Arthurson V, Hjort K, Muleta D, Jäderlund L, Granhall U (2011) Effects on *Glomus mosseae* root colonization by *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus brasilensis* strains as related to soil P-availability in winter wheat. *Applied and Environmental Soil Science Article ID 298097:1-9*.

Aquilanti L, Favilli F, Clementi F (2004) Comparison of different strategies of isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1475-1483.

Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Kreuzwieser J, Rennenberg H (2001) Characterization of root exudates at different growth stages of the rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology* 3:139-148.

Azcón-Aguilar C, Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1-24.

Azevedo MS, Teixeira KRS, Kirchof G, Hartmann A, Baldani JI (2005) Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. *Pedobiologia* 49: 565-576.

Babalola OO (2010) Beneficial bacterial of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32:1559-1570.

Baca BE, Elmerich C (2007) Microbial production of plant hormones. En: Elmerich C, Newton W (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. Series Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, Vol. V.* Springer Life Science, The Netherlands. Pp 113-143.

Baca BE, Soto-Urzúa L, Xochihua-Corona YG, Cuervo-García A (1994) Characterization of two aromatic aminoacid aminotransferases and production of indoleacetic acid in *Azospirillum* strains. *Soil Biology and Biochemistry* 26:51-63.

Baca BE, Jijón-Moreno S, Pedraza RO, Campero-Romero AN, Aura N, Soto-Urzúa L, García de Salamone IE, Bonilla-Buitrago R (2012) Genetic diversity of genes involved in indole-3-acetic acid production in the plant growth promoting bacterium *Azospirillum*. VIII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

Bachhawat AK, Ghosh S (1987) Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirilobactin. *Journal of General Microbiology* 133:1759-1765.

Badri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* 32:666-681.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266.

Bakker MG, Manter DK, Sheflin AM, Weir TL, Vivanco JM (2012) Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant and Soil* 360:1-13.

Baldani VL, Baldani JI, Döbereiner J (1987) Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum spp.* in Brazil. *Biology and Fertility of Soils* 4:37-40.

Barea JM (2004) Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 7-11.

Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:343–351.

Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56:1761-1778.

Bashan Y (1999) Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29:246-256.

Bashan Y, Levanony H (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36:591-600.

Bashan Y, Bashan LE de (2002) Protection of tomato seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6): 2637-2643.

Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577.

Bashan LE de, Holguín G, Glick BR, Bashan Y (2007) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds.), Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas, México DF, México. Pp. 161-215.

Bashan Y, Singh M, Levanony H (1989) Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany* 67:22429-2434.

Bashan Y, Trejo A, de-Bashan LE (2011) Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils* 47:963–969.

Bastida F, Zsolnay A, Hernández T, García C (2008) Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147:159-171.

Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2002) Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology* 19:135-145.

Baudoin E, Benizri E, Guckert A (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183-1192.

Baudoin E, Couillerot O, Spaepen S, Moenne-Loccoz Y, Nazaret S (2010) Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculants *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. *Journal of Applied Microbiology* 108:25-38.

Beck L, Römbke J, Breure AM, Mulder C (2005) Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62:189-200.

Bellone CH, Carrizo de Bellone S (2008) Inoculaciones con *Azospirillum brasilense* en producciones agrícolas del NOA. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 239-250.

Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx MC, Wood M (2004) Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1785-1792.

Benizri E, Amiaud B (2005) Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 37:2055-2064.

Bergey DH, Holt JG (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.

Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarini L (1998) Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 225-237.

Blaha D, Prigent-Combaret C, Sajjad MM, Moenne-Loccoz Y (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology* 56:455-470.

Blanke V, Renker C, Wagner M, Füllner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F (2005) Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist* 166:981–992.

Boddey RM, Baldani VL, Baldani JI, Döbereiner J (1986) Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant and Soil* 90:265-292.

Bollmann A, Laanbroek HJ (2001) Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiology Ecology* 37:211-221.

Bossio DA, Girvan MS, Verchot L, Bullimore J, Borelli T, Albrecht A, Scow KM, Ball AS, Pretty JN, Osborn AM (2005) Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology* 49:50-62.

Bothe H, Turnau K, Regvar M (2010) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza* 20:445–457.

Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP (1989) Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90:45-47.

Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:497-503.

Bruggen AHC van, Semenov AM (2000) In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15:13-24.

Bucher AE, Lanyon LE (2005) Evaluating soil management with microbial community-level physiological profiles. *Applied Soil Ecology* 29:59-71.

Buée M, De Boer W, Martin F, Overbeek L van, Jurkevitch E (2009) The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321:189-212.

Burris RH (1972) Nitrogen fixation-assay methods and techniques. *Methods in Enzymology* 24:415-431.

Caballero-Mellado J (2004) Uso de *Azospirillum* como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 45-49.

Caballero-Mellado J (2008) Optimización de la producción y evaluación de biofertilizantes a base de *Azospirillum* para el cultivo de Maíz y otras gramíneas: la 60 experiencia contemporánea de México. 1° International workshop on *Azospirillum*: Cell physiology, plant response and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-987-98475-8-9.

Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada de los Santos P, Martínez-Aguilar L (2007) The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5308–5319.

Calderini DF, Dreccer MF, Slafer GA (1995) Genetic improvement in wheat yield and associated traits. A re-examination of previous results and the latest trends. *Plant Breeding* 114:108-112.

Campbell CD, Grayston SJ, Hirst DJ (1997) Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 30:33-41.

Cappelletti JP, García de Salamone IE, Ventimiglia L (2004) Colonización rizosférica con bacterias microaerofílicas, longitud de raíces y rendimiento en grano de plantas *Zea mays* inoculadas con dos inoculantes comerciales de *Azospirillum* spp. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 201-205.

Carcaño-Montiel MG, Ferrera-Cerrato R, Pérez-Moreno J, Molina-Galán JD, Bashan Y (2006) Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24:493-502.

Cárcova J, Borrás L, Otegui ME (2004a) Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en maíz. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 133-163.

Cárcova J, Abeledo G, López Pereira M (2014b) Análisis de la generación del rendimiento: crecimiento, partición y componentes. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 75-87.

Carro L, Spröer C, Alonso P, Trujillo ME (2012) Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 35:73-80.

Casaretto E, Labandera C (2008) Respuesta de Maíz a la inoculación con *Azospirillum*. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 261-268.

Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y, Jurkevitch E (2007) Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 276:1-11.

Cassán FD, García de Salamone IE (2008) *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-987-98475-8-9.

Centeno A, Cortés E, Ciacci MB (2010) Evaluación de híbridos de maíz para grano campaña 2009-10. Hoja de información técnica del INTA-Proyecto Regional Agrícola Unidad de Extensión y Experimentación San Francisco. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_granos/29-informe-maices_graniferos_09-10.pdf

Chen Z, Luo X, Hu R, Wu M, Wu J, Wei W (2010) Impact of long-term fertilization on the composition of denitrifier communities based on nitrite reductase analyses in a paddy soil. *Microbial Ecology* 60:850-861.

Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, Kitts CL (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31:135-142.

Cocking EC (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil* 252:169-175.

Collins-Johnson N (1993) Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* 2:749-757.

Collins-Johnson N, Pflieger FL (1993) Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. En: Bethlenfalvay GJ, Linderman RG (eds.), *Mycorrhizae in sustainable agricultures*. ASA Special Publication, Madison, WI. Pp. 71-99.

Collins-Johnson N, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen EB (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology* 84:1895-1908.

Conn VM, Franco CMM (2004) Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1787-1794.

Corkidi L, Rowland DL, Johnson NC, Allen EB (2002) Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil* 240:299-310.

Cosme M, Wurst S (2013) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobacteria, soil phosphorus and plant cytokinin deficiency change the root morphology, yield and quality of tobacco. *Soil Biology and Biochemistry* 57:436-443.

Covacevich F, Echeverría HE, Aguirrezabal LAN (2007) Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization of field and glasshouse-grown spring wheat from Argentina. *Applied Soil Ecology* 35:1-9.

Creus CM, Pereyra MA, Molina-Favero C, Ramella NA, Casanovas EM, Pereyra CM, Arruebarrena-Di Palma A, Lamattina L, Sueldo RJ, Barassi CA (2008) La pared celular como target en la promoción del crecimiento de las plantas por *Azospirillum*. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 97-112.

Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany* 82:273-281.

Crozier A, Arruda P, Jasmim JM, Monteiro AM, Sandberg G (1988) Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum*. *Applied and Environmental Microbiology* 54:2833-2837.

