

**COINOCULACIÓN DE MICORRIZAS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL  
CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DESDE LA GERMINACIÓN HASTA LOS  
PRIMEROS ESTADIOS VEGETATIVOS DEL DESARROLLO DEL CULTIVO DE MAÍZ**



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 26 de mayo de 2022

**COINOCULACIÓN DE MICORRIZAS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL  
CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DESDE LA GERMINACIÓN HASTA LOS  
PRIMEROS ESTADIOS VEGETATIVOS DEL DESARROLLO DEL CULTIVO DE MAÍZ**

Trabajo Final de Grado

del alumno

**COPPOLA LUCIANO**

Alejandra Gutiérrez

**Evaluador**

Alejandro Rossi

**Evaluador**

Mariana Alegre

**Evaluador**

González Anta Gustavo

**Director**

Díaz Marisa Celina

**Co-Directora**

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

Pergamino, 26 de mayo de 2022

## **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer a mi director Gustavo González Anta por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo, por toda la paciencia que me tuvo y estar presente ante cualquier necesidad.

A Marisa Díaz mi Co-Directora por estar siempre dispuestas a resolver mis dudas, enseñarme y guiarme durante la realización del trabajo de investigación. A Rizobacter por brindarme el espacio físico de sus instalaciones y colaboración del personal para este trabajo, a ellos por hacer de mi estadía en la empresa un espacio relajado, divertido y alegre a la hora de trabajar, y por brindarme su ayuda desinteresadamente.

Agradecerle a INDRASA BIOTECNOLOGIA, quienes también me brindaron el espacio físico para llevar a cabo mi trabajo de investigación, al personal, quienes me dieron una mano siempre que lo solicite, en especial a Lucas Gallarato quien me ayudo en la realización de los análisis estadísticos y bioinformáticos.

A Vanesa Silvani, Roxana Colombo y Alicia Godeas (Facultad de Ciencias Exactas UBA) quienes compartieron desinteresadamente su experiencia y práctica en observación de micorrizas.

A la UNNOBA, por permitirme formarme tanto a nivel profesional como personal, brindándome la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera universitaria de forma gratuita.

A compañeros y amigos que me dio la Universidad. Guille, Juli, Facu, Renzo, Lu, Mica, Kalu, Lupe. (Y alguno más que seguramente me olvide en este momento) Que de una u otra forma me ayudaron a cumplir este objetivo.

A mis amigos de la vida quienes me dieron esos momentos de apoyo cuando las cosas no iban como uno quería.

A mis hermanas y mi sobrino por estar presentes en todo el camino y ayudarme a despejar la mente cuando lo necesitaba.

Y como dice el refrán “lo mejor para el final”, a mi papa y mi mama, quienes apoyaron mis decisiones a lo largo de mi vida sin importar cuales fuesen, quienes estuvieron siempre presentes, ya sean momentos felices o momentos en los que solo su amor incondicional podía levantarme el ánimo, por siempre darme ese consejo o palabra de aliento para seguir adelante y cumplir mis objetivos.

**¡Gracias!**

# **Indice**

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	<b>16</b>
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>5.1 Puesta a punto de la metodología de siembra, riego y desarrollo del cultivo en Cone-tainer™</b> .....	<b>18</b>
<b>5.2 Elección del mejor sustrato</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3 Determinación de parámetros de calidad de inoculantes bacterianos</b> .....	<b>23</b>
<b>5.3.1 Recuento de bacterias</b> .....	<b>23</b>
<b>5.3.2 Pureza microbiológica</b> .....	<b>25</b>
<b>5.3.3 Recuperación de bacterias sobre semillas</b> .....	<b>25</b>
<b>5.4 Corroboración genética de cepas utilizadas</b> .....	<b>26</b>
<b>5.5 Coinoculación de semillas con bacterias PGPRs y AMF</b> .....	<b>27</b>
<b>5.6 Cuantificación de colonización radicular por AMF</b> .....	<b>30</b>
<b>5.7 Análisis estadístico</b> .....	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>6.1 Puesta a punto de la metodología de siembra, riego y desarrollo del cultivo en Cone-tainer™</b> .....	<b>34</b>
<b>6.2 Elección del mejor sustrato</b> .....	<b>35</b>
<b>6.3 Determinación de parámetros de calidad de inoculantes bacterianos</b> .....	<b>40</b>

6.4	Determinar la identidad genética de las cepas presentes en los diferentes inoculantes bacterianos como así también la del hongo micorrízico utilizado .....	41
6.5	Estudiar el efecto sobre los parámetros vegetativos del desarrollo del cultivo, de la aplicación individual y la coinoculación de los productos biológicos.....	49
6.6	efecto de coinoculación sobre la colonización micorrízica .....	53
7.	DISCUSIÓN.....	55
8.	CONCLUSIONES.....	61
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
10.	ANEXOS.....	77

# 1. RESUMEN

En Argentina el avance tecnológico sobre la genética del maíz (*Zea mays*), condujo a que este sea el cultivo con mayor aumento de rendimiento en los últimos 30 años. Por otra parte, la oferta y variedad de los insumos utilizados en su producción, tales como agroquímicos, fertilizantes, maquinaria, etc., provocaron profundos cambios para que tenga cada vez mayores rendimientos,(Gear, 2006).

Con la creciente demanda mundial de alimentos, se ha aumentado la producción, utilizando mayor cantidad de fertilizantes, pesticidas, herbicidas, fungicidas, etc. Los cuales provocan un aumento en la contaminación ambiental. Los tratamientos microbiológicos son herramientas tecnológicas que permiten obtener resultados a nivel de producción similares a las prácticas agronómicas convencionales pero con potenciales beneficios ambientales.

Mediante la coinoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y distintas especies de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) se planteó un posible efecto sinérgico en el desarrollo del cultivo de Maíz. Se buscó evidencia del efecto sinérgico, comparando los parámetros vegetativos del cultivo y en el porcentaje de colonización radicular por hongos micorrízicos arbusculares, en los distintos tratamientos.

En este trabajo se puso de manifiesto un aumento en el porcentaje de colonización radicular por hongos micorrízicos arbusculares en los tratamientos con coinoculación. Viendo también buenos resultados en los parámetros vegetativos.

## **PALABRAS CLAVE**

Micorriza-PGPR-coinoculación-maíz

## 2. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las *Poáceas* (Gramíneas), tribu *Maydeas*, y es la única especie cultivada de este género (Paliwal, 2001; Acosta, 2009).

La producción de maíz a nivel mundial es más grande que cualquier otro cereal. Los tres exportadores principales son los EEUU, Argentina y Brasil.

El futuro del comercio internacional, de cualquier modo, reviste hoy gran incertidumbre como consecuencia de la pandemia del coronavirus COVID-19. Las medidas tomadas para contener la diseminación de la enfermedad y el temor a sus efectos han provocado una notable retracción del consumo global y una fuerte corrección en los precios. Por este motivo, las proyecciones de cantidades y precio de nuestras exportaciones están sujetas a ajustes (<https://bcr.com.ar/es>).

Debido al crecimiento de la población, la demanda de alimentos requiere el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a los cultivos con el objetivo de mejorar la calidad y el aumento de la producción de granos (Ratz *et al.*, 2017; Buchelt *et al.*, 2019).

El desarrollo de los cultivos en los suelos agrícolas está influenciado por muchos factores bióticos y abióticos. Si bien los productores usan rutinariamente enfoques físicos y químicos para manejar el ambiente del suelo con el objetivo de mejorar los rendimientos de los cultivos, la aplicación de productos microbianos para este propósito es menos común. Una excepción a esto es el uso de inoculantes para leguminosas, utilizados para garantizar una fijación eficaz del nitrógeno (Smith, 1997).

Dentro del sistema suelo, el entorno inmediato de la raíz, llamada rizósfera, es considerada una de las interfaces microbianas más dinámicas de la tierra (Philippot *et al.*, 2013). La rizósfera es relativamente rica en nutrientes, debido a que los exudados vegetales son abundantes en aminoácidos y azúcares que proporcionan energía y nutrientes, lo que da lugar a más poblaciones microbianas en esta región que fuera de ella (Haas y Defago, 2005).

Para aumentar la productividad y reducir los costos, se han buscado alternativas para reducir el uso de insumos y pesticidas. Una alternativa es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (del inglés Plant Growth

Promoting Rizobacterias, PGPR), que es una opción biológica prometedora en el control de fitopatógenos, desarrollo de plantas y aumento de la productividad de los cultivos (Hernández-Hernández *et al.*, 2018). PGPR son bacterias que se encuentran en la rizósfera (superficie radicular en asociación con las raíces), y ayudan a promover el crecimiento (Ratz *et al.*, 2017). *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, entre otros se encuentran entre los géneros más estudiados (Araújo y Guerreiro, 2010).

Las PGPR son microorganismos que impactan favorablemente en el crecimiento y desarrollo de estas e incrementan su tolerancia, resistencia y protección a otros microorganismos causantes de enfermedades. Se han establecido algunas características que definen a este grupo. En primer lugar, tienen una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tendrá una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo (Chen *et al.*, 2013). Deben poseer alta capacidad de colonización efectiva sobre la superficie de la raíz y, como consecuencia, influir positivamente en el crecimiento de la planta. Complementariamente, puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos patógenos del suelo y, por último, que no produzcan daño en el hombre (Wernitznig *et al.*, 2013; Newman *et al.*, 2016).

Las poblaciones microbianas de la rizósfera son importantes para el mantenimiento de la salud de las raíces, la absorción de nutrientes y la tolerancia al estrés ambiental (Bowen y Rovira, 1999; Cook, 2002). Estos microorganismos benéficos pueden ser un componente importante de las prácticas de manejo para lograr aumentos de rendimientos de los cultivos (Cook, 2002). Los potenciales beneficios ambientales de este enfoque, que llevan a una reducción en el uso de productos agroquímicos, y el ajuste de prácticas sustentables, están impulsando el uso de microorganismos benéficos. El progreso reciente en la comprensión de las interacciones biológicas que se producen en la rizósfera, el estudio de formulaciones y el uso de inoculantes permiten aumentar la fiabilidad de la tecnología en el campo y facilitar su desarrollo comercial (Nelson, 2004).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth en 1978, para describir las bacterias del suelo que colonizan las raíces de las plantas luego de la inoculación

y que aumentan su crecimiento. Son indispensables para el proceso de colonización factores como la capacidad de las bacterias de sobrevivir a la inoculación, de multiplicarse en la espermósfera (zona de influencia de la semilla en germinación que produce exudados estimulantes o inhibidores de la actividad y/o crecimiento), de adherirse a la superficie de la raíz y de colonizar el sistema en desarrollo (Nelson, 2004).

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples complejos y factores bióticos y abióticos. La rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. Microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), y bacterias del género *Pseudomonas*, usualmente, catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), dependen de los factores mencionados para expresar sus potenciales efectos benéficos; sin embargo, en la interacción de estos dos tipos de microorganismos, se pueden presentar efectos sinérgicos, que potencien los beneficios o, por el contrario, efectos antagónicos o simplemente que no ocurra ningún efecto en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas, (Cano, 2011).

Se han descrito una gran diversidad de microorganismos que aportan múltiples beneficios al crecimiento de las plantas. Entre los mecanismos reportados como formas de promoción del crecimiento se encuentran los siguientes:

- Fijación biológica de N<sub>2</sub> (FBN) (Hurek *et al.*, 2002; Iniguez *et al.*, 2005). Diversos estudios reportan la fijación biológica del nitrógeno como mecanismo de promoción del crecimiento vegetal, proceso que se detallará más adelante.

- Producción de fitohormonas (Baca y Elmerich, 2007). Algunas bacterias producen fitohormonas que promueven el desarrollo y la proliferación de las raíces resultando en una absorción más eficiente de agua y nutrientes (Oliveira *et al.*, 2002).
- Solubilización de fosfato (Sturz *et al.*, 2000; Sessitsch *et al.*, 2002;). Varios reportes han examinado la habilidad de diferentes especies de bacterias de solubilizar fuentes de fosfato inorgánico insoluble (Goldstein, 1986),
- El biocontrol de fitopatógenos es otro mecanismo por el que las bacterias promueven el crecimiento vegetal (Weller, 1988; Compant *et al.*, 2005; Anandhakumar y Zeller, 2008). Los mecanismos de control más reconocidos son: competencia por un nicho ecológico o sustrato, producción de aleloquímicos inhibitorios, e inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas huéspedes a un amplio espectro de patógenos. Los aleloquímicos incluyen sideróforos, antibióticos, biocidas volátiles, enzimas líticas, y enzimas de detoxificación (Compant *et al.*, 2005).

Uno de los elementos nutritivos que con mayor frecuencia limita el rendimiento de los cultivos es el nitrógeno (N), aun cuando la atmósfera contiene un 80 % de nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>), aproximadamente, en este estado no puede ser aprovechado por la planta (Haag *et al.*, 2013). Por lo tanto, el N es un elemento clave para la agricultura, ya que el rendimiento es una función directa de la disponibilidad del mismo (Vitousek *et al.*, 1997). El N<sub>2</sub> solo puede ser utilizado directamente por un grupo reducido de microorganismos, en un proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN), (Zuberer, 2005).

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales que más limitan el rendimiento del maíz. Este macronutriente participa en la síntesis de proteínas y por ello es vital para toda la actividad metabólica de la planta. Su deficiencia provoca reducciones severas en el crecimiento del cultivo, básicamente por una menor tasa de crecimiento y expansión foliar que reducen la captación de la radiación fotosintéticamente activa. Las deficiencias de nitrógeno se evidencian por clorosis (amarillamiento) de las hojas más viejas, (Torres, 2016).

