

“Competencia por ocupación nodular de cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* y su influencia en la producción del cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.)”

Trabajo Final de Grado

del alumno



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....

“Competencia por ocupación nodular de cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* y su influencia en la producción del cultivo de arveja (*Pisum sativum. L.*)”

Trabajo Final de Grado
del alumno

ESTEFANIA SUSANA BIONDINI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

Lucas Antonio
Gallarato

Co-Director

Gustavo Gonzalez
Anta

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

Agradecimientos

Deseo expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron con la realización de ese trabajo:

A Gustavo Gonzalez Anta, director de esta tesis, por darme la oportunidad de poder trabajar con el tema que me interesaba, por abrirme las puertas de Rizobacter y por guiarme en el tema.

A Lucas Gallarato, codirector de esta tesis, por ayudarme en todo momento con la realización de este trabajo, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa del mismo.

A Damián, personal de Rizobacter, por ayudarme con los trabajos en cámara de crecimiento.

A mi familia por brindarme los recursos y el apoyo para continuar con la carrera.

A Leandro por la comprensión, paciencia y el ánimo recibido en todo el camino que recorrí hasta cumplir esta meta.

A mis amigos de Guerrico por el apoyo continuo.

A mis compañeros de la Unnoba, con los que compartí todos los días de cursada.

A todos ellos, muchas gracias.

Índice

I.RESUMEN.....	1
II.INTRODUCCIÓN	3
II.1.FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO	4
II.1.1.El nitrógeno.....	4
II.1.2. Fijación biológica del nitrógeno.....	4
II. 1.3. Microorganismos protagonistas	5
II. 1.4. Importancia ecológica	5
II.2. TAXONOMÍA DE LOS RIZOBIOS	6
II.2.1. Enfoque polifásico.....	6
II.2.2. Descripción del género <i>Rhizobium</i>	6
II.2.3. ERIC-PCR	7
II.3. SIMBIOSIS RHIZOBIUM- LEGUMINOSA.....	7
II.3.1.Mecanismo y etapas	7
II.4. LA FAMILIA LEGUMINOSAE	9
II.4.1. Características generales	9
II.4.2.Descripción del cultivo de arveja.....	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
III. 1. Cepas utilizadas.....	12
III. 2. Material vegetal.....	12
III. 3. Instalación de los ensayos de arveja en cámara de crecimiento	12
III. 3. 1. Características de la vermiculita.....	13
III. 4. Recolección de nódulos y determinación de diferentes parámetros	13
III. 5. Aislamientos bacteriológicos.....	14

III. 6. Caracterización genética de los aislamientos	14
III. 6. 1. Extracción de ADN.....	14
III. 6. 2. ERIC-PCR.....	15
III. 7. Análisis de la información	15
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
IV. 1. Ensayos en cámara de crecimiento.....	17
IV. 1. 1. Componentes del rendimiento analizados en arveja	20
IV. 1. 2. Perfiles ERIC-PCR	23
V. CONCLUSIÓN	28
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	30

I. Resumen

El proceso a través del cual los microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno, y es la opción natural de fertilización química. Las bacterias que llevan a cabo este proceso son de gran interés para la agricultura, ya que se emplean como inoculantes. Un ejemplo de esta tecnología son los inoculantes producidos en base a *Rhizobium* que establecen simbiosis con las leguminosas. La arveja tiene un tipo de nodulación inespecífica, es decir puede que los nódulos en las raíces están formados por cepas de *Rizobium* naturalizadas en el suelo, con alta capacidad de colonización de las raíces, ya que se encuentran adaptadas a las condiciones ambientales propias del suelo pero con baja capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Esto perjudica el establecimiento de las cepas introducidas a través del inoculante.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad de ocupación nodular de diferentes cepas inoculadas comparadas con la población nativa de rizobios del suelo en el cultivo de arveja. Se evaluó la nodulación de cinco cepas, en macetas rellenas de suelo proveniente de la localidad Alpachiri, La Pampa; y además se analizó el potencial de cada cepa en un medio libre de microorganismos para poder medir los componentes del rendimiento del cultivo. Se obtuvo el patrón molecular de las diferentes cepas a través del método ERIC-PCR. Los resultados demostraron que este método es útil para genotipificar bacterias y se pudo ver en qué casos estaban presentes los microorganismos nativos en los nódulos y en qué casos solo se notó la presencia de las cepas introducidas mediante la inoculación.

II. Introducción

II.1.FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

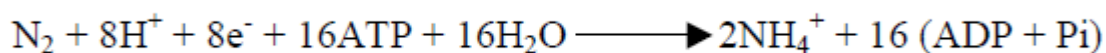
II.1.1.El nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para todos los organismos. Después del carbono, es el elemento más abundante en las células. Es un nutriente limitante en el crecimiento vegetal, ya que además de ser poco abundante en el suelo, es removido por causas naturales en cantidades superiores a otros nutrientes. En la capa superior del suelo, se encuentra disponible entre un 0,02-0,04% y puede alcanzar hasta un 2% en suelos ricos de materia orgánica. En la naturaleza se encuentra fundamentalmente como gas, pero a pesar de su gran abundancia - dada la gran estabilidad de la molécula en su estado gaseoso - las plantas y animales son incapaces de fijarlo y aprovecharlo, debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno (N₂). Esto hace a la molécula inerte, y solo puede ser desdoblada por microorganismos altamente especializados. Estos son capaces de fijar ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables (Russelle y Birr, 2004).

Para ser utilizado en el crecimiento, el nitrógeno debe ser primero reducido y luego fijado en la forma de iones amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻). El proceso a través del cual los microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como fijación biológica de N (FBN), el mismo no solo permite utilizar el N sino también reducir o revertir la degradación del suelo. (Allan y Graham, 2002).