Cummings SP (2009) The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environmental Biotechnology* 5:43-50.

Daane LL, Harjono I, Zylstra GJ, Häggblom MM (2001) Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2683-2691.

Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209.

Dardanelli J, Collino D, Otegui ME, Sadras OV (2004) Bases funcionales para el manejo del agua en los sistemas de producción de los cultivos de grano. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 377-440.

Day JM, Döbereiner J (1976) Physiological aspects on N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biology and Biochemistry* 8:45-50.

De Boer SH, Sasser M (1986) Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Canadian Journal of Microbiology* 32:796-800.

Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Duncan LC (2001) Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* 33:1143-1153.

Den Herder G, Van Isterdael G, Beeckman T, De Smet I (2010) The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science* 15:600-607.

Dennis Sprott G, Patel GB (1986) Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 7: 358-363.

Devereux R, He SH, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, Legall J, Whitman WB (1990) Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *Journal of Bacteriology* 172:3609-3619.

Díaz Zorita M, Duarte GA, Grove JH (2002) A review of no-till systems and soil management for sustainable crop production in the subhumid and semiarid Pampas of Argentina. *Soil and Tillage Research* 65:1-18.

Díaz Zorita M, Puente M, Peticari A (2004) Inoculación de trigo con *Azospirillum brasilense*: II. Aplicación combinada con fungicidas. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp.207-212.

Díaz Zorita M, Fernández Canigia MV (2008) Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 155-166.

Díaz Zorita M, Fernández Canigia MV (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology* 45:3-11.

Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S, Dalmastrì C (1997) Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4485–4493.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Di Salvo LP, García de Salamone IE (2012) Evaluation of soil-microbial communities by their CLPP. Standardization of a laboratory technique to replace commercial available microplates. *Ecología Austral* 22:129-136.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, VandeBroek A, Vanderleyden J (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 155-164.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-González C, Caballero-Mellado, J, Aguirre J, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:871–887.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Okon Y, Vanderleyden J (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils* 36:284-297.

Döbereiner J (1998) Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: Alef K, Nannipieri P (eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, California, USA. 576 pp.

Döbereiner J, Pedroza F (1987) Nitrogen-fixing bacteria in Non-leguminous crop plant. Brock/Spring. *Contemporary/Bioscience*.

Döbereiner J, Baldani VL, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa SPI. Brasília, Brasil.

Dodd JC, Jeffries P (1986) Early development of vesicular-arbuscular mycorrhizas in autumn-sown cereals. *Soil Biology and Biochemistry* 18:149-154.

Doornbos RF, Loon LC van, Bakker PAHM (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32:227-243.

Doran JW, Zeiss MR (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15:3-11.

Douds DD Jr., Schenck NC (1990a) Increased sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by manipulation of nutrient regimens. *Applied and Environmental Microbiology* 56:413-418.

Douds DD Jr., Schenck NC (1990b) Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist* 116:621-627.

Douds DD Jr., Galvez L, Franke-Snyder M, Reider C, Drinkwater LE (1997) Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 65:257-266.

Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:190–197.

Eckert B, Weber OB, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A (2001) *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:17-26.

Eid MMA, Sherwood JE (1995) Pulsed-field gel electrophoresis fingerprinting for identification of *Azospirillum* species. *Current Microbiology* 30:127-131.

Elbeltagy A, Ando Y (2008) Expression of nitrogenase gene (*nifH*) in roots and stems of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities. *African Journal of Biotechnology* 7:1950-1957.

Eller G, Frenzel P (2001) Changes in activity and community structure of methane oxidizing bacteria over the growth period of rice. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2395–2403.

Ellis JR, Roder W, Mason SC (1992) Grain sorghum-soybean rotation and fertilization influence on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal* 56:789-794.

El-Tarabily KA, Nassar AH, Sivasithamparam K (2008) Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Applied Soil Ecology* 39:161-171.

Engelen B, Meinken K, Von Wintzingerode F, Heuer H, Malkomes HP, Backhaus H (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2814-2821.

Esquivel-Cote R, Ramirez-Gama RM, Tsuzuki-Reyes G, Orozco-Segovia A, Huante P (2010) *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and Soil* 337:65–75.

Faggioli VS, Cazorla CR, Vigna A, Berti MF (2003) Fertilizantes biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Marcos Suárez, Argentina.
<http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/Suelos/fertbio07.pdf>

Fancelli S, Castaldini M, Ceccherini MT, Di Serio C, Fani R, Gallori E, Marangolo M, Miclaus N, Bazzicalupo M (1998). Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49:221-225.

Fani R, Bandi C, Bardin MG, Comincini S, Damiani G, Grifoni A, Bazzicalupo M (1993) RAPD fingerprinting is useful for identification of *Azospirillum* strains. *Microbial Releases* 1:217-221.

FAOSTAT (2012) Food and Agricultural commodities production.
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Ferraris G, Couretot L (2008) Respuesta a la aplicación de inoculantes, fertilizantes y fungicidas en trigo. *Agromercado Cuadernillo clásico de trigo* 144:25-26.

Ferraris G, Couretot L (2012) Caracterización y evaluación comparativa de cultivares de maíz en la localidad de Colón (Bs As). Campaña 2009/10. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino "Ing. Agr. Walter Kugler" UCT Agrícola Proyecto Regional Agrícola-CRBAN.
http://inta.gob.ar/documentos/caracterizacion-y-evaluacion-comparativa-de-cultivares-de-maiz-en-la-localidad-de-colon-bs-as.-campana-2011-12/at_multi_download/file/Caracterizaci.%C3%B3n_y_Evaluaci%C3%B3n_comparativa_en_Ma%C3%ADz_Col%C3%B3n_Camp2011_12.pdf

Ferreira L, Piatti FD (2011) Rendimiento y comportamiento agronómico de híbridos de maíz en INTA Manfredi, campaña 2010/11. Cartilla digital Manfredi.
http://inta.gob.ar/documentos/rendimiento-y-comportamiento-agronomico-de-hibridos-de-maiz-en-inta-manfredi.-campana-201011/at_multi_download/file/rendimiento%20comportamiento%20hibridos%20maiz.pdf

Fertilizar (2014a) Fertilizar asociación civil.
<http://www.fertilizar.org.ar/subida/Estadistica/Evolucion%20de%20Consumo%201990%202013/EvolucionConsumo1990-2013.pdf>

Fertilizar (2014b) Fertilizar asociación civil.

<http://www.fertilizar.org.ar/subida/Estadistica/Detalle%20de%20Consumo%20de%20Fertilizantes%20Extensivos/Consumo%20de%20Fertilizantes%20Cultivos%20Extensivos%20Campana%2012-13.pdf>

Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103:626-631.

Fisher SE, Fischer SI, Magris S, Mori GB (2007) Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:895–903.

Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76:1145-1152.

Franche C, Lindström K, Elmerich C (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil* 321:35-59.

Freitas JR de, Germida JJ (1990) Plant growth promoting bacteria for winter wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 36:265-272.

Freitas JR de, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24:358–364.

Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176:22-36.

Friesen ML, Porter SS, Stark SC, Wettberg EJ von, Sachs JL, Martinez-Romero E (2011) Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42:23-46.

Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernández A, Jiménez-Salgado T, Wang ET, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1305-1314.

Gamalero E, Glick BR (2011) Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. En: Maheshwari, D.K (ed.), *Bacteria in agrobiología: Plant nutrient management*. Springer 357 pp.

Garbaye J (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128:197-210.

García F (1999) Aspectos principales de siembra directa y los cultivos de soja y maíz en Argentina. En: Conferência Anual da Revista Plantio Direto, IV. 21-32.

García de Salamone IE (2011) Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Editorial Revista Argentina de Microbiología* 43:1-3.

García de Salamone IE (2012a) Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamerica* 5:12-16. Internacional Plant Nutrition Institute (IPNI) ISSN: 2222-016X.

García de Salamone IE (2012b) Use of soil microorganisms to improve plant growth and ecosystem sustainability. En: Caliskan M (ed.), *The molecular basis of plant genetic diversity*. INTECH, Rijeka, Croatia. Open access: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/use-of-soil-microorganisms-to-improve-plant-growth-and-ecosystem-sustainability>. Pp. 233-258.

García de Salamone IE, Laballos N, Monzón de Asconegui MA (1990) Effect of inoculation with *Azospirillum* of wheat cv. Buck Pucara growing in field conditions. En: AIANBA (eds.), *Actas del II Congreso Nacional de Trigo*. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Pp. 101-110.