Datos moleculares y fisiológicos demuestran que transportadores de N de las plantas son activados durante la micorrización, sugiriendo que los HMA liberan una cantidad sustancial de N a sus hospedadores (Smith y Read, 2008).

Otro elemento importante es el carbono el cual ingresa al agrosistema por la fotosíntesis y sale del mismo por la respiración radical y microbiana. La diferencia entre la cantidad de carbono que ingresa como residuos vegetales al suelo y la que se genera por respiración microbiana representa el balance de carbono del mismo. Cuando la biomasa vegetal muere pasa a ser residuos vegetales. Durante su descomposición se liberan nutrientes y se emite CO<sub>2</sub>. Este también es generado en el proceso de mineralización de la materia orgánica humificada. La suma de la emisión de CO<sub>2</sub> por descomposición y mineralización constituye la respiración microbiana o heterotrófica del suelo. El carbono de los residuos, que no es emitido como CO<sub>2</sub> durante la descomposición pasa a formar parte de la biomasa microbiana en un primer momento. Luego se integra a sustancias orgánicas más estables y se denomina carbono humificado (Alvarez, 2006). Está demostrado que el carbono es transferido del HMA a las plantas, pero el mecanismo molecular aún no está claro (Smith y Read, 2008).

Por último, el azufre (S) también se puede transferir a las plantas a través de los HMA (Sieh *et al.*, 2013).

Dentro de las bacterias benéficas asociadas a plantas, las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), especialmente las formadoras de endosporas, poseen un gran potencial en agricultura. Este potencial se ve reflejado en el biocontrol de plagas y enfermedades, y en la biofertilización de plantas. Este grupo de bacterias posee la capacidad de formar endosporas, una estructura que les proporciona grandes ventajas de formulación en productos comerciales, ya que genera larga vida útil (García de Salamone *et al.*, 2001).

Según Evans y Burris (1992), podemos clasificar a las bacterias fijadoras de nitrógeno en tres grupos: diazótrofos de vida libre, que fijan el nitrógeno para su propio uso y el nutriente queda disponible después de su muerte, por ej. especies de *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Rhodobacter* (Fischer, 1994); diazótrofos asociativos, que contribuyen al crecimiento de la planta huésped sin formación de estructuras diferenciadas, por ej. Especies de *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Beneduzi *et al.*, 2008; Santi *et al.*, 2013), y diazótrofos

simbióticos, que establecen una interacción muy estrecha entre macro y micro-simbionte y en algunos casos se forman estructuras diferenciadas denominadas nódulos como en los géneros de rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* (Fischer, 1994).

Las características descriptivas del género *Bradyrhizobium* se corresponden con bacilos cortos de 0.5 a 0.9  $\mu\text{m}$  por 1.2 a 3.0  $\mu\text{m}$ , Gram (-), aeróbicas, no esporulantes. Son móviles debido a que poseen un flagelo polar o subpolar (Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey's). Esta bacteria puede vivir en vida libre en el suelo o como bacteroides (Dénarie *et al.*, 1992).

Las bacterias del género *Pseudomonas* abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, interactuando de forma asociativa con la planta (Madigan y Martinko, 2005). *Pseudomonas fluorescens* es una de las especies más estudiadas, pues produce metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Showkat *et al.*, 2012). Tiene una gran capacidad para solubilizar fósforo. Otro aspecto destacable de *Pseudomonas fluorescens* es la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento. Actualmente, existen diversas cepas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido registradas, y algunas de ellas patentadas (Araya, 2003) para su uso en los cultivos agrícolas como agentes de control biológico. *Pseudomonas fluorescens* como PGPR son muy utilizadas en diversos cultivos, pues colonizan las raíces de los mismos, promueven el crecimiento y previenen el establecimiento de patógenos. También favorecen la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo que permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Pérez Álvarez *et al.*, 2015).

*Azospirillum* sp. es una de las rizobacterias, promotoras de crecimiento, más estudiada hasta la actualidad. Produce efectos beneficiosos directos e indirectos en varios cultivos (Bashan *et al.*, 2011). Una de las principales características propuesta para explicar la promoción del crecimiento de plantas ha sido relacionada con su habilidad para producir reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, óxido nítrico y poliaminas (Prinsen *et al.*, 1993; Cassán *et al.*, 2009). El nivel de respuesta a la inoculación de *Azospirillum* puede definirse por las características genéticas tanto

de las bacterias como de la planta huésped (García de Salamone *et al.*, 2010). Los resultados más evidentes con inoculaciones con *Azospirillum* sp. son los cambios en la arquitectura radicular. Algunos de ellos ocurren en numerosas especies de plantas, consecuentemente incrementando y mejorando su sistema radicular.

Las cepas de *Acidovorax* que crecen en el suelo y el agua pueden biodegradar algunos poliésteres comerciales. Por ejemplo, *Acidovorax facilis* y *Acidovorax delafieldii*. Recientemente, fue descrito *Acidovorax radialis* sp. nov., que no posee capacidad patógena en los cultivos sin embargo presenta potencial para promover el crecimiento de las plantas (Li *et al.*, 2011). Son capaces de desnitrificación heterotrófica de nitrato (Willems y Gillis, 2015).

*Paenibacillus* sp. tiene aplicaciones consideradas potenciales en la agricultura porque producen diversas enzimas y sustancias antimicrobianas, como las polimixinas y bacitracinas (Ma *et al.*, 2011) y algunas cepas tienen la capacidad de fijación de nitrógeno (Ma *et al.*, 2007 a, b). Las bacterias formadoras de esporas se consideran ventajosas para la formulación de producto bioestimulantes y el mantenimiento estable en el suelo, hay más de 110 especies que han sido validadas en este género. Los miembros del género están ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen características fisiológicamente diversas (Xie *et al.*, 2012).

Existen dos mecanismos de acción de las PGPR: estos se denominan directos o indirectos.

Dentro de los mecanismos directos se tienen: la fijación biológica de nitrógeno por efecto de la enzima nitrogenasa, la producción de sustancias biológicamente activas y de reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas), así como la solubilización de nutrientes, como es el caso de la enzima fitasa y su participación en la solubilización de fósforo orgánico a partir de la molécula de fitato. Y dentro de los mecanismos indirectos se encuentran la generación de antibióticos, producción de moléculas quelantes de hierro, competencia, parasitismo e inducción de resistencia sistémica (SIR).

Las interacciones planta-microorganismo-ambiente en la rizósfera son las principales determinantes de la salud vegetal y la fertilidad del suelo. Se conoce que las plantas afectan a las poblaciones microbianas en el suelo, y cada especie de planta podría seleccionar las poblaciones microbianas específicas que

contribuyen a su condición fisiológica, creando un ambiente selectivo y con diversidad limitada (Borrego Muñoz, 2016).

Se ha demostrado que la inoculación de las raíces de las plantas con bacterias del género *Azospirillum sp*, producen un incremento en el desarrollo del sistema radical de la planta, lo cual conlleva una mejora en la capacidad de esta para utilizar de forma más eficaz los fertilizantes nitrogenados, por lo que pueden ser aplicados a dosis mucho más bajas. Este es un hecho fundamental ya que se conoce que hay gran discrepancia entre la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado y la que realmente es utilizada por la planta (bajo coeficiente de utilización). Por esta razón, puede quedar un exceso de compuestos nitrogenados en el ecosistema lo que representa la mayor fuente de contaminación por N tanto en la atmósfera (óxidos de N) como en las aguas superficiales y profundas (nitratos) (Clares, 2006).

La comparación de las secuencias de los genes que codifican el ARNr de una de las subunidades ribosómicas en procariotas, los genes que codifican el 16S ARNr específicamente, permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre dichos organismos. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. Esta macromolécula presenta una serie de características que permiten utilizarla en la identificación de bacterias en especies: 1) Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación. 2) Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. 3) Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas. 4) El tamaño relativamente largo de los genes del 16S ARNr (1.500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas. 5) La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. 6) Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los genes de 16S ARNr, existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (Bartoli *et al.*, 2014).

Los HMA (hongos micorrízicos arbusculares) se asocian con las raíces, sin dañarlas, y cooperan con las plantas para que estas tomen nutrientes y agua para crecer más y mejor, desde el punto de vista nutricional y sanitario. De este modo, la planta micorrizada es capaz de resistir mejor las condiciones ambientales adversas (sequía, salinidad, plagas), siendo así más productivas (Giovannetti and Mosse 1980). Como así también desempeñan un papel clave en el ciclado de nutrientes en el ecosistema y en la protección de las plantas frente a estreses ambientales. La mayoría de las especies de plantas silvestres y cultivadas forman micorrizas, siendo las llamadas “micorrizas arbusculares” (del inglés Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF o HMA) (en adelante “micorrizas”) las más comunes y, concretamente, las que forman las plantas de interés agronómico, entre ellas cereales, leguminosas, hortícolas y frutales. El micelio de HMA que emerge del sistema radicular puede adquirir nutrientes de los lugares del suelo que son inaccesibles para las raíces (Smith *et al.*, 2000). Además, las hifas fúngicas son mucho más delgadas que las raíces y, por lo tanto, pueden penetrar en poros más pequeños (Allen, 2011). Los carbohidratos y los nutrientes minerales se intercambian dentro de las raíces a través de la interfaz entre la planta y el hongo. Las hifas fúngicas colonizan la raíz y forman estructuras altamente ramificadas dentro de las células, los arbusculos, que se consideran el sitio funcional de intercambio de nutrientes (Balestrini *et al.*, 2015).

Por lo tanto, los HMA pueden aliviar la limitación en el crecimiento de las plantas causada por un suministro inadecuado de nutrientes (Nouri *et al.*, 2014).

Dados los efectos de las micorrizas como biofertilizantes, fitoestimuladores y bioprotectores de los cultivos, se acepta que el manejo apropiado de esta simbiosis pueda permitir una reducción significativa de fertilizantes y fungicidas químicos, aspectos claves en una producción sostenible en agricultura, con los consiguientes beneficios ecológicos y económicos. Es evidente, por lo que antecede, que los hongos micorrízicos y su simbiosis con la planta, las micorrizas, son un componente clave en la estabilidad, sostenibilidad y productividad de los agro-ecosistemas. Por ello, el hecho de que cualquier perturbación que sufra el sistema suelo-planta pueda afectar la diversidad o funcionalidad de estos hongos y/o simbiosis, puede repercutir en los beneficiosos efectos de las micorrizas.

Las interacciones de HMA brindan otros beneficios a las plantas, como la tolerancia a la sequía y la salinidad (Augé *et al.*, 2015) y la resistencia a las enfermedades (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Se sabe que los HMA alivian la toxicidad de metales pesados en las plantas hospedantes y toleran altas concentraciones de metales en el suelo (Meier *et al.*, 2015). También pueden tener un efecto directo en el ecosistema, ya que mejoran la estructura y agregación del suelo (Rillig y Mummey, 2006; Leifheit *et al.*, 2014, 2015; Rillig *et al.*, 2015) e impulsan las comunidades vegetales y su productividad (van der Heijden *et al.*, 1998). Las bacterias parecen representar el tercer componente de la asociación micorrízica y probablemente jueguen un papel en su función. Cada vez hay más pruebas de que las interacciones de bacterias y hongos son más generalizadas de lo esperado y que su dinámica puede ser crucial en los ecosistemas. En condiciones naturales las bacterias asociadas a los hongos micorrízicos colonizan la superficie de las hifas extrarradicales o en algunos hongos viven en el citoplasma como endobacterias (Bonfante y Anca, 2009).

Diversos ecólogos y agrónomos aseguran que las prácticas agrícolas que toman ventaja de la actividad microbiana del suelo son más eficientes que las prácticas convencionales desde el punto de vista de la utilización de la energía y los nutrientes. Cabe destacar que, en la rizósfera, los diferentes grupos de organismos del suelo no viven independientemente unos de otros, sino que forman un sistema interconectado, más o menos en equilibrio, según las condiciones del suelo. Muchas interacciones tienen lugar entre los hongos micorrízicos y los demás microorganismos en la rizósfera, y las respuestas de las plantas a la micorrización involucran, no solamente al hongo, sino a todos los microorganismos presentes (Cheeke *et al.* 2012).

Varios estudios han demostrado la posibilidad del uso de diferentes microorganismos, como alternativa biológica para la nutrición de las plantas, destacándose entre ellos las bacterias fijadoras de nitrógeno y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, así como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Estos microorganismos son considerados insumos biológicos de enorme potencial en la agricultura, gracias a sus efectos positivos sobre la adaptación y el crecimiento de una gran variedad de cultivos. Además, los hongos micorrízicos constituyen un componente clave para el desarrollo de la biota del

suelo (conjunto de organismos vivos que habitan en el suelo y cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos), por su gran capacidad de interacción con diferentes especies microbianas, a la vez que pueden modificar muchos aspectos de las propiedades físicas en la zona rizosférica (Trifonova *et al.* 2009). Todos esos efectos modifican los patrones de colonización de la raíz micorrizada, donde se desarrollan procesos biológicos que mejoran las condiciones de los suelos para el desarrollo de las plantas, aspectos muy importantes para el establecimiento de una agricultura sostenible y el funcionamiento adecuado de los agro ecosistemas.

Entonces, la interacción generada entre las micorrizas y las PGPRs lograría el crecimiento en las plantas, con un consecuente incremento en la emergencia, el vigor, la biomasa, el desarrollo en sistemas radiculares e incrementos en la producción de cultivos de interés comercial, tales como maíz, entre otros (Giovannetti 2000).

Por lo tanto, la aplicación eficiente de HMA y rizobacterias en el manejo futuro de la agricultura dependerá, en gran medida, de la habilidad para identificar las funciones específicas que realizan esos microorganismos dentro de cada agroecosistema particular y para integrar esos descubrimientos dentro de la estrategia de manejo integrado (Riera y Medina, 2005).