II.1.2. Fijación biológica del nitrógeno

La FBN es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los microorganismos fijadores de N, el cual cataliza la conversión del N₂ al NH₄⁺, bajo la siguiente reacción:



Lo que requiere grandes cantidades de poder reductor y de energía como ATP. La enzima consta de dos componentes:

- El componente I o nitrogenasa propiamente dicha, se caracteriza por poseer un cofactor de hierro (FeMo) que forma parte del centro activo. Debido a este cofactor se la denomina también molibdoferroproteína. Esta proteína se halla codificada por los genes *nifD* y *nifK*.
- El componente II o nitrogenasa reductasa posee átomos de hierro acomplejados con el azufre de determinadas cisteínas, por lo cual frecuentemente recibe el nombre de ferroproteína. Esta codificada por el gen *nifH*.

El proceso de transformación de N a su forma asimilable pasa por una serie de etapas:

Los electrones para la reducción llegan al complejo por medio de una ferredoxina, que los transfiere al componente II. El complejo queda así reducido y por cada dos electrones transferidos se hidroliza una molécula de ATP. La nitrogenasa reductasa reducida, el complejo II, se asocia con la nitrogenasa, componente I y le transfiere los electrones. Una vez reducida la molibdoferroproteína, esta transfiere los electrones y los protones al N hasta convertirlo en dos moléculas de amonio. Uno de los aspectos más destacables de esta enzima es su sensibilidad frente al oxígeno, de modo que queda rápida e irreversiblemente inactivada por este gas. Entonces se plantea un conflicto de interés. Por un lado las bacterias deben mantener la concentración de oxígeno a un nivel que no perjudique a la nitrogenasa y por otro lado, la concentración de este gas debe ser apropiada para que se pueda llevar a cabo la fosforilación oxidativa, que se encarga de suministrar al ATP a la nitrogenasa. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ha desarrollado una solución que permite la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno a través de dos mecanismos. El primero de ellos se denomina, barrera de difusión del nódulo, formada por una capa de células con pocos espacios intercelulares y que limita el córtex interno. El segundo mecanismo lo constituye la leghemoglobina, ferroproteína asociada a la membrana que rodea al bacteroide, que al interconvertirse entre su forma oxidada y reducida, regula el suministro de oxígeno a la bacteria, proporcionando una concentración adecuada. Al final de todo el proceso, el amonio se asimila mediante la formación de glutamato y glutamina (Bergersen, 1997). El amonio es inhibidor de la síntesis de nitrogenasa, por lo que es imperativa su rápida asimilación.

II.1.3. Microorganismos protagonistas

Entre los organismos involucrados se encuentran bacterias, algas verde-azules (cianobacterias) y actinomicetos. Las bacterias fijadoras de N son componentes importantes del suelo y requieren una fuente de energía química si no son fotosintéticas, las cuales a su vez utilizan la energía de la luz solar. Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse: anaerobias obligadas o facultativas, aerobias obligadas y fotosintéticas. Las bacterias aeróbicas dependen fuertemente de condiciones de humedad, oxígeno y materia orgánica y las anaeróbicas son predominantes en suelos anegados donde existen las condiciones de humedad y materia orgánica pero el oxígeno es reducido.

II.1.4. Importancia ecológica

Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la FBN, aportando la mayor parte del N combinado en la tierra, y permite a las plantas de la familia de las *Fabaceae* –leguminosas- crecer sin la necesidad de la utilización de fertilizantes nitrogenados. El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en leguminosas podría

ocasionar graves problemas de contaminación. La FBN es la opción natural de fertilización química. Estas bacterias son de gran interés para la agricultura, ya que se emplean como inoculantes (biofertilizantes). Un ejemplo de esta tecnología son los inoculantes producidos en base a *Rhizobium*, que fue el primer género bacteriano que se desarrolló a gran escala y se ha añadido como inoculante durante 105 años a diversos cultivos agrícolas. La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de la producción agrícola, cuidar el ambiente y por ende lograr un desarrollo agrícola sostenible, obliga a profundizar los estudios con bacterias que nodulan las raíces de leguminosas. La carencia de equipos y tecnologías adecuadas para caracterizar y clasificar a los rizobios limitaron el avance del conocimiento científico. En la actualidad, la taxonomía de este género se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos, y no se pueden adelantar estudios de tipo genético si no se han identificado sus propiedades fenotípicas (Bécquer, 1998). Se estima que los rizobios no conocidos en el mundo representan un recurso biológico muy importante, ya que las leguminosas son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y que se encuentran distribuidas en distintos ecosistemas (Bécquer, 2004). En los últimos años se ha incrementado el número de especies y géneros de rizobios porque se han analizado leguminosas que no se habían estudiado y porque la metodología para clasificar bacterias es más poderosa.

II.2. TAXONOMÍA DE LOS RIZOBIOS

II.2.1. Enfoque polifásico

En 1888 Beijerinck obtiene un cultivo bacteriano puro, a partir de un nódulo de una raíz de una leguminosa y llama a la bacteria *Bacillus radicícola*. Posteriormente Frank propone el nombre de *Rhizobium* para estos aislados. Más adelante utilizando métodos de biología celular y molecular (hibridación ADN-ADN y ADN-rARN) se dividen los rizobios en dos géneros: *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. En la actualidad a través de estudios comparativos del ADN_{rS16} es posible agrupar a los rizobios en al menos siete géneros: *Devosia*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*.

La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia.

II.2.2. Descripción del género *Rhizobium*

Los rizobios se encuentran dentro del orden Eubacteriales y la familia *Rhizobiaceae*. Son bacilos de 0,5 a 0,9 nm de ancho y 1,2 a 3,0 nm de longitud, Gram negativas y no

esporulantes. Son móviles debido a la presencia de flagelos. Las colonias suelen ser blancas o color beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas (Paredes, 2013). Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Hay trece especies definidas dentro del género: *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. tropici* y *R. yanglingense*. Estas especies nodulan diferentes especies de leguminosas.

II.2.3.1.ERIC-PCR

La caracterización genética por comparación de patrones genéticos específicos de cepas de *Rizobium* generados por ERIC-PCR es ampliamente utilizada desde hace un tiempo (Laguerre *et al.*, 1996) para diferenciar cepas dentro de este género. En esta técnica se amplifican regiones repetitivas específicas que luego analizadas en geles de agarosa permiten diferenciar patrones de bandas específicos para cada cepa. Se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el genoma de muchas bacterias. Se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado.