García de Salamone IE, Döbereiner J (1996) Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils* 21:193-196.

García de Salamone IE, Döbereiner J, Urquiaga S, Boddey RM (1996) Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biology and Fertility of Soils* 23:249–256.

García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47:404-411.

García de Salamone IE, Rorig M, Bordato F, Michelena R (2004) Actividad microbiana luego de la aplicación de compactación sobre un suelo Haplustol éntico bajo siembra directa. XVI y XII Congresos latinoamericano y colombiano de la ciencia del suelo. Cartagena de Indias, Colombia.

García de Salamone IE, Michelena R, Rodríguez A, Montemitoli I, Gatti S, Rorig M (2006) Ocurrencia de micorrizas vesículo arbusculares en plantas de maíz, soja y trigo en sistemas de siembra directa. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires 26:67-72.

García de Salamone IE, Monzón de Asconegui MA (2008) Ecofisiología de la respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en cultivo de cereales. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 209-226.

García de Salamone IE, Escobar Ortega J, Gatica M, Di Salvo L, Vilches MV, Zubillaga M, Urquiaga S (2009) Effect of *Azospirillum* inoculation on N-cycling microorganisms associated with rice and wheat crops. 16th Nitrogen Workshop, Torino, Italia.

García de Salamone IE, Di Salvo LP, Escobar Ortega JS, Boa Sorte MP, Urquiaga S, Dos Santos Teixeira KR (2010) Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. Plant and Soil 336:351-362.

García de Salamone IE, Funes JM, Di Salvo LP, Escobar Ortega JS, D'Auria F, Ferrando L, Fernandez Scavino A (2012) Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on the rhizosphere microbial communities and field crop production. Applied of Soil Ecology 61:196-204.

Gaur AC (1990) Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers (Gaur AC, ed). Omega Scientific publishers, New Delhi, India. Pp. 16-72.

Germida JJ, Siciliano SD (2001) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. Biology and Fertility of Soils 33:410–415.

Geolnta (2013) Suelos de Buenos Aires 1:50.00
http://geointa.inta.gov.ar/visor/?p=model_suelos_bsas

Gewin V (2010) An underground revolution. Nature 466:552-553.

Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. Soil Biology and Biochemistry 37:877-887.

Gillis M, Reinhold-Hurek B (1994) Taxonomy of *Azospirillum*. En: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, USA, pp. 1-14.

Gillis M, Tran Van V, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:274-289.

Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84:489-500.

Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.

Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 90:63-8.

Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119:329-339.

Goebel, E.M., Krieg, N.R., 1984. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology* 159:86-92.

Gómez E, Garland J, Conti M (2004) Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology* 26:21-30.

González M, Segat A, Conti M (2000) Reacción del suelo. En: Conti M (coord.), *Principios de edafología con énfasis en suelos argentinos*. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. Pp. 215-228.

González-Pasayo R, Martínez-Romero E (2000) Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:575-577.

González Sanjuan MF, Grasso AA, Bassi J (2013) Fertilizantes en Argentina - Análisis del Consumo. En: García FO, Correndo AA (eds.), *Simposio Fertilidad 2013: nutrición de cultivos para la intensificación productiva*. Libro en formato digital. ISBN 978-987-24977-4-3.

Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192-195.

Google Earth (2014). <https://www.google.es/intl/es/earth/index.html>

Govaerts B, Mezzalama M, Unno Y, Sayre KD, Luna-Guido M, Vanherck K, Dendooven L, Deckers J (2007) Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* 37:18-30.

Graham PH, Sadowsky MJ, Tighe SW, Thompson JA, Date RA, Howieson JG, Thomas R (1995) Differences among strains of *Bradyrhizobium* in fatty acid-methyl ester analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 41:1038-1042.

Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30:369-378.

Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, Fancelli S, Fani R (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiology Letters* 127:85-91.

Grichko VP, Glick BR (2001) Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1-9.

Gündisch C, Kirchhof G, Baur M, Bode W, Hartmann A (1993) Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. *Microbial Releases* 2:41-45.

Hartmann A (1988) Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Plant and Soil* 110:225-238.

Hartmann A, Baldani JI (2006) The genus *Azospirillum*. *Prokaryotes* 5:115-140.

Hartmann A, Burrell RH (1987) Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology* 169:944-948.

Hartmann A, Hurek T (1988) Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of General Microbiology* 134:2449-2455.

Hartmann A, Zimmer W (1994) Physiology of *Azospirillum*. En: Okon, Y. (Ed.), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, USA, pp. 15-40.

Hartmann A, Fu H, Burris RH (1986) Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology* 165:864-870.

Hayat R, Ahmed I, Sheirdil RA (2012) An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. En: Ashraf M, Öztürk M, Ahmad MSA, Aksoy A (eds.), *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Dordrecht. Pp. 557-579.

Hennecke H, Kaluza K, Thöny B, Fuhrmann M, Ludwig W, Stackebrandt E (1985) Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Archives of Microbiology* 142:342-348.

Herschkovitz Y, Lerner A, Davidov Y, Rothballer M, Hartmann A, Okon Y, Jurkevitch E (2005) Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50:277-288.

Hisinger P, Glyn Bengough A, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321:117-152.

Höflich G, Tauschke M, Kühn G, Werner K, Frielinghaus M, Höhn W (1999) Influence of long-term conservation tillage on soil and rhizosphere microorganisms. *Biology Fertility of Soils* 29:81–86.

Holguin G, Glick BR (2001) Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology Ecology* 41:281–288.

Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ, Bailey MJ (2008) Influence of plant development stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology* 65:193-201.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 331:413-425.

Hynes RK, Leung GCY, Hirkala DLM, Nelson LM (2008) Isolation, selection and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil and chickpea grown in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 54:248-258.

Ibekwe AM, Kennedy AC, Frohne PS, Papiernik SK, Yang C-H, Crowley DE (2002) Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology* 39:183-191.

Ibekwe AM, Poss JA, Grattan SR, Grieve CM, Suarez D (2010) Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biology and Biochemistry* 42:567-575.

Jarvis BDW, Tighe SW (1994) Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant and Soil* 161:31-41.

Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37:1-16.

Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48:1-13.

Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI, Azarova T, Makarova N, Lugtenberg B (2006) Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:250-256.

Kämpfer P, Lai WA, Arun AB, Young CC, Rekha PD, Martin K, Busse HJ, Chen WM (2012) *Paracoccus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the plant *Crossostephium chinense* (L.) Makino (Seremban). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:2750-2756.

Kandeler E, Böhm KE (1996) temporal dynamics of microbial biomass, xylanase activity, N-mineralisation and potential nitrification in different tillage systems. *Applied Soil Ecology* 4:181-191.

Kapulnik Y, Okon Y, Kigel J, Nur I, Henis Y (1981) Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiology* 68:340-343.

Karthikeyan N, Prasanna R, Nain L, Kaushik BD (2007) Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *European Journal of Soil Biology* 43:23-30.

Katupitiya S, Millet J, Vesk M, Viccars L, Zeman A, Lidong Z, Elmerich C, Kennedy IR (1995) A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1987-1995.

- Kaushik R, Saxena AK, Tilak KVBR (2002) Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 35:92–95.
- Kaye JP, Hart SC (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology and Evolution* 12:139-143.
- Kennedy AC, Smith KL (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (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.
- Kent AD, Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews in Microbiology* 56:211-236.
- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science* 1:48-58.
- Kirchhof G, Schloter B, Aßmus B, Hartmann A (1997) Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 29:853-862.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.
- Klironomos JN (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292–2301.
- Koblížek M, Béjà O, Bidigare RR, Christensen S, Benitez-Nelson B, Vetriani C, Kolber MK, Falkowski PG, Kolber ZS (2003) Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Archives of Microbiology* 180:327-338.
- Koide RT, Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145-163.
- Koops HP, Purkhold U, Pommerening-Röser A, Timmermann G, Wagner M (2006) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Prokaryotes* 5: 778-811.

Kristin A, Miranda H (2013) The root microbiota -a fingerprint in the soil? *Plant and Soil* 370:671-686.

Kumar K, Goh KM (1999) Crop residues and management practices: effects on soil quality, soil nitrogen dynamics, crop yield and nitrogen recovery. *Advances in Agronomy* 68:197-319.

Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1485-1498.

Lal R (1997) Residue management, conservation tillage and soil restoration for mitigating greenhouse effect by CO₂ enrichment. *Soil and Tillage research* 43:81-107.

Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321:83-115.

Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderleyden J (2000) Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology* 8:298-300.

Lawlor K, Knight BP, Barosa-Jefferson VL, Lane PW, Lilley AK, Paton GI, McGrath SP, O'Flaherty SM, Hirsch PR (2000) Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. *FEMS Microbiology Ecology* 33:129-137.

Lawrence D, Heitefuss S, Seifert SH (1991) Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 29:1508-1512.

LeBauer DS, Treseder KK (2008) Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89:371-379.

Leyva LA, Bashan Y (2008) Activity of two catabolic enzymes of the phosphogluconate pathway in mesquite roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:898-904.

Li WJ, Xu P, Zhang LP, Tang SK, Cui XL, Mao PH, Xu LH, Schumann P, Stackebrandt E, Jiang CL (2003) *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1421-1425.

- Lin SY, Young CC, Hupfer H, Siering C, Arun AB, Chen WM, Lai WA, Shen FT, Rekha PD, Yassin AF (2009) *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 59:761-765.
- Lin SY, Shan FT, Young CC (2011) Rapid detection and identification of the free living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 99:837–844.
- Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Smith DI (2000) Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant and Soil* 221:157–166.
- Liu BR, Jia GM, Chen J, Wang G (2006) A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere* 16:18-24.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4516-4522.
- Loh WH, Randles CI, Sharp WR, Miller RH (1984) Intermediary carbon metabolism of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 158:264-268.
- Lovell CR, Piceno YM, Quattro JM, Bagwell CE (2000) Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3814-3822.
- Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJP, Gorby YA, Goodwin S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives in Microbiology* 159:336-344.
- Lu Y, Rosencrantz K, Liesack W, Conrad R (2006) Structure and activity of bacterial community inhabiting rice roots and the rhizosphere. *Environmental Microbiology* 8:1351–1360.
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antoine van Leeuwenhoek* 86:1-25.

Lukow T, Dunfield PF, Liesack W (2000) Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 32:241-247.

Lupwayi NZ, Arshad MA, Rice WA, Clayton GW (2001) Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil Ecology* 16:251-261.

Maas JL, Finney EL, Civerolo EL, Sasser M (1985) Association of an unusual strain of *Xanthomonas campestris* with apple. *Phytopathology* 75:439-445.

Maddonni GA, Ruiz RA, Vilariño P, García de Salamone IE (2004a) Fertilización en los cultivos para grano. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 499-557.

Maddonni GA, Vilariño P, García de Salamone IE (2004b) Dinámica de los nutrientes en el sistema suelo-planta. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 441-477.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, New York, USA. 9th. Edition.

MAGyP (2014) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Estimaciones agrícolas, series históricas. http://www.siaa.gob.ar/sst_pcias/estima/estima.php

Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M (2005) *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1759-1766.

Malusá E, Sas-Paszt L, Ciesielska J (2012) Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal* Volume 2012 Article ID 491206.

Mallik MAB, Williams RD (2008) Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. En: Zeng RS, Mallik AU, Luo SM (eds.), *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Pp. 321-345.

- Man de JC (1983) MPN tables, corrected. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17:301-305.
- Marchal K, Vanderleyden J (2000) The “oxygen paradox” of dinitrogen-609 fixing bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 30:363–373.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:795–799.
- Marschner P, Neumann G, Kania A, Weiskopf L, Lieberei R (2002) Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* 246:167-174.
- Marsh TL (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2:323-327.
- Martínez-Drets G, Del Gallo M, Burpee C, Burris RH (1984) Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by *Azospirilla*. *Journal of Bacteriology* 159:80-85.
- Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:115-124.
- Meyer JR, Linderman RG (1986) Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18:191-196.
- Miethling R, Ahrends K, Tebbe CC (2003) Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1405-1410.
- Miethling R, Wieland G, Backhaus H, Tebbe CC (2000) Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology* 41:43-56.

Minz D, Ofek M (2011) Rhizosphere microorganisms. En: Rosenberg E, Gophna U (eds.), Beneficial microorganisms in multicellular life forms. Springer, Verlag, Berlin. Pp. 105-121.

Miransari M (2011) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 89:917-930.

Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herdi GJ (1999) Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 65:3518-3525.

Mohammad MJ, Pan WL, Kennedy AC (1998) Seasonal mycorrhizal colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under dryland field conditions. Mycorrhiza 8:139-144.

Mollier A, Pellerin S (1999) Maize root system growth and development as influenced by phosphorous deficiency. Journal of Experimental Botany 50:487-497.

Morgan JAW, Bending GD, White PJ (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 56:1729-1739.

Müller T, Britta W, Wirtz A, Burkovski A (2006) Ammonium toxicity in bacteria. Current Microbiology 52: 400-406.

Muratova AY, Turkovskaya OV, Antonyuk LP, Makarov OE, Pozdnyakova LI, Ignatov VV (2005) Oil oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. Microbiology (Moscu) 74:210-215.

Muthukumar T, Udaiyan K (2000) Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. in relation to tissue nutrients and soluble carbohydrate in roots under field conditions. Biology and Fertility of Soils 31:114–120.

Muthukumar T, Udaiyan K, Rajeshkannan V (2001) Response of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) to indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing and asymbiotic nitrogen-fixing bacteria under tropical nursery conditions. Biology and Fertility of Soils 34:417–426.

Nakazawa F, Poco SE, Ikeda T, Sato IM, Kalfas S, Sundqvist G, Hoshinol E (1999) *Cryptobacterium curtum* gen. nov., sp. nov., a new genus of Gram-positive anaerobic rod isolated from human oral cavities. International Journal of Systematic Bacteriology 49:1193-1200.

Naiman AD, Latrónico AE, García de Salamone IE (2009) Inoculation of Wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology* 45:44-51.

Neher DA (1999) Soil community composition and ecosystem processes. Comparing agricultural ecosystems with natural ecosystems. *Agroforestry Systems* 45:159–185.

Neumann G, Römheld V (2007) The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. En: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds.), *The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA. Pp. 23-72.

Newman E (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology* 3:139-145.

Nogales B (2005) La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14:41-51.

Nur I, Steinitz YL, Okon Y, Henis Y (1981) Carotenoid composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. *Journal of General Microbiology* 122:27-32.

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2816–2824.

Ogbo F, Okonkwo J (2012) Some characteristics of a plant growth promoting *Enterobacter* sp. isolated from the roots of maize. *Advances in Microbiology* 2:368-374.

Okon Y (1994) *Azospirillum/plant associations*, CRC Press. Florida, USA.

Okon Y, Albrecht SL, Burris RH (1976) Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology* 127:1248-1254.

Okon Y, Labandera-González CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1591- 1601.

Okon Y, Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News* 63:366–370.

- Olubayi O, Caudales R, Atkinson A, Neyra C (1998) Differences in chemical composition between nonfloculated and floculated *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Microbiology 44:386-390.
- Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signaling and Behavior 4:701-712.
- Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environmental Microbiology 2:39-50.
- Øvreås L, Torsvik V (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microbiology Ecology 36:303-315.
- Paredes-Cardona E, Mascarua-Esparza MA, Caballero-Mellado J (1988) Response of maize to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Revista Latinoamericana de Microbiología 30(4):351-355.
- Paul EA, Clark FE (1996) Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego, USA.
- Pedraza RO, Ramírez-Mata A, Xiqui ML, Baca BE (2004) Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. FEMS Microbiology Letters 233:15-21.
- Pedraza RO, Motok J, Tortora ML, Salazar SM, Díaz Ricci JC (2007) Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. Plant and Soil 295:169-178.
- Pedraza RO, Bellone CH, Carrizo de Bellone S, Fernandes Boa Sorte PM, Teixeira KRS (2009) *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. European Journal of Soil Biology 45:36-43.
- Peixoto RS, Coutinho HLC, Madari B, Machado PLOA, Rumjanek NG, Van Elsas JD, Seldin L, Rosado AS (2006) Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian Cerrados. Soil and Tillage Research 90:16-28.
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118:10–15.

Pérez Fernández J (2011) Carbón común del maíz. INTA Estación Experimental Agropecuaria Anguil.

http://inta.gob.ar/documentos/carbon-comun-del-maiz/at_multi_download/file/carbonmaizcialp.pdf

Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV (2007) Plant-growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:1143–1150.

Peterson RL, Massicotte HB (2004) Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany* 82:1074-1088.

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-160.