Los aumentos de rendimiento de los cultivos se basan en el fitomejoramiento que incluye la aplicación de altas dosis de fertilizantes químicos que pueden generar un impacto ambiental negativo en el ecosistema (Tilman *et al.*, 2002). Por esa razón, es importante encontrar y mejorar las prácticas agrícolas con el fin de aumentar y mantener altos niveles de producción de una manera más sostenible (Altieri y Nicholls, 2000). En este sentido, la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es una alternativa económica y ecológica para incrementar los rendimientos de los cultivos (García de Salamone, 2011; Verma *et al.*, 2010) y mejorar la eficiencia en el uso de fertilizantes (Hayat *et al.*, 2012). Los cultivos de cereales, como el maíz (*Zea mays*), pueden asociarse con muchas especies de bacterias beneficiosas, generalmente llamadas PGPR (Barea, 2004). Algunas de estas PGPR son *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales han mostrado capacidades relacionadas con la fijación biológica de N<sub>2</sub> (Franche *et al.*, 2009;

García de Salamone, 2012a) y la mejora de la absorción de nutrientes (Dobbelaere *et al.*, 2001; Hayat *et al.*, 2012). En asociación con la rizósfera de las plantas de cultivo, las PGPR producen efectos beneficiosos directos e indirectos sobre el crecimiento de las plantas (Cassán y Díaz-Zorita, 2016; Pliego *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2010). Al respecto, algunas cepas de estas PGPR promueven el rendimiento de grano y el crecimiento de la biomasa aérea de maíz, arroz y trigo (García de Salamone, 2012a; García de Salamone y Döbereiner, 1996; García de Salamone *et al.*, 2006, 2010).

La inclusión de maíz en las secuencias de cultivo garantiza la adición de gran cantidad de residuos del cultivo. Esto es esencial para mantener la calidad del suelo como establecen las pautas de agricultura de conservación. La agricultura mundial tendrá que enfrentar el desafío de aumentar la producción de alimentos debido a una demanda poblacional cada vez mayor, pero también tendrá la responsabilidad de reducir y/o minimizar la dependencia de los productos agroquímicos, para salvaguardar la contaminación ambiental y la salud humana. En este contexto, se destaca la necesidad de implementar o revitalizar tecnologías microbiológicas, como la biofertilización basada en hongos micorrízicos arbusculares y/o en bacterias PGPRs (Berruti *et al.*, 2015). Comprender las interacciones entre los microorganismos que componen la rizósfera es esencial para describir la naturaleza de la interacción microorganismo-suelo-planta.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de ciertos inoculantes formulados con PGPR, coinoculados con hongos micorrízicos arbusculares (del inglés Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF o HMA) sobre la producción de maíz en condiciones de cámara de crecimiento.

### **3. HIPÓTESIS**

La coinoculación de micorrizas vesículo-arbusculares y PGPR ejercen un efecto benéfico cuando son aplicadas, en conjunto, al cultivo de maíz.

### **4. OBJETIVOS**

## **4.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de coinoculación hongos micorrízicos arbusculares y PGPR desde la germinación hasta los primeros estadios vegetativos del desarrollo del cultivo de maíz, en condiciones in vitro de cámara de crecimiento; evaluando la identidad génica de los microorganismos inoculados.

## **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la identidad genética de las cepas presentes en los diferentes inoculantes bacterianos como así también la del hongo micorrízico utilizado.
- Evaluar la utilización de diferentes sustratos sobre la germinación y el desarrollo del cultivo en condiciones de cámara de crecimiento.
- Determinar la viabilidad de cada producto microbiológico.
- Estudiar el efecto sobre los parámetros vegetativos del desarrollo del cultivo, de la aplicación individual y la coinoculación de los productos biológicos.
- Analizar el efecto de coinoculación sobre la colonización micorrízica.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Si bien se buscó evaluar los efectos de la coinoculación sobre los parámetros vegetativos, primero se estandarizó el sistema sobre el cual se desarrolló el cultivo. Para ello, se realizaron una serie de ensayos en cámara de crecimiento (sirve para controlar los requerimientos de temperatura, humedad, luz y otros factores). En la cual la temperatura oscila entre los 25°C y 30°C, una humedad relativa de entre 60% y 70%, con 16 horas de luz de 9000 lux y 8 horas de oscuridad.

En todos los ensayos se utilizaron semillas de Maíz NK 860 TD/TG, híbrido de ciclo intermedio.

Los ensayos se llevaron a cabo en sistemas de contenedores individuales Cone-tainer™ con diámetro de 3,8 cm, profundidad de 21 cm y volumen de 164 ml, con drenaje inferior, además de poseer costillas internas verticales que evitan que las raíces formen espirales (Stuewe & Sons, 2018). Todos los ensayos se realizaron con diseño completamente aleatorizado.

Los inoculantes comerciales a base de HMA utilizados pertenecen a la empresa Valent Bio Sciences. Los inoculantes bacterianos utilizados pertenecen a la empresa Rizobacter.



Sistema de cone-tainers



Camara de crecimiento

## 5.1 Puesta a punto de la metodología de siembra, riego y desarrollo del cultivo en Cone-tainer™

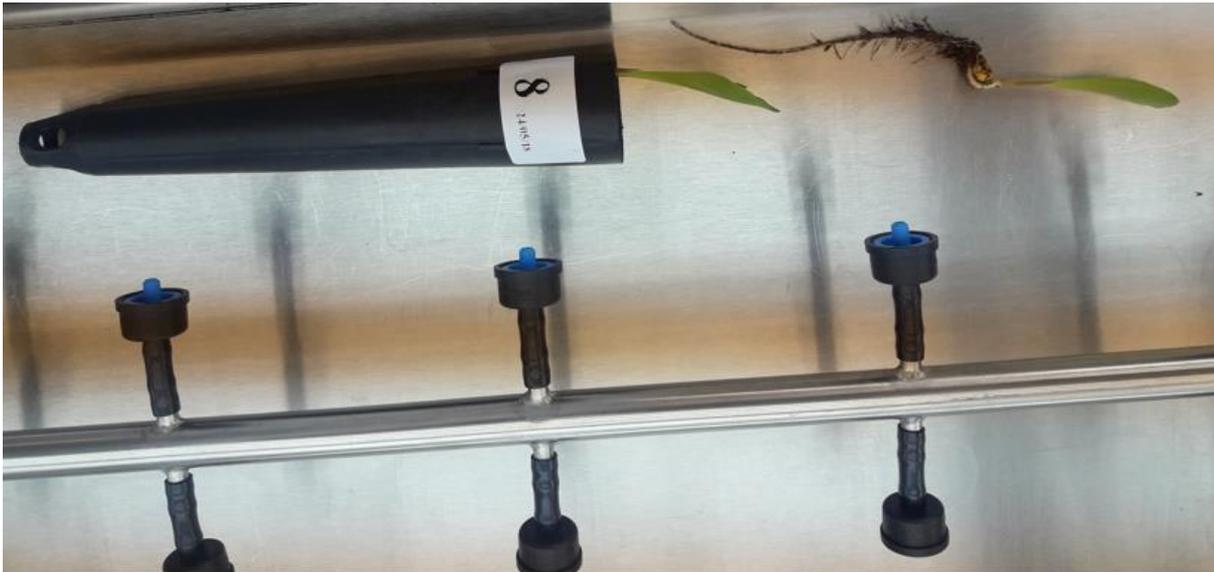
En una primera instancia se llevó adelante un ensayo piloto donde se combinaron distintos sustratos, mencionados en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Lista de sustratos utilizados, con sus respectivos pH.

SUSTRATO	PH
Suelo no estéril, libre de <i>Bradyrhizobium</i>	6,87
Arena fina + Arena gruesa (2:1)	7,35
Arena + Suelo (2:1)	7,16
Suelo + Arena + Perlita (5:4:1)	7,16
Arena fina	7,19
Arena gruesa	7,19

Todos los sustratos fueron esterilizados (menos el suelo no estéril) en autoclave durante 180 minutos, a 121°C. Las condiciones edáficas (estéril y no estéril) del sustrato suelo se presentan en la tabla 10.1 de Anexos. Las mezclas de sustratos se prepararon siguiendo las distintas proporciones en volumen. Se suspendieron 10 gramos de sustrato en 100 ml de agua de ósmosis, para luego tomar la medida de pH de la suspensión. Se llenaron 5 Cone-tainers<sup>TM</sup> con cada sustrato.

Como primera medida se buscó un material el cual pudiera retener el sustrato y controlar las raíces, se colocó en el extremo terminal del Cone-tainers<sup>TM</sup>. En un primer ensayo se utilizó en el extremo terminal del contenedor un apósito de algodón con el fin de retener el sustrato en el interior. Se sembraron dos semillas de maíz, sin tratar, mediante el empleo de pinzas estériles, a una profundidad de dos veces el tamaño de la semilla. Luego de la germinación se procedió al raleo, dejando solo una plántula. El riego se hizo mediante el empleo de un regador, usándose agua de ósmosis inversa. Se regó día por medio, sin tener en cuenta el volumen de agua incorporado en cada recipiente. Transcurridos 28 días desde la siembra se procedió al descalce y lavado de cada planta, dando por finalizado el ensayo.



raleo de plantas

Se realizó un segundo ensayo, donde se utilizaron canicas de diferentes tamaños en el extremo inferior del contenedor., Por lo demás el ensayo procedió de igual manera que el mencionado anteriormente. Las condiciones fueron las mismas que lo especificado para el primer ensayo.

En un tercer ensayo se probó el uso de OASIS® Esponja Floral en el extremo inferior de cada contenedor, como barrera tanto para el sustrato como para las raíces en crecimiento, aquí también el ensayo prosiguió de igual manera que lo anteriormente mencionado y las condiciones fueron las mismas que los ensayos previos.

Luego de finalizado el tercer ensayo se prosiguió con un nuevo ensayo, ya con el uso de OASIS® Esponja Floral, donde se probaron cuatro sustratos, Suelo no estéril, libre de *Bradyrhizobium*, Arena fina + Arena gruesa (2:1), Arena + Suelo (2:1) y Suelo + Arena + Perlita (5:4:1). Las mezclas de sustratos se prepararon siguiendo las distintas proporciones en volumen. En este mismo experimento se ajustó el riego, a capacidad de campo. Se llenó cada Cone-tainers™ con igual cantidad de gramos (g) de cada sustrato o mezcla de los mismos. El riego se hizo con agua de ósmosis inversa completando el peso perdido. Luego de 28 días se procedió a descalzar y limpiar las plantas de maíz. Se dio por finalizado el ensayo.

Se llevó a cabo un quinto ensayo, en el cual el riego fue administrado mediante micropipeta con tips estériles, siendo aplicados día por medio, con igual cantidad de micro-litros ( $\mu\text{l}$ ) de agua estéril en cada una de las plántulas.

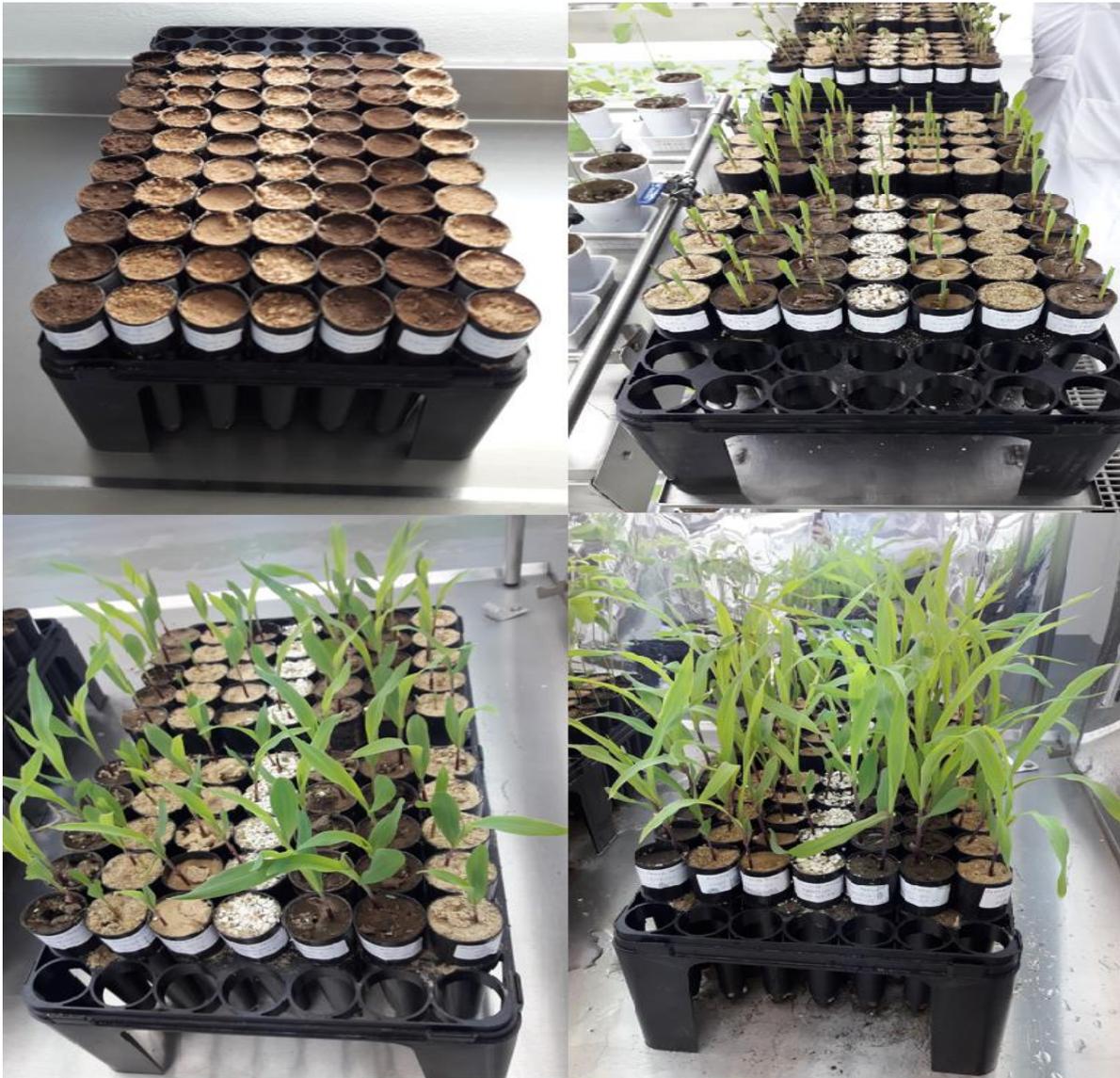
Para asegurar la nutrición del cultivo, se proporcionó solución Hoagland modificada (Hoagland y Arnon, 1950), 1000  $\mu\text{l}$ , dos veces a la semana. Los nutrientes y sus concentraciones finales de la solución Hoagland utilizada se presentan en la tabla 10.2 de Anexos. Luego de los 28 días se procedió a descalzar y lavar las plantas, dando por finalizado de esta manera el ensayo.