II.3. SIMBIOSIS RHIZOBIUM- LEGUMINOSA

II.3.1.Mecanismo y etapas

La relación simbiótica entre estas bacterias y las leguminosas es la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz. Los nódulos son órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular por parte de los rizobios y de las plantas (Gibson *et al.*, 2008). El establecimiento de una simbiosis rizobio-leguminosa eficiente es un proceso que comienza con un intercambio de señales entre ambos organismos: las raíces de la planta liberan flavonoides, moléculas que promueven la expresión en las bacterias de los genes *nod*, lo cual origina la síntesis y secreción de lipo-oligoquitinas llamadas factores Nod (Geurts *et al.*, 2005). Los genes que codifican estos factores no se expresan sino existe la señal inductora adecuada de la planta. Éstas son percibidas por la raíz a nivel de pelos radicales de la planta, la cual experimentará diversos cambios dependiendo del tipo de leguminosa (Bauer y Mathesius,

2004). La infección avanza a través de los pelos radicales produciendo una deformación de los mismos que origina un cambio en la dirección del crecimiento, produciéndose en el extremo apical una curvatura de mismo dejando que algunas de las bacterias queden recluidas en el interior de la curvatura. Estas bacterias inducen una degradación local de la pared celular de la planta (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008), la membrana plasmática se invagina y los rizobios entran en su interior. Una vez dentro de las células de la planta, las células bacterianas se dividen y se diferencian a bacteroides. La planta aporta fuentes de carbono para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, éste le aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Lodwig y Poole, 2003). Para que tenga lugar la reducción de N_2 , el ambiente debe ser microaerobio, ya que la enzima es muy sensible al O_2 . La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno la lleva a cabo la leghemoglobina, una proteína monomérica con gran afinidad por este gas. La misma es sintetizada por la planta y posee la función de aportar O_2 a los bacteroides y de controlar sus niveles. Se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides y es la que confiere el típico color rojo o rosado de los nódulos funcionales dado por un núcleo férrico en su sitio activo. Esta característica en los nódulos es un parámetro de la capacidad de los mismos para la FBN (Díaz Alcántara, 2012). La energía requerida por las bacterias para desarrollar este proceso proviene de los carbohidratos del suelo cuando los microorganismos son de vida libre, de los exudados radiculares para aquellos asociados en la rizósfera de una planta o directamente de los productos de la fotosíntesis de la planta huésped cuando existe una simbiosis (Paredes, 2013). En este caso, los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N_2 . El primer producto estable que se obtiene de la fijación de N_2 es el amonio, y su asimilación para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radicales lo lleva principalmente la planta. Pero también se puede asimilar en los bacteroides y puede ser transferido a la planta en forma de alanina (Wang *et al.*, 2001).

Además de la asimilación de N atmosférico, a través de la simbiosis con bacterias formadoras de nódulos, las especies leguminosas utilizan para su nutrición mineral el N proveniente del suelo o aplicado como fertilizante. En consecuencia, son tres las fuentes de N disponibles para el crecimiento de estas plantas y el llenado de sus semillas: mineral proveniente del suelo, atmosférico procedente de la fijación biológica y aquél movilizado desde órganos de acumulación temporaria en la propia planta (Luyindula y Weaver, 1989). Las ventajas de esta simbiosis son múltiples: 1. La planta puede autoabastecerse de

nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas. 2. Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas (ej.: praderas asociadas compuestas por gramíneas y leguminosas). 3. Puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el N. 4. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, seres humanos (Urzúa, 2000b).

II.4. LA FAMILIA LEGUMINOSAE

II.4.1. Características generales

La familia *Fabaceae* –leguminosa- es una de las más amplias del reino vegetal representando 18000 especies en 700 géneros aproximadamente. Su importancia económica es extraordinaria ya que incluye especies esenciales en la alimentación humana como es el caso de la arveja (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) o la lenteja (*Lens culinaris*), y la fuente por excelencia de proteína vegetal en raciones de animales y base de la economía argentina, la soja (*Glycine max*).

Son hierbas, arbustos o árboles, con gran diversidad de hábitats incluyendo plantas acuáticas y trepadoras. Las hojas son normalmente compuestas, rara vez son simples y a veces provistas de zarcillos. El ovario está formado por un único carpelo que da fruto en legumbre o vaina.

II.4.2. Descripción del cultivo de arveja

El cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.) es una especie anual, perteneciente a la familia de las fabáceas (*Fabaceae*), que en Argentina se cultiva en forma extensiva para abastecer a la industria y en forma intensiva para su consumo fresco. Del volumen total producido localmente, el 90% se destina a grano seco por el consumo interno y exportación. Desde el punto de vista tecnológico se conocen más de 50 variedades. Por lo general, se realiza bajo siembra directa y la protección del cultivo incluye terapicos de siembra de última generación, uso de inoculantes, fertilización balanceada, herbicidas residuales de amplio espectro y fungicidas para el control de enfermedades foliares. Las plantas de arvejas producen granos con alto valor proteico para lo cual es necesario un correcto aporte de N. Como se ha señalado anteriormente, este aporte puede ser provisto por nódulos fijadores de N atmosférico. Sin embargo, el cultivo de arveja desarrolla un tipo de nodulación inespecífica, es decir, tiene capacidad de formar nódulos con diferentes especies de *Rhizobium*, a

diferencia de otros cultivos como soja, que forma nódulos exclusivamente con cepas de la especie *Brayrhizobium japonicum*. Esta característica del cultivo de arveja, compartido por otras leguminosas como lenteja, garbanzo, frijol por mencionar algunas, brinda la particularidad de que en muchos casos los nódulos en las raíces del cultivo están formados por cepas de *Rhizobium* naturalizadas en el suelo, con alta capacidad de colonización de las raíces pero baja habilidad para fijar N atmosférico. De allí la importancia de la inoculación con cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* con alta eficiencia y competitividad con las cepas naturalizadas presentes en el suelo. Para ello es clave una buena inoculación con cepas de calidad, en un proceso cuidado (Prieto, 2011).