Pisarska K, Adamski M, Pietr SJ (2011) Lack of *nifH* gene in some endophytic bacteria isolated on RC solid medium. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 76:699-704.

Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B (2011) Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in agrobiology: plant growth responses*. Springer, Verlag, Berlin. Pp. 295-343.

Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Jocteur Monrozier L (2001a) Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2255–2262.

Poly F, Jocteur Monrozier L, Bally R (2001b) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152:95-103.

Pongrac P, Vogel-Mikuš K, Kump P, Nečemer M, Tolrà R, Poschenrieder C, Barceló J, Regvar M (2007) Changes in elemental uptake and arbuscular mycorrhizal colonisation during the life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere* 69:1602–1609.

Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42:1-14.

Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK (2004) Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6:629–642.

Puente ML, García JE, Peticari A (2008) Investigación aplicada de *Azospirillum* para su uso como promotor del crecimiento en cultivos de interés agronómico. En: Cassán, F.C., García de Salamone, I.E. (Ed.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-987-98475-8-9. Pp. 167-178.

Rani A, Goel R (2012) Role of PGPR under different agroclimatic conditions. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics*. Springer, Verlag, Berlin. Pp. 169-183.

Ranjard L, Poly F, Nazaret S (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* 151:167-177.

Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23:515-531.

Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:43-51.

Reis FBD, Da Silva LG, Reis VM, Döbereiner J (2000a) Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:985-994.

Reis FBD, Reis VM, Urquiaga S, Döbereiner J (2000b) Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil* 219:153-159.

Reis FBD, Silva MF, Teixeira KRS, Urquiaga S, Reis VM (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28:103-113.

Reis VM, Teixeira KRS, Pedraza RO (2011) What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth-promoting bacteria?. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in agrobiología: plant growth responses*. Springer, Verlag, Berlin. Pp. 123-138.

Rengel Z (2002) Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* 245:59-70.

Ribeiro da Silva EM, Saggin-Júnior OJ (2004) Estrategias biológicas para la recuperación de áreas degradadas. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki S (eds.), *Biología del Suelo. Transformación de la materia orgánica. Usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. Pp. 13-16.

Rich SM, Watt M (2013) Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. *Journal of Experimental Botany* 64:1193–1208.

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339.

Ridzo (2015a) Análisis de campaña trigo 2011. Página de difusión de información generada por grupos CREA de la Zona Oeste. http://www.ridzo.com.ar/documentos_agricola/analisis_de_campania_trigo_2011.pdf

Ridzo (2015b) Base de datos genotipos maíz 2009/2010. Página de difusión de información generada por grupos CREA de la Zona Oeste. http://www.ridzo.com.ar/agricola_basededatos_resultados.html

Riggs PJ, Chelium MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:829–836.

Rillig MC, Wright SF, Eviner VT (2002) The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238:325-333.

Ritchie SW, Hanway JJ (1982) How a corn plant develops. Iowa State University. Special Report No. 48.

Robinson D (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127:635-674.

Rodríguez MB (2007) Caracterización de fertilizantes: propiedades determinantes de su calidad agronómica. En: Prystupa P (ed.), Tecnología de la fertilización de cultivos extensivos en la Región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. Pp. 1-31.

Rodríguez H, González T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91:552–555.

Rodríguez-Cáceres EA (1982) Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 44:990-991.

Rodríguez-Cáceres EA, Ciocco CD, Pacheco-Basurco JC (1996) Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia del Suelo* 14: 110-112.

Rodríguez-Cáceres EA, Di Ciocco CA, Carletti SM (2008) 25 años de investigación de *Azospirillum brasilense* Az 39 en Argentina. En: Cassán FC, García de Salamone IE (eds.), *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. Pp. 179-188.

Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319–339.

Roesch LRW, Olivares FL, Pereira Passaglia LM, Selbach PA, Saccol de Sá EL, Oliveira de Camargo FA (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.

Roesti D, Gaur R, Johri BN, Imfeld G, Sharma S, Kawaljeet K, Aragno M (2006) Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry* 38:1111-1120.

Romaniuk R, Giuffré L, Costantini A, Nannipieri P (2011) Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems *Ecological Indicators* 11:1345–1353.

Rubio R, Boriea F, Schalchli C, Castillo C, Azcón R (2003) Occurrence and effect of arbuscular mycorrhizal propagules in wheat as affected by the source and amount of phosphorus fertilizer and fungal inoculation. *Applied Soil Ecology* 23:245–255.

Ruíz-Sánchez M, Armada E, Munoz Y, García de Salamone IE, Aroca R, Ruíz-Lozano JM, Azcón R (2011) *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under wellwatered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 168:1031-1037.

Saito M, Oba H, Kojima T (2011) Effect of nitrogen on the sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing several gramineous plant species. *Soil Science and Plant Nutrition* 57:29-34.

Salantur A, Ozturk A, Akten S (2006) Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant, Soil and Environment* 52:111-118.

Salisbury FB, Ross CW (1991) Hormones and growth regulators: cytokinins, ethylene, abscisic acid, and other compounds. En: *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont, CA, USA. 4th edition. Pp. 382-407.

Sanguin H, Sarniguet A, Gazengel K, Moëgne-Loccoz Y, Grundmann GL (2009) Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. *New Phytologist* 184:694–707.

Sarabia Ochoa M, Madrigal Pedraza R, Martínez Trujillo M, Carreón Abud Y (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12:65-71.

Sarig S, Okon Y, Blum A (1990) Promotion of leaf area development and yield in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 9:235-245.

Sarita S, Priefer UB, Prell J, Sharma PK (2008) Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. *Current Science* 94:109-115.

Sawamura H, Yamada M, Endo K, Soda S, Ishigaki T, Ike M (2010) Characterization of microorganisms at different landfill depths using carbon-utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109:130-137.

Schalamuk S, Velázquez S, Chidichimo H, Cabello M (2006) Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 98:16–22.

Schalamuk S, Cabello M (2010) Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* 102: 261–268.

Schenk SU, Werner D (1988) Fatty acids analysis of four *Azospirillum* species reveals three groups. *Archives of Microbiology* 149:580-582.

Schlöter M, Dilly O, Munch JC (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98:255-262.

Sethunathan N, Yoshida T (1973) A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Canadian Journal of Microbiology* 19:873-875.

Shi W, Norton JM (2000) Microbial control of nitrate concentrations in an agricultural soil treated with dairy waste compost or ammonium fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1453-1457.

Siqueira JO, Saggin-Júnior OJ (2001) Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza* 11:245–255.

Sisti CPJ, Santos HP, Kochhann R, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM (2004) Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional and zero tillage in southern Brazil. *Soil and Tillage Research* 76: 39-58.

Skansi MM (2010a) Boletín climatológico. Boletín de vigilancia del clima en la Argentina y en la región subantártica adyacente. Volumen XXII N°12. Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=vigilancia&id=3>

Skansi MM (2010b) Boletín climatológico. Boletín de vigilancia del clima en la Argentina y en la región subantártica adyacente. Volumen XXII N°02. Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=vigilancia&id=3>

Skansi MM (2011a). Boletín climatológico. Boletín de vigilancia del clima en la Argentina y en la región subantártica adyacente. Volumen XXIII N°02. Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=vigilancia&id=3>

Skansi MM (2011b). Boletín climatológico. Boletín de vigilancia del clima en la Argentina y en la región subantártica adyacente. Volumen XXIII N°01. Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=vigilancia&id=3>

Slafer GA, Miralles DJ, Savin R, Whitechurch EM, González FG (2004) Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en trigo. En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 101-132.

Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69:470-479.

SMN (2014a) Boletines agrometeorológicos mensuales. Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=agro&id=6>

SMN (2014b) Datos estadísticos (período 1981-1990). Servicio Meteorológico Nacional. <http://www.smn.gov.ar/serviciosclimaticos/?mod=elclima&id=2>

Soares RA, Roesch LFW, Zanatta G, Oliveira Camargo FA, Passaglia LMP (2006) Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology* 33:221-234.

Söderberg KH, Olsson PA, Bååth E (2002) Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. *FEMS Microbiology Ecology* 40:223-231.

Steddom K, Menge JA, Crowley D, Borneman J (2002) Effect of repetitive applications of the biocontrol bacterium *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal on citrus soil microbial communities. *Biological control* 92:857-862.

Steinbach HS (2005) Funciones de producción. En: Alvarez R (coord.), Fertilización de cultivos de granos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina. Pp. 13-25.