Se realizó un último ensayo, manteniendo todas las técnicas ya puestas a punto, pero esta vez se probó la desinfección de superficie de las semillas a utilizar. Se sembraron 10 Cone-tainers<sup>TM</sup> con cada sustrato, de los cuales 5 fueron sembrados con semillas estériles en superficie y 5 con semillas sin tratar. La desinfección de superficie de semillas fue mediante sucesivos lavados, un primer lavado con alcohol etílico al 70 %, luego dos enjuagues con agua de ósmosis, un lavado con hipoclorito de sodio al 1 % y por dos enjuagues con agua de ósmosis. Luego de realizar los ensayos antes mencionados se dio por finalizada la puesta a punto del sistema.

De esta manera se estableció el uso de OASIS® Esponja Floral en cada contenedor, riego con agua estéril administrado con micropipeta. Todos los ensayos posteriores se llevaron a cabo teniendo en cuenta la metodología ajustada.

## **5.2 Elección del mejor sustrato**

Se realizó un ensayo en cámara de crecimiento (sirve para controlar las condiciones climáticas, como: la temperatura, la humedad, la luz y otros factores) con las condiciones previamente mencionadas. Con un diseño completamente aleatorizado, con 10 repeticiones por tratamiento, para elegir un único sustrato y continuar con los experimentos de coinoculación. Se compararon los cuatro sustratos, Suelo no estéril, libre de *Bradyrhizobium*, Arena fina + Arena gruesa (2:1), Arena + Suelo (2:1) y Suelo + Arena + Perlita (5:4:1). Las mezclas de sustratos se prepararon siguiendo las distintas proporciones en volumen.

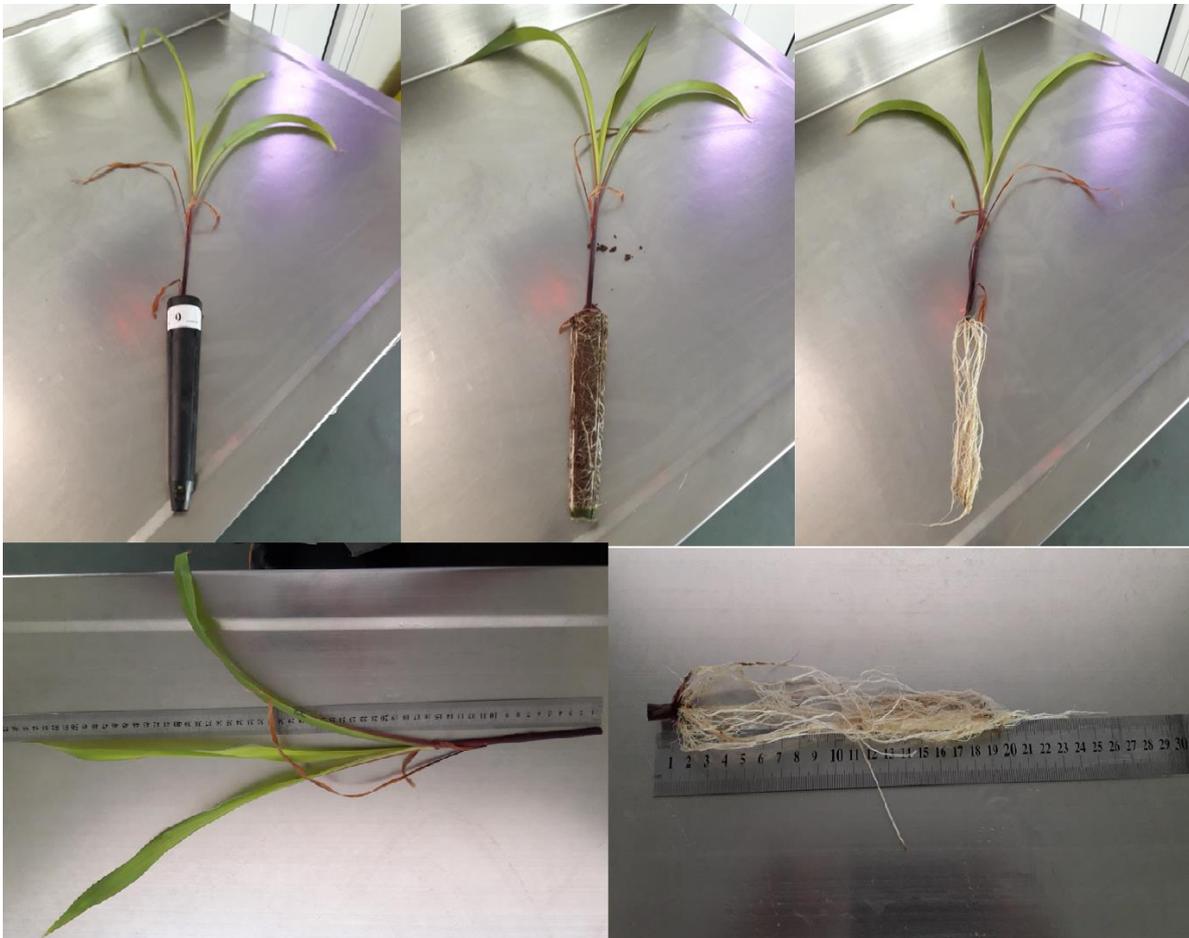


Ensayo de eleccion de sustratos

Se sembraron semillas de maíz NK 860 TD/TG, tratadas con fungicidacurasemilla de amplio espectro de control (MAXIM ® XL 035 Syngenta – 25 g/l Fludioxonil + 10 g/l Metalaxil-M, SC (Suspensión Concentrada), en dosis proporcional a 1ml/kg de semilla. Al finalizar el periodo de desarrollo de 28 días en cámara de crecimiento se descalzaron las plántulas y se procedió a realizar las mediciones de los siguientes parámetros vegetativos:

- longitud aérea
- longitud radicular
- masa fresca aérea
- masa fresca radicular

- masa seca aérea
- masa seca radicular
- volumen radicular



mediciones parametros vegetativos

### 5.3 Determinación de parámetros de calidad de inoculantes bacterianos

#### 5.3.1 Recuento de bacterias

Para la determinación de UFC/mL se prepararon las diluciones de trabajo de la siguiente manera, se agitó vigorosamente el envase del inoculante a evaluar durante 30 segundos, se extrajo 1 ml del producto y se adicionó en un tubo de

ensayo con 9 ml de agua desmineralizada estéril (pH: 6,5-7,0). Se homogeneizó durante 10 segundos en vortex, se extrajo 1 ml de la dilución 10-1 y se colocó en otro tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua desmineralizada estéril. A esta dilución se la denomina 10-2, se homogeneizó en vortex durante 10 segundos y se repitió el paso anterior hasta completar la dilución requerida, dependiendo del inoculante. Se sembraron las diluciones en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo agarizado adecuado para cada microorganismo (tabla 5.2). Se comenzó por la mayor dilución, colocando 0,1 ml en el centro de la placa y con espátula de vidrio estéril con alcohol 96°, expuesta a la llama y enfriada, se extendió el líquido sobre la superficie, (todo esto realizado en campana flujo laminar). Se incubaron las placas invertidas en estufa entre 29°C y 30°C. Los días de incubación variaron dependiendo del microorganismo (tabla 5.2). Por último, se llevó a cabo un recuento.

**Tabla 5.2:** Medios de cultivo y tiempo de incubación de las distintas cepas utilizadas.

Cepa	Medio de cultivo	Días de cultivo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	YMA	7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	F	2
<i>Azospirillum brasilense</i>	RC	6
<i>Acidovorax delafieldii</i>	LB	4
<i>Paenibacillus terrigena</i>	LB	4

El resultado se expresó como unidades formadoras de colonias por mililitro de producto (UFC.ml-1) y se calculó de la siguiente manera:

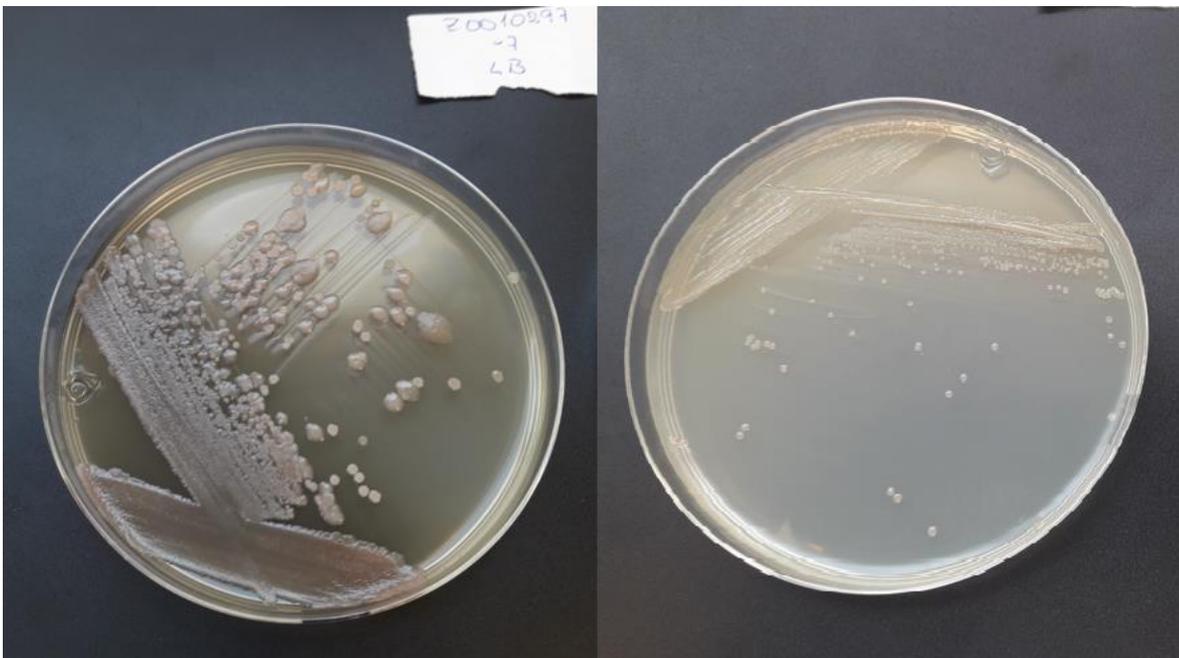
$$\text{UFC.ml-1} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{factor de siembra} \times \text{factor de dilución}$$

**Referencias:**

- N° de colonias: promedio del número de colonias presentes en las tres placas de lectura.
- Factor de siembra: 10 si se usa 0,1ml para la siembra en la placa.
- Factor de dilución: la inversa de la dilución en la cual se realizó el recuento de colonias para la obtención del resultado.