Las legumbres invernales fueron cultivadas durante mucho tiempo en regiones hortícolas, en establecimientos pequeños que utilizan como práctica habitual aplicaciones de fertilizantes foliares y tratamientos hormonales mayormente con girebelinas, aunque no se han reportado incrementos significativos por su utilización (Prieto, 2012). Las leguminosas suelen ser cultivos sensibles a la aplicación de fertilizantes en línea de siembra, los cuales retrasan la emergencia, disminuyen el stand de plantas y perjudican el establecimiento de nódulos (Ferraris y Couretot, 2014).

La capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno por diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* inoculados sobre semilla de Arveja es una característica dependiente de la cepa y determinante en la productividad del cultivo. Bajo esta hipótesis este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad de ocupación nodular de las diferentes cepas inoculadas comparadas con las de rizobios naturalizados de los suelos.

III. Materiales y métodos

III. 1. Cepas utilizadas:

Los tratamientos de inoculación se realizaron con 5 cepas diferentes de *Rizobium leguminosarum* que se describen a continuación:

- D – 70 (INTA – IMYZA, Argentina)
- 3841 (origen Fundación Instituto Leloir)
- SEMIA 3007 (FEPAGRO, Brasil)
- FQ-1
- USDA 2370(USDA, Estados Unidos)

III. 2. Material vegetal

Para realizar los ensayos se utilizaron semillas de arvejas de variedad Facón tratadas con inoculantes formulados en junio de 2016.

Las semillas fueron llevadas al laboratorio, colocadas en bolsas plásticas, separadas por tratamientos y se les agregó 4 ml/kg de inoculante con una jeringa estéril.

III. 3. Instalación de los ensayos de arveja en cámara de crecimiento

Se realizaron dos clases de ensayos:

1) El primero con el objetivo de evaluar la ocupación nodular de las diferentes cepas, en competencia con las cepas naturales del suelo. Este fue realizado con macetas con suelo de Alpachiri, localidad situada en la provincia de La Pampa. Este suelo cuenta con una población nativa de cepas que son capaces de nodular en las raíces del cultivo de arveja. Se realizaron seis tratamientos con siete repeticiones. Las cinco cepas a evaluar más un tratamiento testigo sin inoculación. Se utilizaron macetas rellenas de suelo con una semilla de arveja previamente inoculada con la cepa correspondiente, a excepción del tratamiento testigo. Las macetas fueron rotuladas con los nombres de cada cepa.

2) El segundo ensayo se realizó con el objetivo de evaluar distintos parámetros de crecimiento sobre cada planta de arveja según la cepa aplicada al momento de la inoculación, por lo que se utilizó vermiculita (mix estéril), para evitar la contaminación con la población nativa del suelo. Se evaluó:

-Longitud de raíz

- Número de nódulos
- Peso seco de nódulos

El material vegetal de ambos ensayos se incubó en una cámara de luz artificial con lámparas fluorescentes reguladas automáticamente para el control del fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de 6000-8000 lux, una temperatura de 24-25°C y una humedad relativa del 60%. Fueron regados con agua desmineralizada filtrada.

III. 3.1. Características de la vermiculita

La vermiculita es un mineral de origen micáceo, compuesto por silicato hidratado de aluminio, magnesio y potasio; que se procesa en hornos a temperaturas de 600 - 900 °C para su expansión. Al calentarse, su tamaño original aumenta de 6 a 20 veces adquiriendo la apariencia de un gusano de piedra (de allí su nombre: Vermiculita). Esta rara virtud de expansión se debe a que sus cristales no se encuentran bien unidos entre sí por su contenido de agua, la que al ser sometida a un proceso térmico adecuado, se evapora provocando la dilatación de las láminas, formando una estructura “porosa” y laminar constituida por espacios vacíos de variadas dimensiones, cerrados por superficies reflectantes, que le confieren su poder aislante térmico, acústico, absorbente e ignífugo, y lo convierte en un material inalterable, inerte y estable. La Tabla 1 muestra el análisis de la muestra.

Tabla 1. Características de la vermiculita

Color del mineral	Granulado marrón claro/oscuro
Asbestocidad	No posee asbestos ni material fibroso
Densidad aparente	100 kg/m³ ±10
Ph	8-9
Temperatura de quemado	680-720°C
Capacidad de absorción	205 ml (agua) en 50 grs. Vermiculita expandida.
Incombustible y químicamente estable a altas temperaturas	
No produce ninguna reacción sobre el hierro o el acero	
Es insensible a los agentes atmosféricos y al paso del tiempo	

III. 4. Recolección de nódulos y determinación de diferentes parámetros

Trascurridos los 40 días, se recolectaron las raíces, se les retiró el suelo suelto de las mismas y se dejaron secar sobre papel madera. Luego se prosiguió con el aislamiento de los nódulos, los cuales se iban retirando de la raíz a la que estaban afirmados. Los nódulos del

primer ensayo (suelo de Alpachiri) se empaquetaron y se dejaron secar en bolsas de papel madera para su posterior análisis sobre ocupación nodular. Las bolsas fueron correctamente identificadas con el nombre de cada cepa que se utilizó para inocular a las semillas. Los nódulos del segundo ensayo se contaron para poder determinar el número por raíz de los mismos. Luego se los colocó en tubos de ensayo y se los dejó secar en horno a 65 °C durante 48 horas para poder determinar el peso seco en cada tratamiento y repetición. Además se midió la longitud de cada raíz. Para esto se colocó la raíz estirada sobre la mesada y se midió con un centímetro. Una vez transcurridas las 48 hs de secado, se determinó el peso de los nódulos.

III. 5. Aislamientos bacteriológicos

Se desinfectaron superficialmente los nódulos de cada tratamiento del primer ensayo (suelo de Alpachiri) por sumersión en una solución de alcohol etílico comercial al 70%, durante 30 segundos. Se enjuagaron con agua desmineralizada estéril. Se maceraron en regulador de fosfatos salino (PBS) pH 8, hasta obtener partículas muy pequeñas y se extrajo la mayor cantidad posible de bacterias. Luego se agitó durante 2 horas a 120 rpm y a temperatura ambiente.