Strzelczyk E, Kampert M, Li C (1994) Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research* 149:55-60.

- Subba Rao NS, Tilak KVBR, Singh CS (1985) Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant and Soil* 84:283-286.
- Sun YM, Zhang NN, Wang ET, Yuan HL, Yang JS, Chen WX (2009) Influence of intercropping and intercropping plus rhizobial inoculation on microbial activity and community composition in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Siberian wild rye (*Elymus sibiricus* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 70:218-226.
- Sylvia DM, Neal LH (1990) Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. *New Phytologist* 115:303-310.
- Taboada MA, Micucci FG (2004) Fertilidad física de los suelos. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires. 79 pp.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.
- 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.
- Tapay LM, Kogamata K (1989) Chemotaxonomy of gram negative, free-living nitrogen-fixing bacteria. *Philippine Agriculture* 72:353-365.
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 24:967-980.
- Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nüsslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13:109-122
- Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) *Applied and Environmental Microbiology* 37:1016-1024

- Tilman D (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5995–6000.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677.
- Tiwari P, Tripathi J, Ekka SR (2011) *Azospirillum* spp. isolated from Raigarh District of Chhattisgarh. *Journal of Phytology* 3:24-26.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 193:275–286.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO (2012) Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 356:279-290.
- Torsvik V, Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5:240-245.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Øvreås L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64:53-62.
- Trần Van V, Ngôkê S, Berge O, Hebbar P, Heulin T, Faure D, Bally R (1997) Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. *Canadian Journal of Microbiology* 43:486-190.
- Treseder KK (2004) A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164:347-355.
- Treseder KK (2008) Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters* 11:1111–1120.
- Treseder KK, Allen MF (2002) Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* 155:507-515.
- Trindade AV, Siqueira JO, Pinto de Almeida F (2001) Dependência micorrízica de variedades comerciais de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36:485-1494.

Tripathi AK, Verma SC, Ron EZ (2002a) Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. *Research in Microbiology* 153:579–584.

Tripathi AK, Nagarajan T, Vema SC, Le Rudulier D (2002b) Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. *Current Microbiology* 44:363-367.

Urquiaga S, Jantalia CP, Alves BJR, Boddey RM (2004) Importancia de la FBN en el secuestro de carbono en el suelo y en la sustentabilidad agrícola. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone IE, Miyazaki SS (eds.), *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp.1-6.

Vallone P, Gudelj V, Galarza C, Yanacon E, Masiero B (2012) Ensayos comparativos de rendimiento de maíz. Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez. <http://inta.gob.ar/documentos/ensayos-comparativos-de-rendimiento-de-maiz.-campana-2011-2012/>

Väisänen RK, Roberts MS, Garland JL, Frey SD, Dawson LA (2005) Physiological and molecular characterisation of microbial communities associated with different water-stable aggregate size classes. *Soil Biology and Biochemistry* 37:2007-2016.

Vázquez MM, César S, Azcón R, Barea JM (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15:261-272.

Verhagen FJM, Laanbroek HJ (1991) Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3255-3263.

Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Lavakush, Singh V (2010) Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research* 5:954-983.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586.

Wang X, Pan Q, Chen F, Yan X, Liao H (2011) Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza* 21:173–181.

Westby CA, Cutshall DS, Vigil GV (1983) Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 156:1369-1372.

Willis A, Rodrigues BF, Harris PJC (2013) The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences* 32: 1-20.

Windauer LB, Gil A, Guglielmini AC, Benech-Arnold RL (2004) Bases para el control y manejo de enfermedades en cultivo para granos. (651-683). En: Satorre E, Benech-Arnold R, Slafer GA, Fuente EB de la, Miralles DJ, Otegui ME, Savin R (eds.), *Producción de granos. Bases funcionales para su manejo*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 653-683.

Widmer F, Fließbach A, Laczkó W, Schulze-Aurich J, Zeyer J (2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA- and Biolog™ -analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1029-1036.

Wieland G, Neumann R, Backhaus H (2001) Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5849-5854.

Winding A, Hund-Rinke K, Rutgers M (2005) The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62:230-248.

Wu L, Ma K, Lu Y (2009) Pervallence of betaproteobacterial sequences in *nifH* gene pools associated with roots of modern rice cultivars. *Microbial Ecology* 57:58-68.

Xu Y, Wang G, Jin J, Liu J, Zhang Q, Liu X (2009) Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biology and Biochemistry* 41:19-925.

Xue D, Yao HY, Ge DY, Huang CY (2008) Soil microbial community structure in diverse land use systems: a comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses. *Pedosphere* 18:653-663.

Yasuda M, Isawa T, Shinozaki S, Minamisawa K, Nakashita H (2009) Effect of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73:2595–2599.

Ying JY, Zhang LM, He JZ (2010) Putative ammonia oxidizing bacteria and archaea in an acidic red soil with different land utilization patterns. *Environmental Microbiology Reports* 2:304-312.

Young CC, Hupfer H, Siering C, Ho MJ, Arun AB, Lai WA, Rekha PD, Shen FT, Hung MH, Chen WM, Yassin AF (2008) *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. International Journal of Evolution Microbiology 58:959-963.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for growth stage of cereals. Weed Research 14: 415-421.

Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? Ecology 84:2042-2050.

Zak HC, Willig MR, Moorhead DL, Wildman HG (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology and Biochemistry 26:1101-1108.

Zhang Y, Burris RH, Ludden PW, Roberts GP (1997) Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters 152:195-204.

Zhu W, Wang S, Caldwell CD (2012) Pathways of assessing agroecosystem health and agroecosystem management. Acta Ecologica Sinica 32:9-17.

Zimmer W, Bothe H (1989) The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. En: Skinner FA, Boddey RM, Fendrik I (eds.), Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. Pp. 137-146.

Anexo 1

A continuación se listan los medios de cultivo y soluciones utilizadas en este trabajo, en orden de aparición en el trabajo.

- Solución fisiológica (SF) estéril:

NaCl.....9,0 g
Agua destilada.....1000 ml
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio agar nutritivo más glucosa (TYG) (Leyva y Bashan, 2008):

Glucosa.....5,0 g
Peptona de carne.....5,0 g
NaCl.....5,0 g
Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio Nfb semiólido (Nfb ss) para microorganismos MFN (Adaptado de Döbereiner, 1998):

Ácido málico.....5,0 g
KH₂PO₄.....4,0 g
K₂HPO₄ (Solución al 10%).....5,0 ml
MgSO₄.7H₂O (Solución al 10%).....2,0 ml
NaCl (Solución al 10%).....1,0 ml
CaCl₂ (Solución al 1%).....2,0 ml
Solución de micronutrientes.....2,0 ml
Solución de vitaminas.....1,0 ml
FeCl₃ (Solución al 0,0015%).....1,0 ml
BTA (0.5% en KOH 0.2M).....2,0 ml
Agua destilada.....llevar a 1000 ml
KOH.....4,5 g
Agar.....1,75 g
Ajustar pH a 6.5 – 6.8 con KOH
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

Solución de micronutrientes

CuSO₄.5H₂O.....0,40 g
ZnSO₄.7H₂O.....0,12 g
H₂BO₄.....1,40 g
Na₂MoO₄.2H₂O.....1,00 g
MnSO₄.H₂O.....1,50 g
Agua destilada.....llevar a 1000 ml

Solución de vitaminas

Biotina.....	10 mg
Piridoxal-HCl.....	20 mg
Agua destilada.....	llevar a 100 ml

- Medio de cultivo para microorganismos celulolíticos, adaptado de Alef (1998):

CINH ₄	0,3 g
NaNO ₃	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,3 g
CaCl ₂	0,1 g
FeCl ₃ (Solución al 1,5%).....	1,0 ml
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml
Verificar pH y ajustar a 7.0	
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.	

- Medio de cultivo para microorganismos nitrificadores, adaptado de Alef (1998):

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl.....	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Solución al 1,0%).....	2,0 ml
CaCO ₃	3,0 g
Solución de micronutrientes.....	2,0 ml
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml
Verificar pH y llevar con KOH a 7.6	
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.	

Solución de micronutrientes

CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,40 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,12 g
H ₂ BO ₄	1,40 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	1,00 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	1,50 g
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml

- Medio de cultivo para comunidades microbianas (Di Salvo y García de Salamone, 2012):

Medio basal

K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
CaCl ₂	0,1 g
FeSO ₄	5,0 ml
MnSO ₄	0,25 ml
NaMoO ₄	0,25ml

Agua destilada.....llevar a 1000 ml

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

Colorante indicador redox

Violeta de tetrazolio.....0,0025 g

Agua destilada.....100 ml

Esterilizar por filtración.