### 5.3.2 Pureza microbiológica

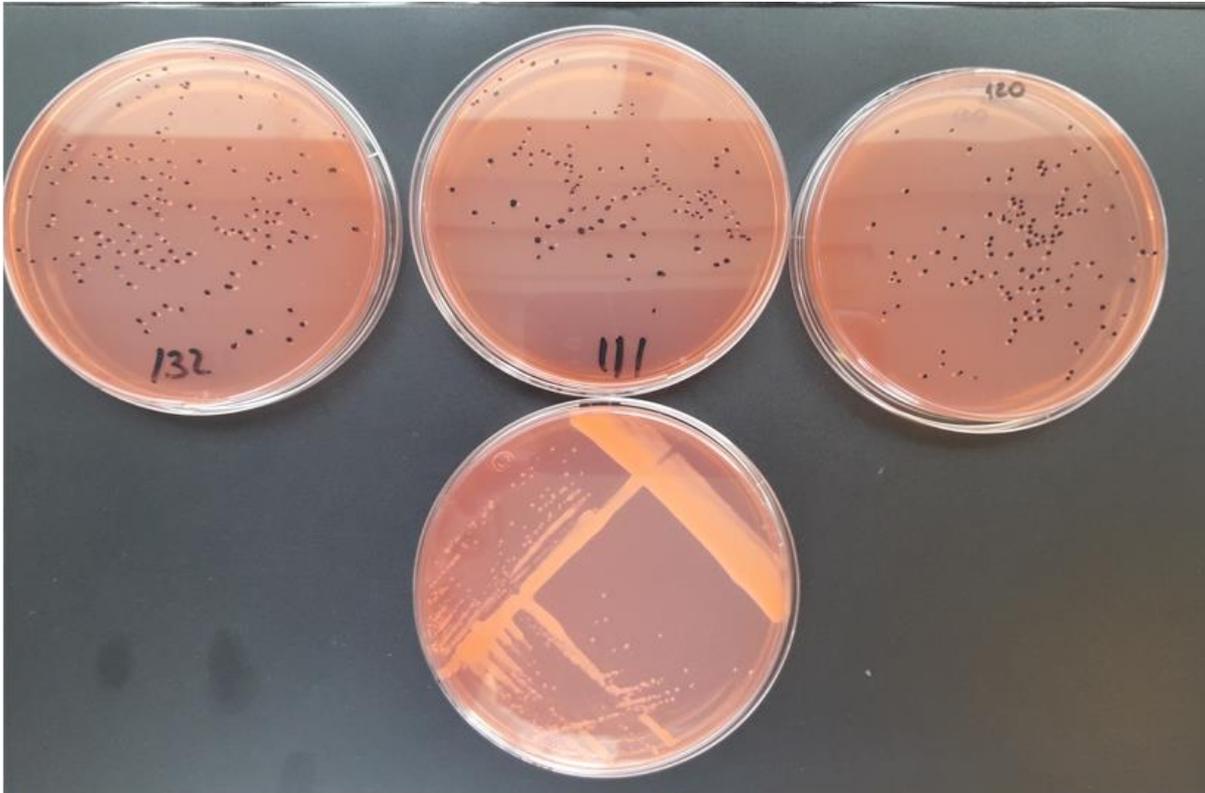
Para evaluar la pureza de los inoculantes, se utilizó la técnica de estrías en superficie. Se tomó una muestra con un ansa estéril y se inoculó sobre un extremo de la placa de Petri con el medio de cultivo correspondiente para cada una de las cepas utilizadas. Con la misma ansa se extendió la muestra formando estrías sobre la superficie en varios sentidos.



### 5.3.3 Recuperación de bacterias sobre semillas

Se llevó a cabo en simultáneo con la siembra de cada tratamiento. Se contaron 50 semillas, que se colocaron en un frasco estéril, con tapa. Se le agregó 50 ml de agua estéril, con pH ajustado en 7. Se agitó durante 15 minutos en agitador magnético a 200 rpm.

Luego de este tiempo se continuó con las diluciones decimales seriadas en tubos de ensayo. Por último, se sembró, por triplicado, en caja de Petri, 0,1 ml de la dilución correspondiente a cada inoculante y se extendió sobre la placa con espátula de vidrio estéril. Todo el procedimiento descrito se llevó a cabo por triplicado.



Cajas de petri sembradas

#### 5.4 Corroboración genética de cepas utilizadas

Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico de los inoculantes formulados de las cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense*, *Acidovorax delafieldii* y *Paenibacillus terrigena*, como así también del hongo micorrízico *Rizophagus intrarradice*. Esto se realizó de acuerdo al protocolo indicado por los profesionales de la empresa (Para ello se utilizará el kit Wizard Genomic ADN Purification kit de Promega) (en el anexo tabla 10.3). Una vez que se corroboró la integridad y la pureza del ADN

extraído, por electroforesis en gel de agarosa, se envió a secuenciar a Macrogen, Korea. Se realizó un secuenciamiento de los genes ARN 16S para las cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense*, *Acidovorax delafieldii* y *Paenibacillus terrigena* mientras que para la cepa de *Bradyrhizobium japonicum*, además del gen ARN 16S, se secuenció el gen GlnA y recA. En tanto que para el hongo micorrízico se hizo el secuenciamiento de los genes 18S. Con las secuencias entregadas por Macrogen, se realizó un análisis con el programa Blast N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990), el cual compara las secuencias individuales de ácidos nucleicos obtenidas en este estudio, con aquellas disponibles en la base de datos de ácidos nucleicos GenBank (es una colección de todas las secuencias de ADN y proteínas disponibles). Esto permitió dilucidar la identidad de los microorganismos. Además, se realizó una búsqueda de secuencias coincidentes para realizar un alineamiento múltiple, lo cual permitió analizar las secuencias en el contexto de la filogenia molecular, para esto se empleó el software MEGA v6 (contiene funciones para construir alineaciones de secuencias, inferir historias filogenéticas y realizar análisis evolutivos moleculares), bajo el modelo Tamura-Nei, empleando las opciones recomendadas por el programa (Drummond *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2013), el cual permitió un alineamiento mediante clustalW adecuado para dicho estudio. Se prosiguió descargando el alineamiento (fasta) y una vez obtenido el alineamiento múltiple, se pudo generar el árbol filogenético, para ello se utilizó el método de máxima probabilidad/máximun likelihood ya que este utiliza con mayor eficacia la información filogenética contenida en el alineamiento múltiple y tiende a generar un resultado más cercano a la realidad pudiendo así evidenciar la relación evolutiva entre las secuencias.

## **5.5 Coinoculación de semillas con bacterias PGPRs y HMA**

Se realizó un ensayo en cámara de crecimiento, con un diseño completamente aleatorizado, con 15 repeticiones por tratamiento (5 plantas se reservaron para utilizar en el estudio de colonización radicular por HMA). Se utilizó como sustrato suelo libre de *Bradyrhizobium sp.*, húmedo, que se pasteurizó (se somete el sustrato a altas temperaturas durante un periodo de tiempo para matar

los microorganismos más sensibles a la temperatura (mesofílicos). Los microorganismos más resistentes al calor (termofílicos) sobreviven a la pasteurización y permanecen vivos para proteger al micelio frente a otros microbios) en autoclave a 121°C, en dos días consecutivos durante 45 y 30 minutos respectivamente (Acosta Peñaloza *et al.* 2013).

Se trataron las semillas con los inoculantes indicados, dependiendo del tratamiento. En este ensayo no se utilizó fungicida-curasemilla sobre las semillas, para evitar que interfiera en la coinoculación de HMA. Pero si se utilizó el protector bacteriano, Premax R (Rizobacter). El inoculante a base HMA utilizado en todos los ensayos, se mandó a evaluar con la Dra Alicia Godeas (Facultad de Ciencias Exactas UBA). Donde se comprobó que está compuesto por *Rizophagus intrarradice*.

#### **Tratamientos y dosis para 200 g de semillas de Maíz:**

1. Testigo absoluto (semilla sin tratar).
2. Rizoliq  
8 mL de Rizoliq + 2 mL Premax R. Usar 2 mL/200 gr semilla de maíz.
3. *Acidovorax delafieldii* cepa A736  
8 mL de cepa A736 + 2 mL Premax R. Usar 2 mL/200 gr semilla de maíz.
4. *Paenibacillus terrigena* cepa B241  
8 mL de cepa B241 + 2 mL Premax R. Usar 2 mL/200 gr semilla de maíz.
5. *Pseudomonas fluorescens* cepa 1008  
8 mL de Rizofos + 2 mL Premax R. Usar 2 mL/200 gr semilla de maíz.
6. *Azospirillum brasilense* cepa Az39  
8 mL de *Azospirillum* + 2 mL Premax R. Usar 2 mL/200 gr semilla de maíz.

7. Rizoliq + Micorrizas

8 mL de Rizoliq + 2 mL Premax R. + 0,2 mL micorrizas. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

8. *Acidovorax delafieldii* cepa A736 + Micorrizas

8 mL de cepa A736 + 2 mL Premax R. + 0,2 mL micorrizas. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

9. *Paenibacillus terrigena* cepa B241 + Micorrizas

8 mL de cepa B241 + 2 mL Premax R. + 0,2 mL micorrizas. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

10. *Pseudomonas fluorescens* cepa 1008 + Micorrizas

8 mL de Rizofos + 2 mL Premax R. + 0,2 mL micorrizas. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

11. *Azospirillum brasilense* cepa Az39 + Micorrizas

8 mL de *Azospirillum* + 2 mL Premax R. + 0,2 mL micorriza. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

12. Micorrizas

10 mL de agua + 0,2 mL micorriza. Usar 2,1 mL/200 gr semilla de maíz.

Se siguió la metodología de siembra, riego, mantenimiento y descalce de plantas puesta a punto anteriormente. El cultivo permaneció en cámara de crecimiento durante 35 días después de la siembra. Al finalizar el período de desarrollo se descalzaron las plántulas y se lavaron. Se procedió a realizar, en 10 de las repeticiones, las mediciones de los parámetros vegetativos:

- clorofila (con SPAD 502, mide la cantidad de clorofila en una hoja, en este caso en la hoja bandera a cada lado del nervio central)
- longitud aérea
- longitud radicular
- masa fresca aérea
- masa fresca radicular

- masa seca aérea
- masa seca radicular
- volumen radicular mediante el uso de root-scanner (con interpretación de resultados a través de Software WinRHIZOTM)

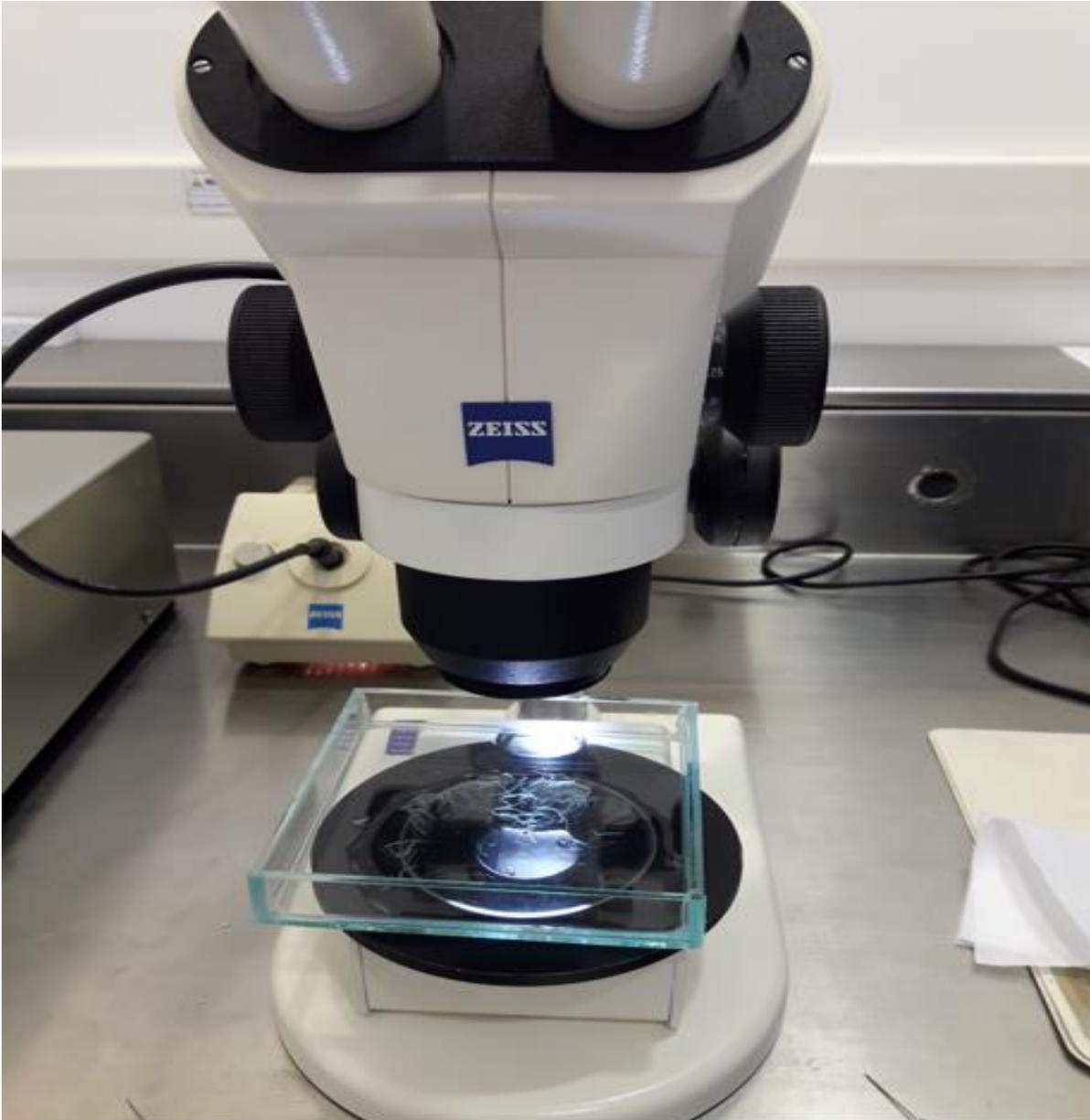


Root Scanner

## 5.6 Cuantificación de colonización radicular por HMA

Se procedió a eliminar 2 cm de la parte inferior y superior de las raíces. Se colocaron las raíces en tubos de centrífuga cónicos de 50 ml y se cubrieron con alcohol etílico al 50 %, durante 4 horas a temperatura ambiente.

Luego de transcurrido dicho tiempo se reemplazó el alcohol etílico por hidróxido de potasio al 20 % y se incubaron las raíces a 65°C durante 12 horas. Se comprobó que las raíces estuviesen hialinas luego del tiempo transcurrido, mediante la observación al microscopio estereoscópico.



Se eliminó el pigmento remanente en las raíces mediante la adición de una solución blanqueadora de peróxido de hidrógeno alcalino durante 3 minutos. Se retiró dicha solución y se dejaron reposar las raíces durante 30 minutos en agua de ósmosis. Luego de este tiempo se lavaron 5 veces las raíces con agua limpia.

Se remojaron las raíces en ácido acético al 5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó dicha solución y se reemplazó por la solución de tinción (6 ml de tinta negra marca Sheaffer TM en 194 ml de ácido acético 5 %) durante 10 minutos a 90°C. Se retiró la solución de tinción y se lavaron 5 veces las raíces.