III. 6. Caracterización genética de los aislamientos

III. 6. 1. Extracción de ADN

Se transfirió 1.5 mL de la suspensión anterior a un tubo Eppendorf nuevo y se resuspendió. Se descartó el sobrenadante. Luego se agregó 600 µl de buffer de lisis y se mezcló, se incubó durante 10 minutos a 80°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Cuando la temperatura descendió, se agregó 3 µl de RNA (10 mg/ml) y se incubó a 37° C por 30 minutos. Posteriormente se agregó 200 µl de solución de precipitación proteica y se incubó en hielo por 20 minutos. Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo y descartó el precipitado. Se agregó 600 µl de isopropanol y se mezcló. Se volvió a centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos y a descartar el sobrenadante. Se agregó 500 µl de etanol al 70% (en agua), se mezcló y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos y descartó nuevamente el sobrenadante. Luego se dejó secar el pellet por 4 – 6 horas en estufa a 37°C, cuando no se percibió restos de etanol, se resuspendió la muestra en agua calidad miliQ.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando el oligonucleótidos ERIC2.

III. 6. 2. ERIC-PCR

Se emplearon los cebadores E1 (5'- ATGTTAGCTCCTGGGGATTAC – 3') y E2 (5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Valencia y Gómez, 2012).

Con la siguiente mezcla de reacción:

Buffer 5X	2.4 µl
dNTPs 2 Mm	1.2 µl
Cebadores E1, E2 10 µM	0.75 µl c/u
ADN molde	3.5 µl
H2O bidestilada estéril	3.27
Taq polimerasa (5 U/µl)	0.132

Volumen de reacción de la PCR fue de 12µl. Las amplificaciones se realizaron con el siguiente ciclo de temperaturas:

95°C	1 min	} X35
94°C	1 min	
52°C	1 min	
65°C	8 min	
68°C	16 min	

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1-2% conteniendo TBE 0.5X, empleando buffer de siembra. Las corridas electroforéticas se realizaron a 75 V en cubas de electroforesis. Los geles fueron teñidos con Gel Green (Biotium) y visualizados en azul. Se incluyeron marcadores de peso molecular de 1Kb. Las imágenes de los geles fueron registradas fotográficamente.

III. 7. Análisis de la información

Las experiencias fueron realizadas en diseños aleatorizados y los valores representan las medias de tres repeticiones. Los datos se analizaron empleando el test de ANOVA con una comparación múltiple de variables por el test de LSD Fisher considerando diferencia significativa un nivel de P=0,05. Todos los análisis estadísticos se evaluaron con el software InfoStat.

IV. Resultados y discusión

IV. 1. Ensayos en cámara de crecimiento

Una correcta inoculación es clave en el cultivo de arveja, ya que tiene una capacidad de fijación de nitrógeno muy alta, de hasta 185 kg N ha^{-1} . Cuando el suelo presenta una baja población naturalizada, el inoculante puede expresar su potencialidad, ya que estos microorganismos compiten en la formación de nódulos con las cepas inoculadas y pueden ocupar mayor proporción de los mismos (Torresani *et al.*, 2012). Con el objetivo de evaluar el potencial de cada inoculante se midieron diferentes parámetros de las plantas de arveja en ensayos realizados en vermiculita, libre de poblaciones naturalizadas de bacterias.



Fig 1. La foto muestra el material preparado antes de la siembra, los inoculantes y las semillas de arveja.



Fig 2. Arveja recién sembrada en macetas rellenas de vermiculita.



Fig 3. Plantas de arveja a los 20 días de crecimiento en vermiculita.



Fig 4. Arveja en cámara de crecimiento.



Fig 5. Ensayo en vermiculita correspondiente a la cepa USDA 2370, al día de la extracción de los nódulos.



Fig 6. Medición de las raíces.

IV. 1. 1. Componentes del rendimiento analizados en arveja

Para analizar los diferentes parámetros que están relacionados al rendimiento de la arveja, tales como el peso seco de los nódulos, el número de los mismos y la longitud de las raíces de cada planta, se realizaron seis tratamientos con siete repeticiones, los cuales consistieron en las cinco cepas a evaluar más el tratamiento testigo, libre de inoculación. Este ensayo se realizó con macetas rellenas de vermiculita (Mix estéril) y una semilla de arveja por maceta, las cuales fueron previamente inoculadas con la cepa correspondiente, salvo el tratamiento testigo. La tabla 2 muestra los tratamientos realizados y los títulos correspondientes a cada cepa que se utilizó para inocular.

Tabla 2. Tratamientos con los recuentos de bacterias.

TRATAMIENTO	UFC/ml
Testigo	-
D – 70	3,40 E+09
3841	4,45 E+09
SEMIA 3007	1,90E+09
FQ-1	5,50 E+09
USDA 2370	5,90E+09

Trascurridos los 40 días, una vez limpias las raíces de las plantas de arveja, se procedió a analizar los diferentes parámetros mencionados anteriormente. En la tabla 3 se analiza el número de nódulos. Los tratamientos que presentaron los mayores valores de número de nódulos fueron las plantas tratadas con FQ-1 y USDA 2370, las cuales presentaron diferencias significativas con 3841 y D-70 INTA.

Tabla 3. Número de nódulos/pl. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TRATAMIENTO	NÚMERO DE NÓDULOS/ PL		
	n	Media	D.E.
D-70 INTA	7	13,57	a
3841	7	15,29	a
SEMIA 3007	7	21,29	ab
USDA 2370	7	24,29	b
FQ-1	7	26	b

La Figura 7, muestra el mismo resultado que la tabla anterior, analizando el número de nódulos en base a los tratamientos efectuados. Las barras más altas corresponden a los

tratamientos con mayor número de nódulos. Los tratamientos que poseen letras diferentes presentan diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).