Solución de cada una de las fuentes carbonadas

Fuente carbonada.....0,2 g o 0,2 ml

Agua destilada.....llevar a 100 ml

Esterilizar por filtración.

Listado de fuentes de carbono utilizadas: arginina, ácido glutámico, celobiosa, ácido cítrico, glicina, tween 20, glicerina, ácido benzoico, manitol, ácido málico, ácido salicílico, ácido oxálico, ácido láctico, dextrosa, maltosa, fenilalanina, prolina, ramnosa, xilosa, fructosa, histidina, putrescina, ácido itacónico.

- Medio Nfb líquido o sólido para microorganismos MFN (Adaptado de Döbereiner, 1998).
Misma composición que el medio Nfb ss anteriormente descrito pero con el agregado de CINH₄ 1g L⁻¹ y diferente cantidad de agar (0 o 15 g L⁻¹, respectivamente).
- Medio Rojo Congo (RC) (Rodríguez-Cáceres, 1982).

Ácido málico.....	5,0 g
K ₂ HPO ₄ (Solución al 10%).....	5,0 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (Solución al 10%).....	2,0 ml
NaCl (Solución al 10%).....	1,0 ml
Extracto de levadura.....	0,5 g
FeCl ₃ (Solución al 0,0015%).....	1,0 ml
Rojo Congo (Solución acuosa 1:400).....	15,0 ml
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml
KOH.....	4,0 g
Agar.....	15,0 g

Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Ajustar pH a 7.0
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio LGI semisólido (LGIss; adaptado de Döbereiner, 1998).

Sacarosa.....5,0 g
K₂HPO₄.....0,2 g
KH₂PO₄.....0,6 g
CaCl₂.2H₂O.....0,002 g
MgSO₄.7H₂O.....0,2 g
Na₂MoO₄.2H₂O.....0,002 g
FeCl₃.....0,01 g
Azul de Bromotimol (BTA; Solución al 0,5% en KOH 0,2M).....2,0 ml
Agar.....1,75 g
Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Ajustar pH a 6.0
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio JNfb semisólido (JNfb ss; adaptado de Döbereiner, 1998).

Ácido málico.....5,0 g
K₂HPO₄.....1,5 g
CaCl₂.2H₂O.....0,02 g
MgSO₄.7H₂O.....0,2 g
Solución de micronutrientes.....2,0 ml
Solución de vitaminas.....1,0 ml
FeEDTA (Solución al 1,64%).....0,01 g
Azul de Bromotimol (BTA; Solución al 0,5% en KOH 0,2M).....2,0 ml
Agar.....1,75 g
Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Ajustar pH a 6.0
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.
Solución de vitaminas y micronutrientes: ver medio de cultivo Nfb ss.

- Medio LG sacarosa semisólido (LGsac ss; adaptado de Döbereiner, 1998).

Sacarosa.....20,0 g
K₂HPO₄.....0,05 g
KH₂PO₄.....0,15 g
CaCl₂.2H₂O.....0,01 g

MgSO₄.7H₂O.....0,2 g
 Na₂MoO₄.2H₂O.....0,002 g
 FeCl₃.....0,01 g
 Azul de Bromotimol (BTA; Solución al 0,5% en KOH 0,2M).....2,0 ml
 Agar.....1,75 g
 Agua destilada.....llevar a 1000 ml
 Ajustar pH a 6.5
 Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio LG glucosa semisólido (LGglu ss; adaptado de Döbereiner, 1998).

Glucosa.....20,0 g
 K₂HPO₄.....0,05 g
 KH₂PO₄.....0,15 g
 CaCl₂.2H₂O.....0,01 g
 MgSO₄.7H₂O.....0,2 g
 Na₂MoO₄.2H₂O.....0,002 g
 FeCl₃.....0,01 g
 Azul de Bromotimol (BTA; Solución al 0,5% en KOH 0,2M).....2,0 ml
 Agar.....1,75 g
 Agua destilada.....llevar a 1000 ml
 Ajustar pH a 6.5
 Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio LG sacarosa sólido (LGsac; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio LGsac ss, pero con 15 g L⁻¹ de agar.
- Medio LG glucosa sólido (LGglu; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio LGglu ss, pero con 15 g L⁻¹ de agar.
- Medio Nfb sólido con agarosa (Nfb agarosa; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio Nfb sólido, pero con 15 g L⁻¹ de agarosa ultrapura, en lugar de agar.
- Medio Nfb semisólido con agarosa (Nfb ss agarosa; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio Nfb ss, pero con 1,75 g L⁻¹ de agarosa ultrapura, en lugar de agar.
- Medio LG glucosa sólido con agarosa (LGglu agarosa; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio LGglu sólido, pero con 15 g L⁻¹ de agarosa ultrapura, en lugar de agar.

- Medio LG agarosa (LG agarosa; adaptado de Döbereiner, 1998): misma composición que el medio LGglu ss, pero sin ninguna fuente de carbono en el medio de cultivo (ni glucosa ni sacarosa), y con 15 g L⁻¹ de agarosa ultrapura, en lugar de agar.
- Medio mínimo semisólido para evaluación de la actividad de la enzima nitrogenasa (adaptado del medio MM de González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000).

Glicerol.....	5 ml
Ácido málico.....	2,5 g
K ₂ HPO ₄	20,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	20,0 g
KH ₂ PO ₄	100,0 g
NaCl.....	20,0 g
Solución de elementos traza.....	1 ml
Fe-Citrato (solución 0,5 g L ⁻¹).....	10 ml
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml

Ajustar pH a 7.0

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

Agregar:

Biotina (Solución de 10mg ml⁻¹; esterilizada por filtración).....1 ml

CaCl₂ (Solución de 1g 100 ml⁻¹; esterilizada por autoclave).....10 ml

Solución de elementos traza

H ₃ BO ₃ .7H ₂ O.....	2,86 g
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	2,03 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,22 g
CuSO ₄ .5.H ₂ O.....	0,08 g
H ₂ MoO ₄ .H ₂ O.....	0,08 g
Agua destilada.....	llevar a 1000 ml

- Medio agar Pikovskaya (Gaur, 1990):

Extracto de levadura.....	0,5 g
Dextrosa.....	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KCl.....	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0001 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,0001 g
Agar.....	15,0 g

Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Ajustar pH a 7.0
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

- Medio agar cromo azurol sulfonato (CAS) (Tortora *et al.*, 2011):

Solución A

CAS.....60,5 mg
FeCl₃.6H₂O (Solución 1mM en 10 mM HCl).....10,0 ml
Agua destilada.....50,0 ml

Solución B

Bromuro de hexadecilmetilamonio (HDTMA).....72,9 mg
Agua destilada.....40,0 ml

Mezclar los 60 ml de la solución A y los 40 ml de la solución B.

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

Dejar enfriar y mezclar con 900 ml de medio Nfb sólido.

Adicionar 30,24 g de PIPES (ácido 1,4-piperazina-dietanosulfónico) y 12 g de NaOH (solución 50% en agua) para ajustar el pH a 6.8.

- Medio Nfb líquido para la determinación de producción de compuestos indólicos. Misma composición que el medio Nfb semisólido anteriormente descrito pero sin agregado de agar ni de BTA, y con cloruro de amonio (1 g L⁻¹) o triptófano (200 µg mL⁻¹) como fuente de nitrógeno.

Reactivo Salkowski (Gordon y Weber, 1951)

FeCl₃ (Solución 0,5M en 60 ml de H₂SO₄ concentrado)..... 3 ml
Agua destilada.....100 ml

- Medio Nfb líquido para la determinación de de la actividad ACC desaminasa. Misma composición que el medio Nfb semisólido anteriormente descrito pero sin agregado de agar ni de BTA, y con 150 µl de solución de ACC (0,0505 g ml⁻¹).

- Medio DYGS (modificado de Eckert *et al.*, 2001):

Glucosa.....2,0 g
Ácido málico.....2,0 g
Peptona de carne.....1,5 g
Extracto de levadura.....2,0 g
Ácido glutámico.....1,5 g
K₂HPO₄.....0,5 g
MgSO₄.7H₂O.....0,5 g
Agua destilada.....llevar a 1000 ml
Ajustar pH a 6.8
Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 20 min.