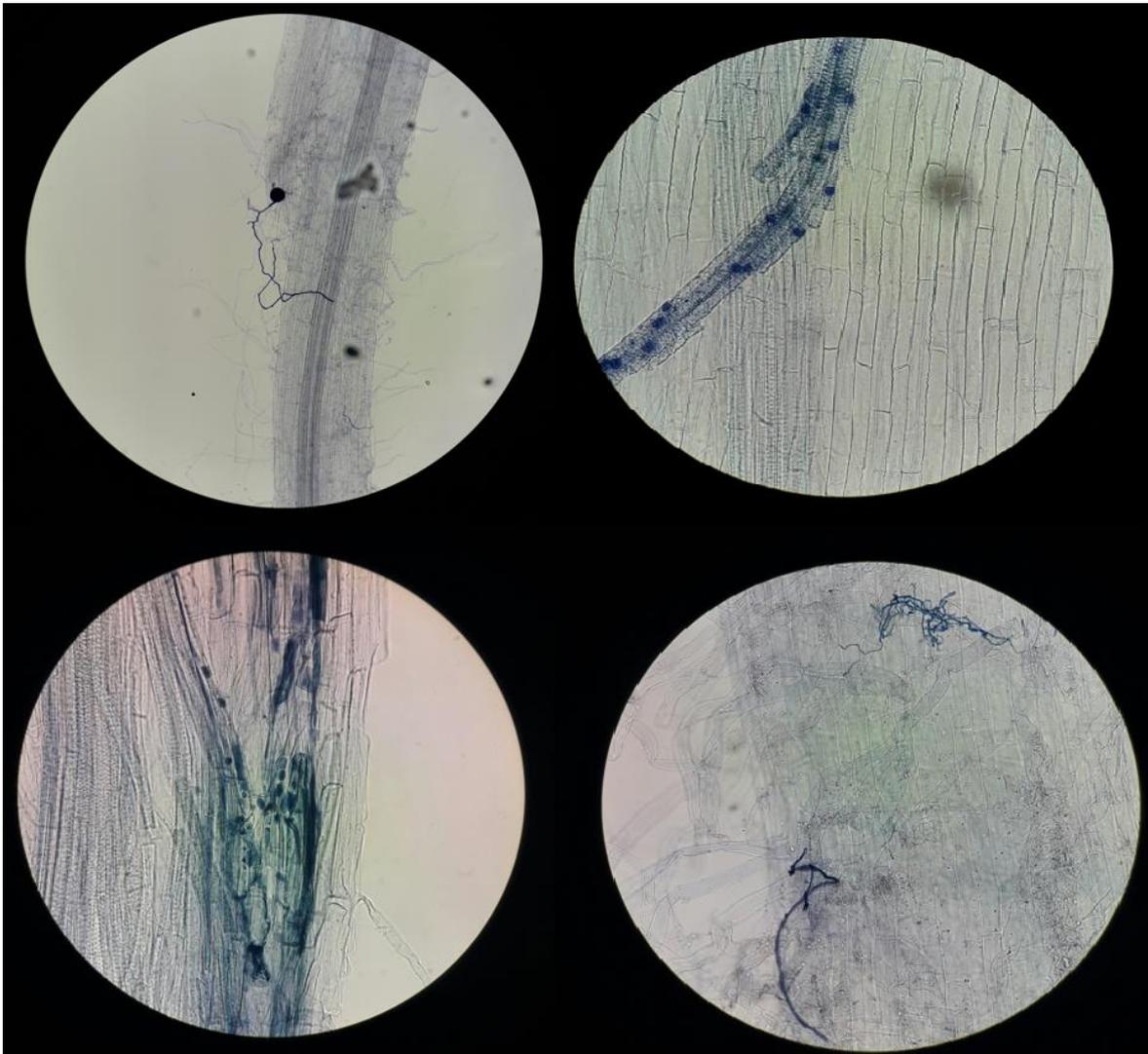
Se dejaron reposar las raíces en agua de ósmosis durante 30 minutos a temperatura ambiente y se cambió el agua por ácido láctico. Se almacenaron las raíces durante 3 días en heladera, cubiertas de ácido láctico, para asegurar la eliminación de burbujas de aire formadas durante el tratamiento.

Para calcular el porcentaje de colonización de raíces por micorrizas se siguió el método descrito por McGonigle *et al.* 1990. Se montaron segmentos de raíz de 1 cm de longitud sobre un portaobjetos, usando como medio ácido láctico diluido en agua.

Se hicieron 5 preparados, con 10 segmentos de raíz cada uno, por tratamiento.

Sobre los preparados se realizó un recuento de estructuras fúngicas (vesículas, arbuscúlos e hifas) en el microscopio. Se realizaron 3 observaciones por segmento de raíz (punto superior, medio e inferior).

Por último, se calculó el porcentaje total de raíces infectadas por tratamiento.



Colonización por HMA

## 5.7 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA), las comparaciones se llevaron a cabo mediante el test DGC y un nivel de significación de 0,05. Adicionalmente se hizo un análisis multivariado (sirve para medir, explicar y predecir el grado de relación que existe entre la variación (combinación lineal ponderada de las variables). El carácter del análisis descansa no sólo en el número de variables sino en las múltiples combinaciones existentes entre las variables.), comparando los parámetros vegetativos en los diferentes sustratos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa InfoStat versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Puesta a punto de la metodología de siembra, riego y desarrollo del cultivo en Cone-tainers™**

En el primer ensayo realizado para la puesta a punto, se observó que el algodón utilizado para impedir la pérdida de sustrato no fue de utilidad, ya que se perdió el sustrato por la base del contenedor. También se observó que, a partir de los 20 días desde la siembra, las raíces de las plantas traspasaron el algodón y quedaron en contacto con diversas fuentes de contaminación por lo cual se procedió a descartar el algodón de la base de los contenedores. La metodología de siembra fue eficiente y se decidió proseguir con el sistema de siembra en cuanto a la profundidad (2 veces el tamaño de la semilla) y cantidad de semillas (2 por Cone-tainers™), para luego realizar un raleo.

En el segundo ensayo, se utilizaron canicas de varios tamaños, encontrando diferentes complicaciones, siendo las canicas más grandes las que impedían el drenaje del riego, y las más pequeñas no controlaban las raíces las cuales entraban en contacto con diferentes contaminantes, se repitió la metodología de siembra dado que esta fue eficiente en el primer ensayo.

En un tercer ensayo, se probó el OASIS® Esponja Floral en el extremo inferior de cada contenedor, como barrera tanto para el sustrato como para las raíces en crecimiento respondió bien a las expectativas, cumpliendo la función esperada. En adición al buen desempeño, con dicho material se mantuvo el volumen de Cone-tainers™ ocupado, ya que se cortaron discos idénticos de los oasis con un molde permitiendo que todos los contenedores quedaran iguales en el momento de la incorporación de los sustratos. En este ensayo se observaron problemas con los sustratos arena fina, arena gruesa donde las plantas no se implantaron correctamente (falta de contención por parte del sustrato) y la pérdida de humedad fue excesiva. Por lo que se decidió descartar la utilización de este sustrato en los ensayos sucesivos. En un cuarto ensayo donde fueron utilizados

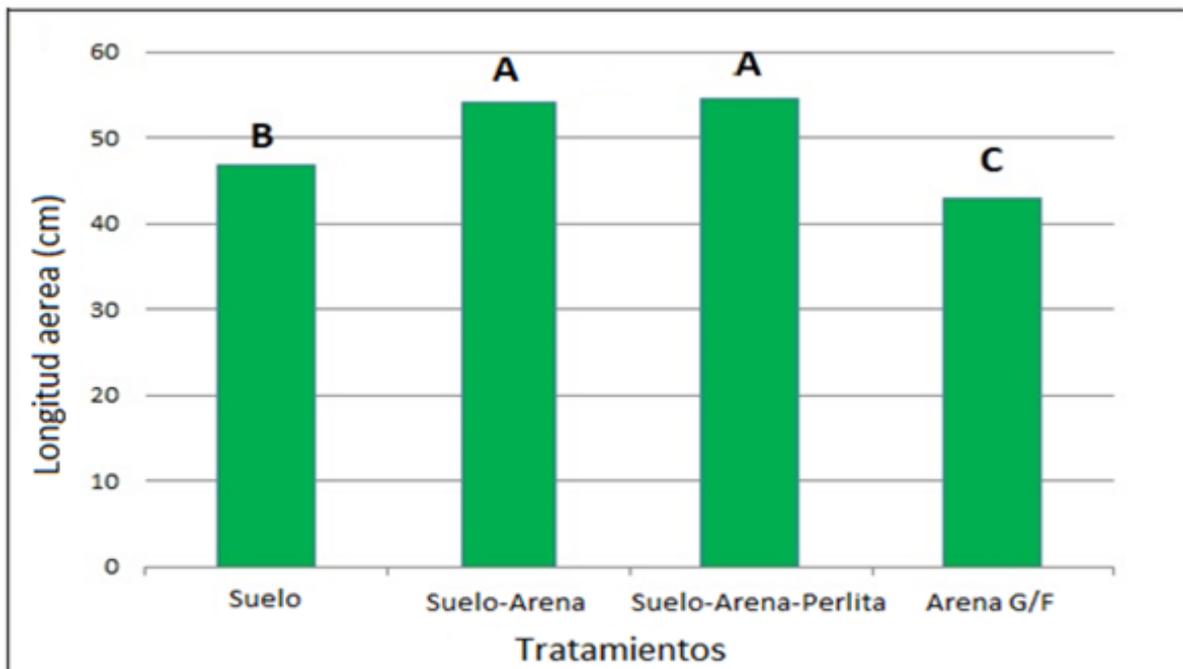
los sustratos suelo, suelo-arena, suelo-arena-perlita y mezcla de arena fina-arena gruesa se observó una correcta implantación. En un siguiente ensayo, teniendo en cuenta los requerimientos hídricos observados, el riego llevado a cabo mediante micropipeta estéril y con agua estéril mostró una respuesta favorable. En adición, el riego con solución Hoagland modificada no mostró una mejoría fenotípica significativa en todo el ensayo, con plantas de aspecto similar en cuanto al tamaño y color.

Se observó un mayor porcentaje de germinación al realizar un riego previo a la siembra y al momento de la emergencia, previo al raleo. De esta manera se eliminó el exceso de agua en contacto con semillas sin germinar y se evitó la pérdida de viabilidad de las semillas. Esta técnica también facilitó el raleo realizado con pinzas estériles para evitar la contaminación, técnica que también fue de utilidad posterior. En un último ensayo de puesta a punto, la utilización de semillas desinfectadas en superficie dió como resultado una disminución importante en el porcentaje de germinación de plantas, en comparación a las semillas sin desinfectar, por lo cual se decidió continuar con semillas sin desinfectar, para no comprometer la viabilidad de las semillas.

Finalmente se estableció el uso de OASIS® Esponja Floral en cada contenedor, riego con agua estéril administrado con micropipeta y sin la necesidad de fertilización con solución Hoagland modificada.

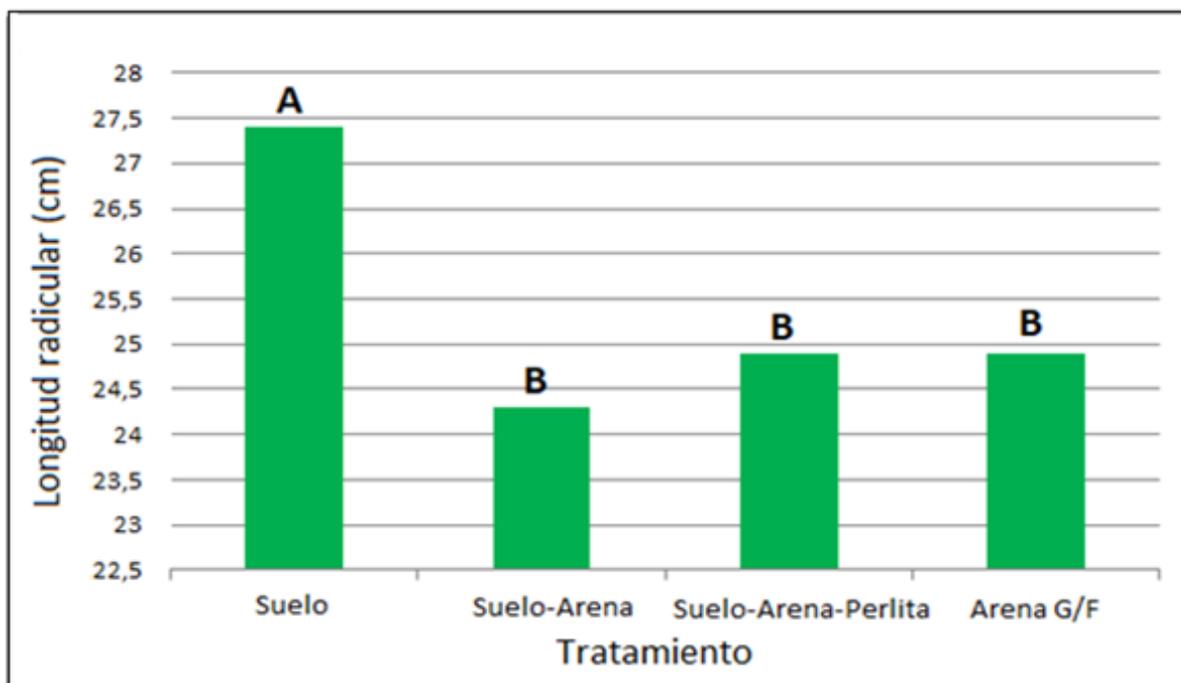
## **6.2 Elección del mejor sustrato**

En el sustrato Arena G/F, se observó una longitud aérea significativamente menor estadísticamente que en los otros tres sustrato, en el sustrato suelo, presentaron una longitud aérea intermedia entre los dos mejores suelo-arena, suelo-arena-perlita y Arena G/F (figura 6.1).