Fig 7. Gráfico de barras para el número de nódulos planta⁻¹. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la tabla 4 se pueden observar los valores de peso seco de los nódulos. Al igual que en el número de nódulos, los tratamientos FQ-1 y USDA 2370 presentaron los valores más altos, observándose diferencias significativas con las plantas tratadas con las cepas D-70 INTA y 3841. Lo mismo se puede observar a través del gráfico de la Figura 8.

Tabla 4. Peso seco de nódulos/pl. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TRATAMIENTO	PESO SECO DE NÓDULOS/PL (MG)			
	n	media		D.E.
3841	7	9,14	a	3,72
D-70 INTA	7	9,57	ab	6,05
SEMIA 3007	7	12	abc	5,86
USDA 2370	7	15,14	bc	6,28
FQ-1	7	16,57	c	3,99



Fig 8. Gráfico de barras para el peso seco de los nódulos/pl. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la tabla 5, se analiza la longitud de la raíz. El tratamiento inoculado con la cepa USDA 2370 presentó el mayor valor de longitud de raíz observándose diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento D-70 INTA.

Tabla 5. Longitud de raíz. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TRATAMIENTO	LONGITUD DE RAÍZ (CM)		
	n	media	D.E.
D-70 INTA	7	24,96	a
SEMIA 3007	7	26,57	ab
FQ-1	7	27,14	ab
3841	7	27,29	ab
USDA 2370	7	32,29	b

El gráfico de la Figura 9 muestra la longitud de la raíz para los diferentes tratamientos, corroborando los resultados de la tabla anterior. Los tratamientos que poseen letras diferentes presentan diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

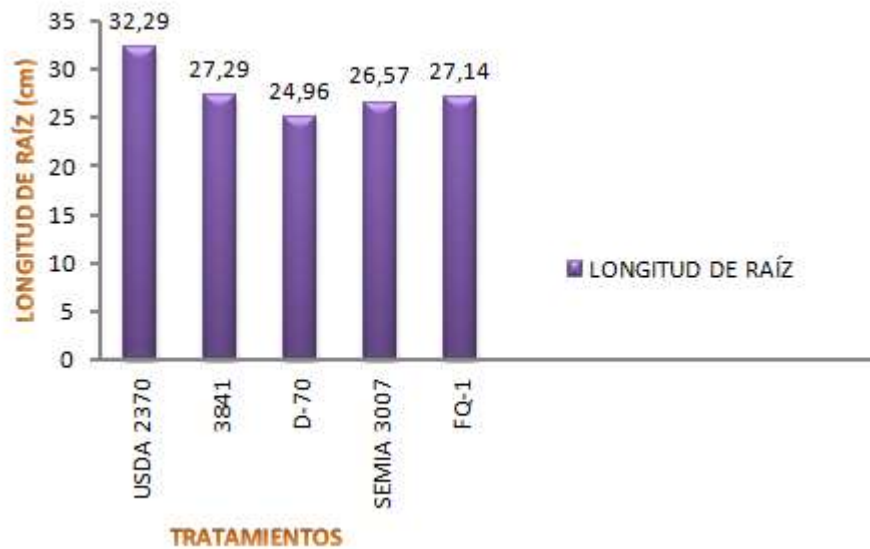


Fig 9. Gráfico de barras para la longitud de la raíz. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

IV. 1. 2. Perfiles ERIC-PCR

Para evaluar la ocupación nodular se realizó el ensayo con el suelo de la localidad Alpachiri, que cuenta con la población de rizobios naturales. Una vez retirados y lavados los nódulos, se obtuvieron los perfiles o patrones moleculares de las cepas utilizadas de *R. leguminosarum* y de los aislamientos de nódulos. Cada perfil obtenido mediante el protocolo de ERIC-PCR, presentó múltiples bandas de amplificación con resultados diferenciales y reproducibles. Con estos resultados se comprueba que ERIC-PCR, es un método altamente reproducible y una posible alternativa conveniente a los análisis RFLP. Llevan menos tiempo, son más adecuados para la identificación a gran escala y clasificación de colecciones bacterianas y para el estudio de grandes poblaciones a nivel intraespecífico. Los patrones moleculares ERIC-PCR obtenidos a partir de nódulos con respecto a las cepas de referencia fueron diferentes Figura 10 y 11. Para las cepas de referencia, se obtuvieron patrones con varios fragmentos al igual que paso con las muestras de los nódulos. Pero en algunos casos no se observaron las bandas pertenecientes a los microorganismos nativos. Este fue el caso de las muestras inoculadas con las cepas 3841 y D-70 INTA. Esto podría indicar posibles efectos inhibitorios sobre los microorganismos del suelo, aunque no sería la única explicación; puede que las cepas agregadas tengan una mayor movilidad, o una mayor tasa de división celular que los microorganismos nativos. En cambio, en las muestras inoculadas

con USDA 2370, SEMIA 3007 y FQ-1 también se pueden observar las bandas pertenecientes a los microorganismos nativos presentes en el suelo. La variabilidad genética de las cepas parece que se asocia principalmente con la adaptación, capacidad saprofita y competitividad.



Fig 10. Perfiles moleculares obtenidos por ERIC en cepas de *R. leguminosarum* a partir de cepas de referencia.

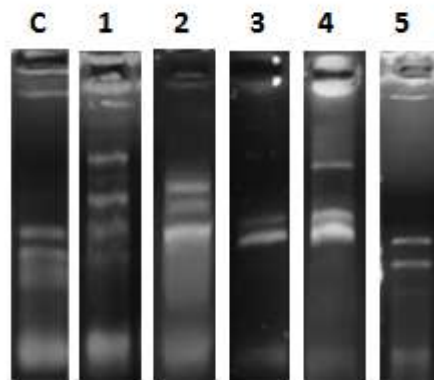


Fig 11. Perfiles moleculares obtenidos por ERIC en cepas de *R.leguminosarum* a partir de nódulos de los ensayos en cámara de crecimiento. C) Control (microorganismos nativos). 1) USDA 2370 y presencia de microorganismos nativos. 2) 3841. 3) D-70 INTA. 4) SEMIA 3007 y presencia de microorganismos nativos. 5) FQ-1 y presencia de microorganismos nativos.