Anexo 2

A continuación se incluyen las fotos de las ubicaciones geográficas y las cartas de suelo de los ensayos realizados.



Figura 1. Detalle de la imagen satelital del lote de ensayo de trigo en la localidad de Villa Moll. Fuente: Google Earth (2014).

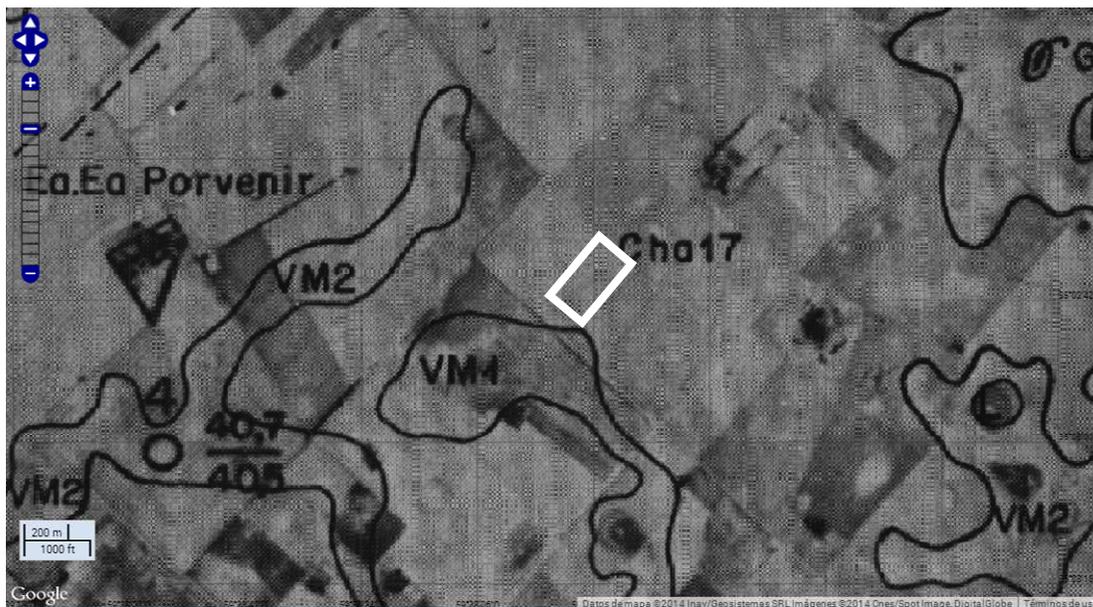


Figura 2. Lote de ensayo de trigo en la localidad de Villa Moll ubicado sobre la Carta de Suelos escala 1:50000. Fuente: Geolnta (2013).



Figura 3. Imagen satelital de lotes de ensayos de trigo (A) y maíz (B) en la localidad de 30 de Agosto. Fuente: Google Earth (2014).



Figura 4. Detalle de la imagen satelital del lote de ensayo de trigo en la localidad de 30 de Agosto. Fuente: Google Earth (2014).

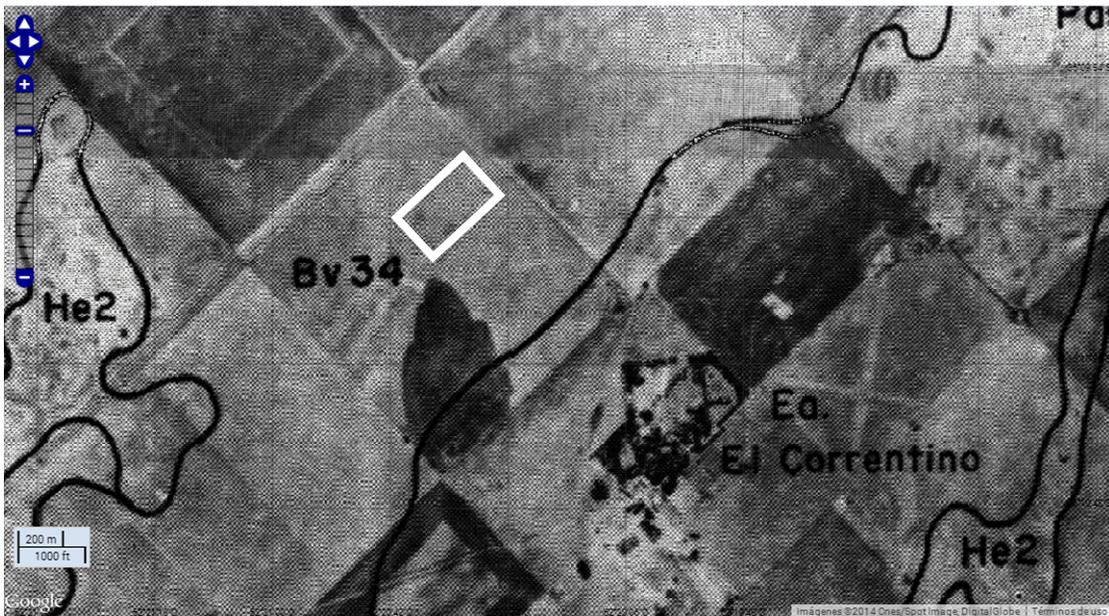


Figura 5. Lote de ensayo de trigo en la localidad de 30 de Agosto ubicado sobre la Carta de Suelos escala 1:50000. Fuente: Geolnta (2013).



Figura 6. Detalle de la imagen satelital del lote de ensayo de maíz en la localidad de Pehuajó. Fuente: Google Earth (2014).



Figura 7. Lote de ensayo de maíz en la localidad de Pehuajó ubicado sobre la Carta de Suelos escala 1:50000. Fuente: Geolnta (2013).



Figura 8. Detalle de la imagen satelital del lote de ensayo de maíz en la localidad de 30 de Agosto. Fuente: Google Earth (2014).

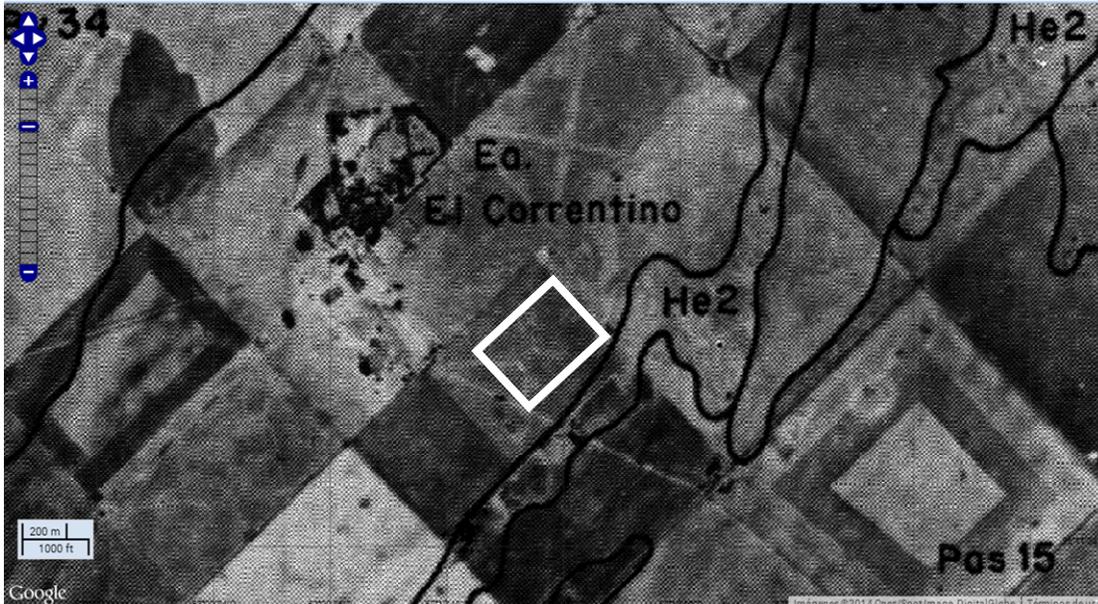


Figura 9. Lote de ensayo de maíz en la localidad de 30 de Agosto ubicado sobre la Carta de Suelos escala 1:50000. Fuente: Geolnta (2013).

Hoja de Firmas

.....

Ing. Agr. Luciana P. Di Salvo

Doctorando

.....

Dra. Inés E. García de Salamone

Directora



.....

Dra. Ana Fernández Scavino

Codirectora

.....

Dr. Alberto Gurni

Consejero de Estudios