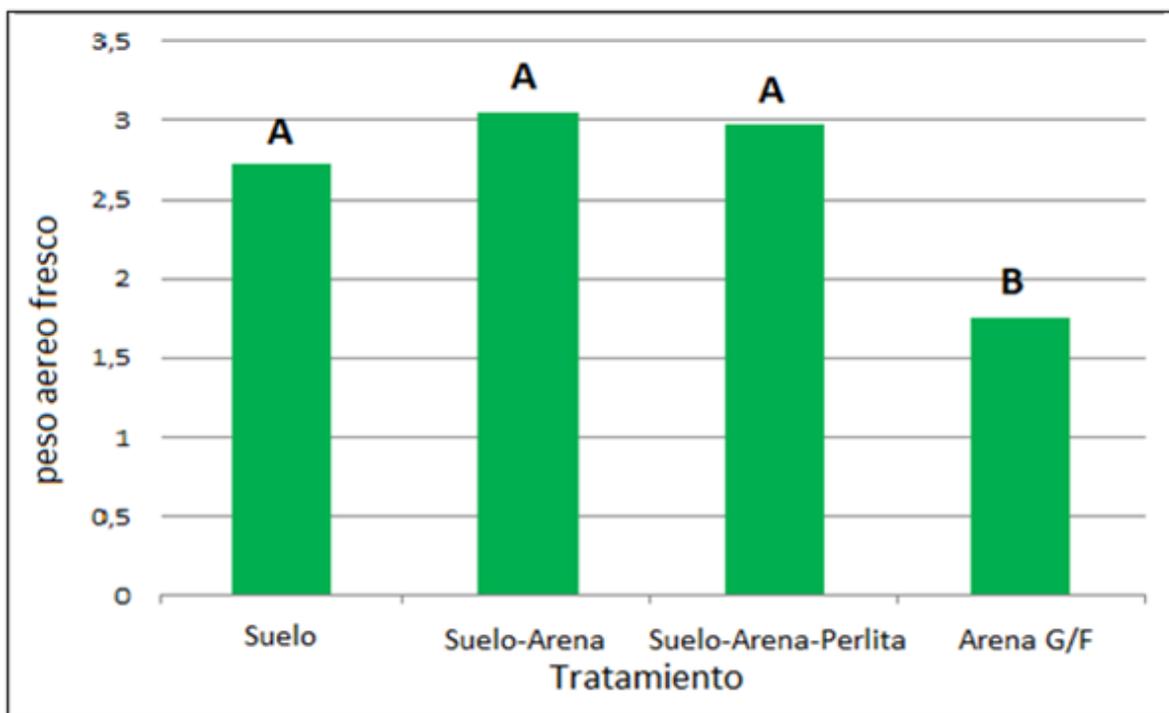
**Figura 6.1:** Longitud aérea de plantas en los distintos sustratos. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Con respecto a la longitud radicular, se observó que las plantas implantadas en suelo presentaron una longitud radicular significativamente mayor estadísticamente que las implantadas en los otros tres sustratos (figura 6.2).



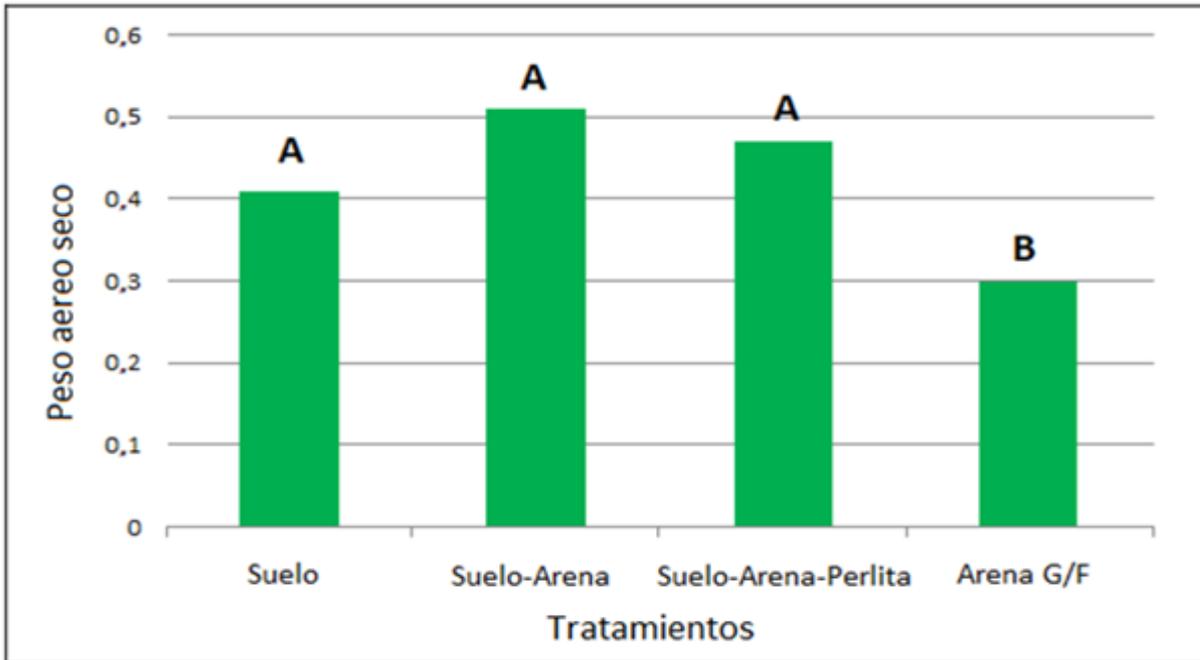
**Figura 6.2:** Longitud radicular de plantas en los distintos sustratos. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

En cuanto al peso fresco aéreo de las plantas de maíz, se observó una disminución estadísticamente significativa de este parámetro en las plantas implantadas en arena (Arena G – Arena F), en comparación con el peso fresco de las plantas en los otros sustratos (figura 6.3). En tanto que el peso fresco radicular no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos sustratos (tratamientos).



**Figura 6.3:** Peso fresco aéreo de plantas en los distintos sustratos. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

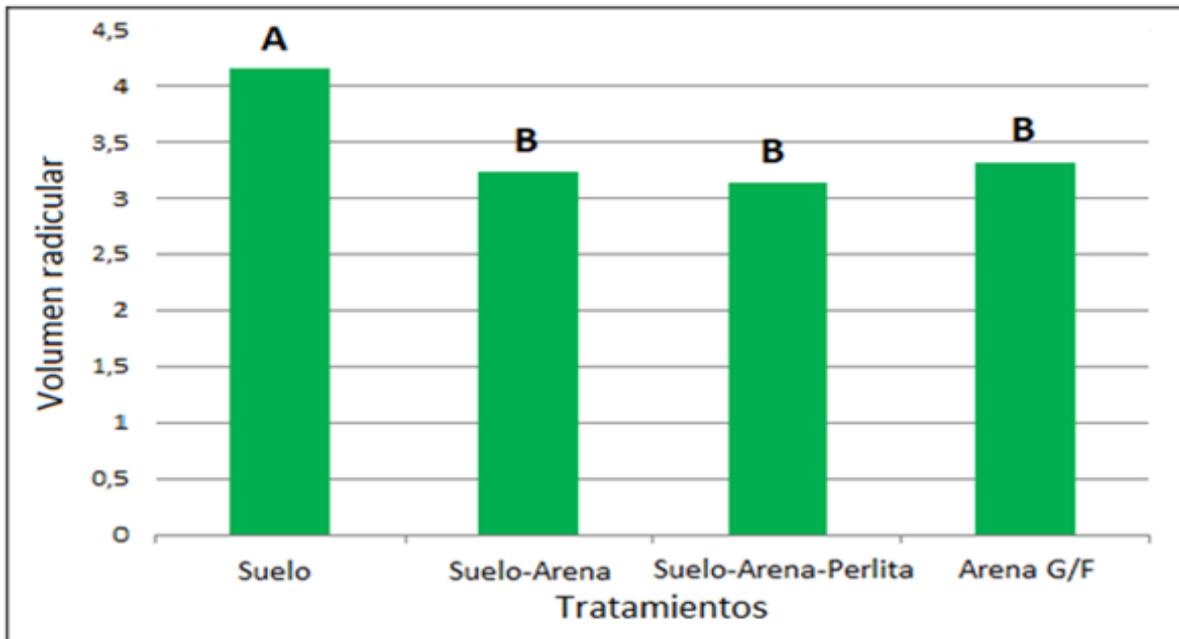
Para el peso seco aéreo de las plantas, también se observó en el sustrato arena G/F un peso seco aéreo de plantas significativamente menor estadísticamente que en los otros sustratos evaluados (figura 6.4). En cambio, en peso seco radicular no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes sustratos.



**Figura 6.4:** Peso seco aéreo de plantas en los distintos sustratos. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

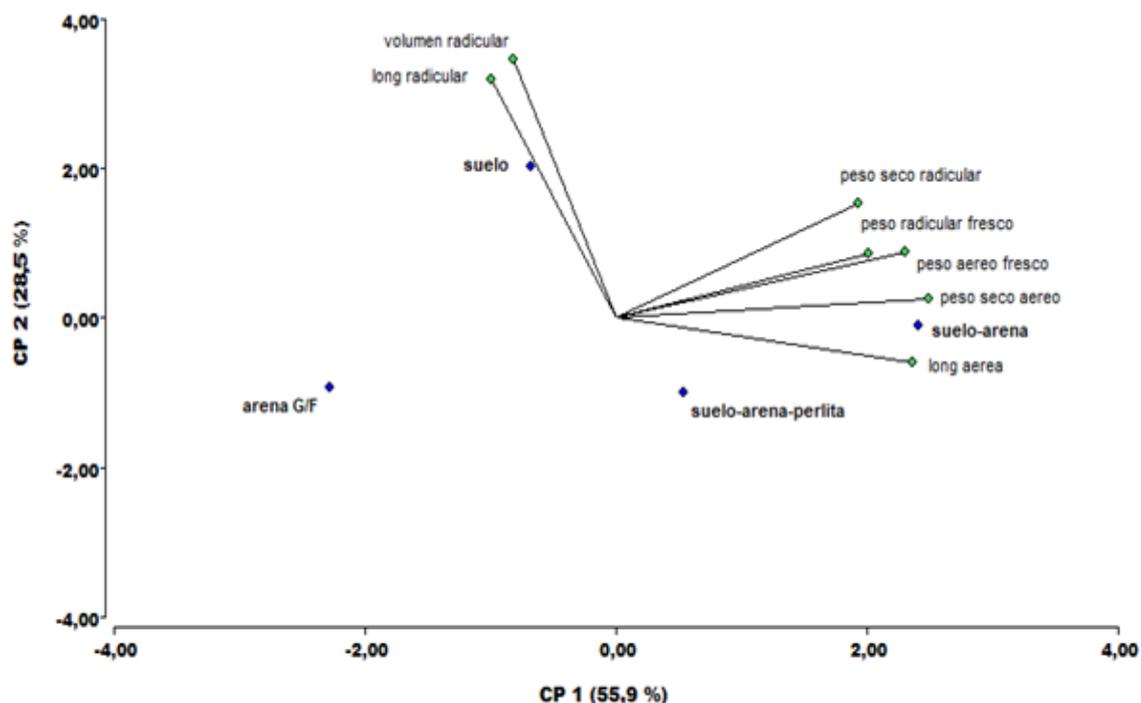
Como bien se dijo anteriormente, peso fresco radicular, y el peso seco radicular de las plantas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los sustratos (los análisis estadísticos correspondientes están en el anexo. Sección: 10.4).

En lo que concierne al volumen radicular se observa que las plantas que crecieron con suelo como sustrato son significativamente mayores estadísticamente que las que crecieron en los otros sustratos (figura 6.5).



**Figura 6.5:** Volumen radicular de plantas en los distintos sustratos. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

Por otro lado, cuando se realizó el análisis multivariado para predecir el grado de relación existente entre las variables, se pudo observar que el suelo es el sustrato que mayor correlación tiene con la longitud radicular y volumen radicular mientras que los sustratos Suelo-Arena y Suelo-Arena-Perlita tienen un comportamiento más neutral. Por último, se observó que la mezcla de arena fina y arena gruesa correlaciona negativamente con la mayoría de los parámetros vegetativos medidos (figura 6.6).



**Figura 6.6:** Análisis multivariado de los parámetros vegetativos en ensayo con distintos sustratos. Entre la componente principal 1 y la componente principal 2 se explica el 85% de la variabilidad total.

### 6.3 Determinación de parámetros de calidad de inoculantes bacterianos

Los recuentos de bacterias viables se muestran en la tabla 6.1.

<b>Tabla 6.1:</b> Bacterias viables y pH de los inoculantes utilizados.		
<b>PGPR</b>	<b>UFC/ml</b>	<b>pH</b>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1,21 x 10 <sup>10</sup>	7,39
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,03 x 10 <sup>9</sup>	6,43
<i>Azospirillum brasilense</i>	6,47 x 10 <sup>8</sup>	6,03
<i>Acidovorax delafieldii</i>	1,54 x 10 <sup>9</sup>	6,22
<i>Paenibacillus terrigena</i>	1,40 x 10 <sup>8</sup>	6,15

A través de las observaciones de purezas en microscopio estereoscópico se pudo observar que los inoculantes no presentaban contaminantes. En las primeras estrías se obtuvo crecimiento confluyente debido al inóculo muy concentrado y en las últimas estrías al quedar menos microorganismos en el ansa, se obtuvo colonias aisladas originadas a partir de cada célula bacteriana.