El principal criterio para seleccionar cepas de rizobios para formular inoculantes es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, es necesario considerar otros

criterios, como la capacidad de las bacterias para formar nódulos, especialmente en presencia de rizobios nativos. En muchos casos la falta de respuesta en la inoculación se debe a la presencia en el suelo de este tipo de bacterias que son competitivas y muchas veces inefectivas (Weaver y Frederick, 1974). Otra posible causa podría ser el uso de inoculantes con bajo número de bacterias efectivas o a la especificidad del anfitrión. El éxito de la inoculación de las leguminosas depende de la capacidad competitiva del rizobio introducido para evadir la rizosfera, multiplicarse y competir con cepas homólogas en la formación de nódulos. La competencia se inicia desde el momento en que las bacterias se encuentran en el mismo ambiente hasta que se localizan dentro del nódulo (Amarger, 1984). Varios investigadores han estudiado cómo la capacidad de las cepas para competir por la ocupación del nódulo es afectada por el genotipo del hospedero. La incapacidad de las cepas introducidas que fijan el nitrógeno para competir con las cepas propias del suelo por la ocupación del nódulo es una limitante importante en el desarrollo de los inoculantes de *Rhizobium* (Snoeck *et al.*, 2003). En un trabajo realizado por la Facultad de Ciencias Agrarias de Zavalla, Santa Fe, junto con la AER Arroyo Seco y el INTA Oliveros, se evaluó el rendimiento del cultivo de arveja frente a la inoculación con diferentes formulaciones de inoculantes y fertilización con fósforo y azufre, en tres suelos diferentes, con respecto al cultivo antecesor, cantidad de fósforo, azufre y nitrógeno; y a la cantidad de rizobios viables en el suelo. En todos los casos se observó que cuando el suelo presenta una población baja de rizobios naturales, el inoculante puede expresar su potencialidad. Si bien no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en rendimiento en grano, la tendencia ha sido un mayor rendimiento a favor de la inoculación, lo que podría justificar la implementación de la práctica en este cultivo. La fertilización con fósforo resultó asimismo, de gran impacto en todos los parámetros evaluados (Toresani *et al.*, 2012). Al igual sucedió en un ensayo realizado en INTA Pergamino en la campaña 2012/13. En este caso, se evaluó el rendimiento de arveja frente a diferentes tratamientos: inoculación, inoculación más fósforo, inoculación más azufre, inoculación más fósforo y hormonas. También resultó la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno una práctica de muy buen impacto, y potenciada con la fertilización fosforada (Ferraris y Couretot, 2014).

Un estudio realizado en la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, logró autenticar la capacidad nodulativa de rizobios nativos y evaluar la frecuencia de la eficiencia en la nodulación de 50 cultivos aislados de nódulos radiculares de arveja, colectados en distintos departamentos de Perú. El 40% (20 cultivos) formaron nódulos en simbiosis con *Pisum sativum* var. Selección Junín, mientras que el 60% (30 cultivos) no fueron capaces de nodular en condiciones de laboratorio a la misma leguminosa. (Moreno Chirinos *et al.*, 2016). Una de las posibles formas de incrementar los rendimientos en las leguminosas mediante la explotación biotecnológica de *Rhizobium*, es la generación de genotipos que presenten una restricción por las cepas nativas y sean nodulados únicamente por la cepa inoculada. Otros

investigadores encontraron efectos significativos en los genotipos de soja (*Glycine max*) sobre la competitividad de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* estrechamente relacionadas. Un ejemplo de ello lo constituye la limitación de la nodulación del genotipo de soja PI417566 por la cepa USDA 129 resultando en una baja ocupación nodular mientras que al inocular este mismo genotipo con las cepas USDA 123 o con USDA 127 se obtuvieron buenos resultados en la nodulación total. De acuerdo con los primeros estudios reportados por (Amarger, 1984), la fijación del nitrógeno depende de la interacción de los rizobios con el cultivar. Esto enfatiza la importancia de examinar la interacción entre la diversidad de cepas nativas de rizobios con un cultivar nuevo, además de la influencia del genotipo de la planta en la nodulación y la efectividad en una especie determinada. (Cregan *et al.*, 1989). En un estudio realizado en La Plata, en la Facultad de Ciencias Exactas durante 2004, se observó que la presencia de poblaciones naturalizadas de rizobios competidores en diversos suelos, donde se ha cultivado soja durante varios años, constituye un formidable obstáculo para la efectividad con que los rizobios llevados por los inoculantes pueden ocupar un número significativo de nódulos, de modo que se manifieste plenamente su capacidad fijadora de nitrógeno. (López García, 2004). Estos resultados resaltan la importancia de la inoculación y el problema que, a la vez, se presenta cuando hay un suelo con mucha carga de rizobios nativos. Si bien en los resultados de este trabajo, los tratamientos que produjeron los mejores y más altos valores en los parámetros del rendimiento fueron en los que también se encontró la presencia de microorganismos nativos en los nódulos a través del análisis con la técnica ERIC-PCR. Se pudo contar un mayor número de nódulos de un tamaño considerado por raíz y un mayor peso seco de los mismos. Cada nódulo presenta una región central con células invadidas por bacteroides de *Rhizobium*, y una zona meristemática que agrega nuevas células, permitiendo al nódulo crecer y fijar nitrógeno indefinidamente. De ahí la importancia que tiene la formación de dichas estructuras ya que son fundamentales para que la fijación biológica de nitrógeno ocurra. Se pone, así, en evidencia la actividad de los microorganismos nativos del suelo, que podrían ser útiles para la generación de nuevos inoculantes mixtos, que tal vez podrían establecerse en el suelo y controlar a la microflora nativa del mismo, para que puedan predominar los microorganismos benéficos y mantener así las propiedades físicas y químicas del suelo. En un estudio de la universidad de Loja, Ecuador, se determinó el efecto de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación y rendimiento agrícola en dos variedades de fréjol común (*Phaseolus vulgaris L.*) en condiciones de campo. Los resultados demostraron el efecto beneficioso de la inoculación con las cepas *R. leguminosarum* respecto al número de nódulos totales y el peso seco de los nódulos con diferencias significativas entre los tratamientos. Tanto en el genotipo rojo como en el negro se evidenció presencia de nódulos en sus raíces, indicando que hubo compatibilidad en la interacción Rhizobium-Leguminosa y se determinó que los aislados utilizados influyeron positivamente en el crecimiento, desarrollo, fijación de N₂ y rendimiento agrícola para ambas variedades (Granda *et al.*, 2014).

Los procesos naturales de FBN juegan un importante rol en la activación de los sistemas agrícolas sustentables por su beneficio ambiental. El incremento de su aplicación puede mitigar la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos con su consiguiente efecto benéfico al ciclo del N, el calentamiento global y el saneamiento de las aguas subterráneas y superficiales. Estimular la aplicación de microorganismos diazotróficos, ya sean de vida libre como simbióticos, traerá consigo el incremento de las producciones agrícolas sin la utilización de elementos no renovables, disminución de los costos de producción y la reducción de las emisiones de gases con efecto invernadero.

V. Conclusión

En base a los resultados obtenidos es válido aceptar la hipótesis formulada en este trabajo aceptando que la inoculación de semillas de arveja con distintas cepas de *Rhizobium leguminosarum* modifica los parámetros del rendimiento y cada cepa posee una capacidad propia de formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

Podemos ratificar que los análisis de variabilidad genética usando el marcador ERIC son útiles para genotipificar bacterias, siendo aplicados con éxito para caracterizar intraespecíficamente a *R. Leguminosaum*.

El manejo adecuado de la tecnología de inoculantes a base de *Rhizobium* asegura el rendimiento de las leguminosas de manera ecológica.

VI. Bibliografía

- Allan, D y Graham, P. (2002). Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation.
- Amarger, N. (1984). Evaluation in competition in *Rhizobium* spp. Current perspectives in microbiology ecology. American Soc. Microbiol, Washington, D.C. p. 300-305.
- Bauer, W. D. y Mathesius, U. (2004). Plant response to bacterial quorum sensing signals. Curr Opin Plant Biol 7, 429-433.
- Bécquer, C.J. (1998). "Diversidad genética y posición taxonómica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras nativas en Sancti-Spíritus, Cuba", Tesis de Maestría, Universidad de La Habana.
- Bécquer, C.J. (2004). Descripción y clasificación de rizobios: Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales, Revista Biología, 18, 9.
- Bergersen, F.J. (1997). Plant Soil. 191: 189-203.
- Cregan, P.B., Keysey, H.H. y Sadowsky, M, J. (1989). Soybean genotype restricting nodulation of a previously unrestricted serocluster 123 bradyrhizobia. Cro Sci.29, 307-312.
- Díaz Alcántara, C. A. (2012). Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana.
- Ferraris, G. N. y Couretot, L. (2014). Experimentos de nutrición en el cultivo de arveja. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. UCT Agrícola. Proyecto Regional Agrícola. CRBAN.
- Geurts,R., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. Curr Opin Plant Biol 8, 346-352.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H. y Walker, G.C. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. Ann Rev Gen 42, 413-441.
- Granda, K., Tapia, M., Vasquez, V., Diaz, F.G. y Gutierrez, R. (2014). Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L).
- INTA. (1987). Recomendaciones prácticas para el cultivo de la arveja. 1-50. EEA INTA San Pedro.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier,P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois, L. y Amarger, N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Appl Environ Microbiol.
- Lodwig, E. y Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. Crit Rev Plant Sci 22, 37-38.
- López García, S.N. (2004). "Interacciones tempranas entre *Bradyrhizobium japonicum* y soja: efectos de la escasez de N y la distribución de los rizobios sobre la raíz."

Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas.

- Luyindula, N. y Weaver, R. (1989). Nitrogen partitioning in cowpea as influenced by rhizobial strain and mineral nitrogen. *Agronomy Journal* 81: 593-596.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Molina, E., Squartini, A., Orgambige, G., Hubbell, D. H. y Dazzo, F. B. (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can J Microbiol* 47, 475-487.
- Moreno-Chirinos, Z. E., Valdez-Núñez, R. A., Soriano-Bernilla, B. S. y Ruesta-Campoverde, N. A. (2016). Eficiencia en la nodulación por rizobios nativos, procedentes de nódulos de *Pisum sativum* "arveja" colectados de diferentes Departamentos del Perú.
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Prieto, G. (2011). Campo litoral. Edición 23/7/2011. Las legumbres ganan terreno entre los cultivos de invierno. Crece la superficie sembrada en Santa Fe.
- Prieto, G. (2012). El cultivo de arveja. Disponible en www.agroconsultasonline.com.ar
- Prieto, G. (2012). Pautas para el manejo del cultivo de arveja. AER INTA Arroyo Seco.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *PNAS*. 105, 7064-7069.
- Russelle, M. P. y Birr, A.S. (2004). Biological nitrogen fixation. Large-scale assessment of symbiotic dinitrogen fixation by crops: Soybean and alfalfa in the Mississippi river basin, *J. Agron.*, 96, 1754.
- Snoeck, C., Beebe, S. y Vanderleyden, J. (2003). Strategies for genetic improvement of common bean and rhizobia towards efficient Interactions. *Plant Breeding Rev* 23: 21-72.
- Toresani, S., Prieto, G., Salvagiotti, F., Vita, E., Tirelli, J.M. y Zari, F. (2012). Respuesta a la inoculación y a la nutrición con fósforo y azufre del cultivo de arveja en el sur de Santa Fe.
- Urzúa, H. (2000) b. Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una Agricultura Sustentable. Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Arequipa, Perú. p. 211-227.
- Valencia, R. A. y Gómez, L. Y. (2012). Caracterización molecular de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* J-01, J-96 y J-98, mediante protocolos rep-PCR.
- Wang, E.T.; Martínez Romero, J. & López Lara, I. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En: *Microbios*. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez

Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Weaver, R. y Frederick, L. (1974). Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max.*