Por otro lado, las recuperaciones de bacterias viables sobre semillas, tomadas a los 15 minutos luego de la inoculación, al momento de la siembra, dieron como resultado las unidades formadoras de colonia de la tabla 6.2. Esta técnica de trabajo permitió estimar el número de bacterias viables que permanecen sobre las semillas luego de la inoculación, al momento de la siembra.

<b>Tabla 6.2:</b> Unidades formadoras de colonias recuperadas desde semillas.	
<b>Tratamiento</b>	<b>UFC en semilla-1</b>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1,07 x 10 <sup>7</sup>
<i>Acidovorax delafieldii</i> cepa A736	1,28 x 10 <sup>5</sup>
<i>Paenibacillus terrigena</i> cepa B241	6,47 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa 1008	6,67 x 10 <sup>5</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa Az39	3,50 x 10 <sup>5</sup>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + Micorrizas	1,13 x 10 <sup>7</sup>
<i>Acidovorax delafieldii</i> cepa A736 + Micorrizas	2,57 x 10 <sup>4</sup>
<i>Paenibacillus terrigena</i> cepa B241 + Micorrizas	3,65 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa 1008 + Micorrizas	6,90 x 10 <sup>5</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa Az39 + Micorrizas	3,53 x 10 <sup>5</sup>

## 6.4 Determinación de la identidad genética de las cepas presentes en los diferentes inoculantes bacterianos como así también la del hongo micorrízico utilizado

Para la secuencia del gen que codifica el 16S ARNr de, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paenibacillus terrigena*, *Acidovorax delafieldii* y *Pseudomonas fluorescens*, presentes en los inoculante a base de cada una de las cepas mencionadas, utilizados en el presente trabajo, (figuras: 6.7; 6.8; 6.9; 6.10; 6.11; respectivamente).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain ATCC 29145 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2656	2656	100%	0.0	100.00%	1442	<a href="#">NR_042845.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain MTCC4938 plasmid p4, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	7812	100%	0.0	99.65%	652802	<a href="#">CP932343.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain MTCC4938 plasmid p2, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	5279	100%	0.0	99.72%	824946	<a href="#">CP932341.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain MTCC4938 plasmid p1, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	7700	100%	0.0	99.65%	1757525	<a href="#">CP932340.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain MTCC4938 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	5172	99%	0.0	99.72%	3007857	<a href="#">CP932339.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain So7 plasmid ABSP7_p3, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	7812	100%	0.0	99.65%	645064	<a href="#">CP912917.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain So7 plasmid ABSP7_p2, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	5279	100%	0.0	99.65%	819020	<a href="#">CP912916.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain So7 plasmid ABSP7_p1, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	7700	100%	0.0	99.72%	1754523	<a href="#">CP912915.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Azospirillum brasilense strain So7, complete sequence</a>	<a href="#">Azospirillum brasilense</a>	2639	5172	99%	0.0	99.72%	3005726	<a href="#">CP912914.1</a>

**Figura 6.7:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen ARN16s de *Azospirillum brasilense* TFG (AZ), donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain E109, complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	5472	100%	0.0	100.00%	9224208	<a href="#">CP010313.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5079 genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	5472	100%	0.0	100.00%	9583027	<a href="#">CP007569.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone E33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bact ...</a>	2736	2736	100%	0.0	100.00%	1484	<a href="#">KC683250.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain 5038 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	5472	100%	0.0	100.00%	9226248	<a href="#">CP058354.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum USDA 6 DNA, complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	5472	100%	0.0	100.00%	9207384	<a href="#">AP012206.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain 311b6 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	2736	100%	0.0	100.00%	1481	<a href="#">NR_036865.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; rRNA-Ile and rRNA-Ala genes, com</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2736	2736	100%	0.0	100.00%	5146	<a href="#">U69638.3</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5086 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2734	2734	99%	0.0	100.00%	1488	<a href="#">KY246978.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. strain SEMIA 5081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bradyrhizobium ...</a>	2734	2734	99%	0.0	100.00%	1501	<a href="#">KY246977.1</a>

**Figura 6.8:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen ARN16s de *Bradyrhizobium japonicum* TFG (BJ), donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus terrigena strain A35 16S ribosomal RNA ,partial sequence</a>	<a href="#">Paenibacillus terrigena</a>	2747	2747	100%	0.0	100.00%	1487	<a href="#">NR_041398.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus glebae partial 16S rRNA gene ,type strain LMG 23880T</a>	<a href="#">Paenibacillus glebae</a>	2706	2706	99%	0.0	99.66%	1499	<a href="#">AM745264.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. A9 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Paenibacillus sp. A9</a>	2700	2700	99%	0.0	99.53%	1511	<a href="#">KF479528.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. strain Firmi-48 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Paenibacillus sp.</a>	2693	2693	99%	0.0	99.59%	1482	<a href="#">MH683137.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. BC2 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Paenibacillus sp. BC2</a>	2687	2687	98%	0.0	99.59%	1476	<a href="#">JN975195.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. JS15-08 partial 16S rRNA gene</a>	<a href="#">Paenibacillus sp. JS15-08</a>	2673	2673	99%	0.0	99.19%	1504	<a href="#">AM162299.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. YN14-07 partial 16S rRNA gene</a>	<a href="#">Paenibacillus sp. YN14-07</a>	2669	2669	99%	0.0	98.99%	1494	<a href="#">AM162323.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Paenibacillaceae bacterium clone C.la-118 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured Paenibacillaceae bacterium clone C.la-118</a>	2652	2652	98%	0.0	99.25%	1469	<a href="#">JX505002.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paenibacillus sp. S18-36 partial 16S rRNA gene</a>	<a href="#">Paenibacillus sp. S18-36</a>	2647	2647	99%	0.0	98.79%	1495	<a href="#">AM152313.1</a>

**Figura 6.9:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen ARN16s de *Paenibacillus terrigena* TFG (PT), donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.

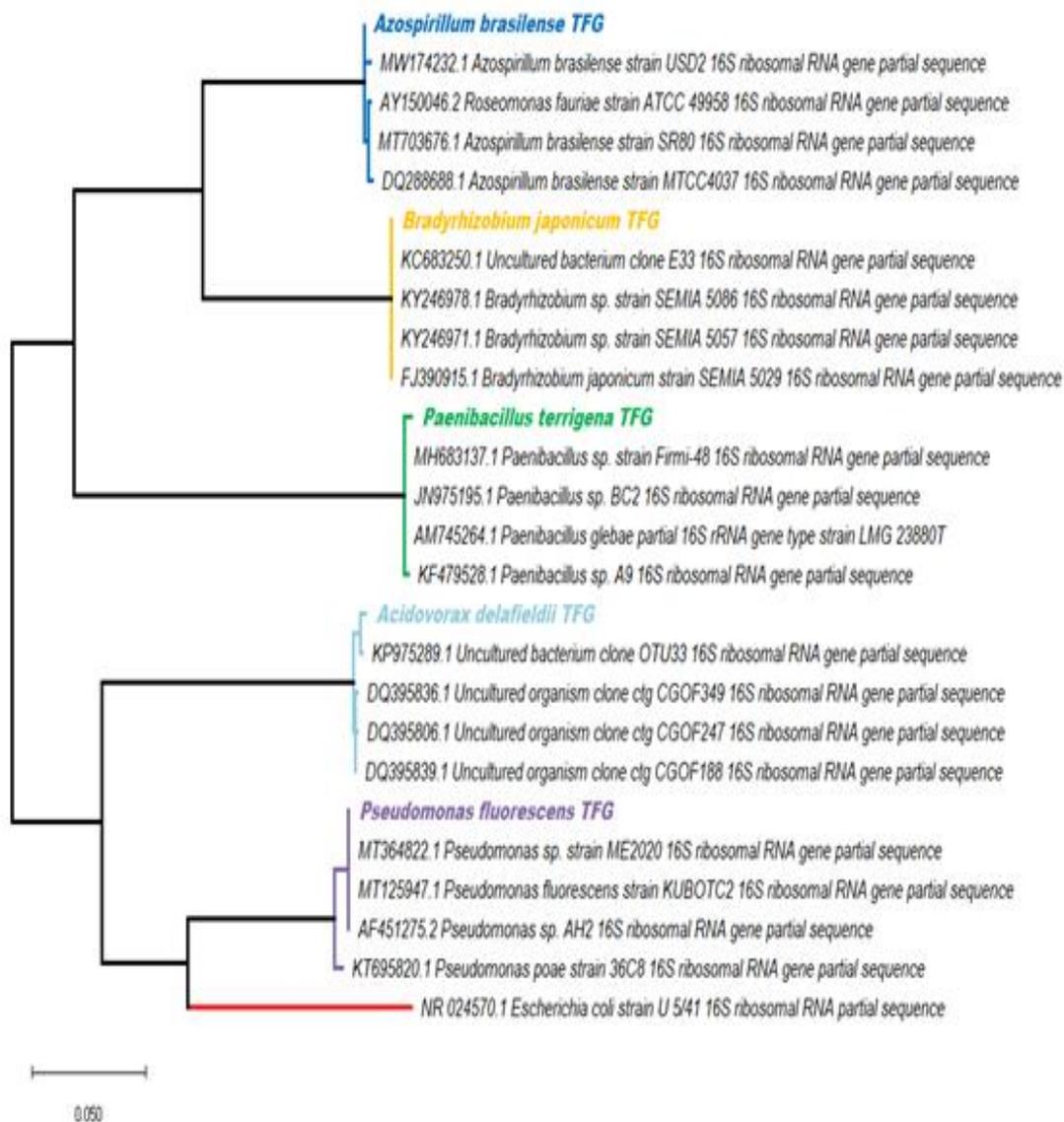
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax delafieldii strain 133 16S ribosomal RNA ,partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax delafieldii</a>	2796	2796	100%	0.0	100.00%	1515	<a href="#">NR_028714.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured organism clone ctg_CGOF188 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured organism</a>	2730	2730	99%	0.0	99.27%	1527	<a href="#">DQ395839.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone OTU33 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	2726	2726	98%	0.0	99.73%	1488	<a href="#">KP975289.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax sp. KKS102 ,complete genome</a>	<a href="#">Acidovorax sp. KKS102</a>	2724	8174	99%	0.0	99.21%	5196935	<a href="#">CP003872.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured organism clone ctg_CGOF349 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured organism</a>	2724	2724	99%	0.0	99.21%	1527	<a href="#">DQ395836.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured organism clone ctg_CGOF247 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured organism</a>	2724	2724	99%	0.0	99.21%	1527	<a href="#">DQ395806.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured organism clone ctg_CGOF293 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured organism</a>	2724	2724	99%	0.0	99.21%	1527	<a href="#">DQ395682.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax sp. BSB421 16S rRNA gene</a>	<a href="#">Acidovorax sp. BSB421</a>	2723	2723	99%	0.0	99.14%	1526	<a href="#">Y18617.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone S32 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	2719	2719	99%	0.0	99.14%	1525	<a href="#">JN868734.1</a>

**Figura 6.10:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen ARN16s de *Acidovorax delafieldii* TFG (AD), donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas sp. strain MF2020 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas sp.</a>	2820	2820	100%	0.0	100.00%	1527	<a href="#">MT364822.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain KUJOTC2 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2820	2820	100%	0.0	100.00%	1527	<a href="#">MT125947.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain IAM 12022 16S ribosomal RNA ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2820	2820	100%	0.0	100.00%	1527	<a href="#">NR_043420.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas sp. AH2 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas sp. AH2</a>	2787	2787	99%	0.0	99.80%	1520	<a href="#">AF451275.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain PPA42 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2784	2784	98%	0.0	100.00%	1509	<a href="#">MT300520.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain K13 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2776	2776	99%	0.0	99.67%	1525	<a href="#">MG920682.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone W2-16 16S ribosomal RNA gene ,partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	2776	2776	100%	0.0	99.48%	1529	<a href="#">FJ545601.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain NCTC10938 genome assembly ,chromosome_1</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2771	16615	100%	0.0	99.41%	6515171	<a href="#">LS483372.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pseudomonas fluorescens strain ATCC 13525 genome assembly ,chromosome_1</a>	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	2771	16615	100%	0.0	99.41%	6511547	<a href="#">LT907842.1</a>

**Figura 6.11:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen ARN16s de *Pseudomonas fluorescens* TFG (PF), donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.

Luego se realizó una búsqueda de secuencias coincidentes para realizar un alineamiento múltiple, se obtuvo el árbol filogenético de la figura 6.12. Se observó un árbol enraizado, gracias a las secuencias del gen que codifica el 16S ARNr de *Escherichia coli*, que se utilizó como outgroup. Se pudo observar que la secuencia de *Azospirillum brasilense* TFG se correlacionó con otros géneros de *Azospirillum* presentes en la base de datos utilizada. En cuanto a la secuencia de *Bradyrhizobium japonicum* analizada (*Bradyrhizobium japonicum* TGF) se correlacionó con las restantes secuencias de *Bradyrhizobium* presentes en la base de datos utilizada. La secuencia de *Paenibacillus terrigena* TFG se pudo observar que se correlaciona con secuencias de *Paenibacillus* obtenidas en la base de datos. En tanto a la secuencia de *Acidovorax delafieldii* TFG, se observó que la secuencia se correlacionó con secuencias de *Acidovorax* obtenidas en la base de datos utilizada. Por último, La secuencia analizada de *Pseudomonas fluorescens* TFG se correlacionó con secuencias tanto de *Pseudomonas sp.*, como con secuencias de *Pseudomonas fluorescens*, presentes en la base de datos.

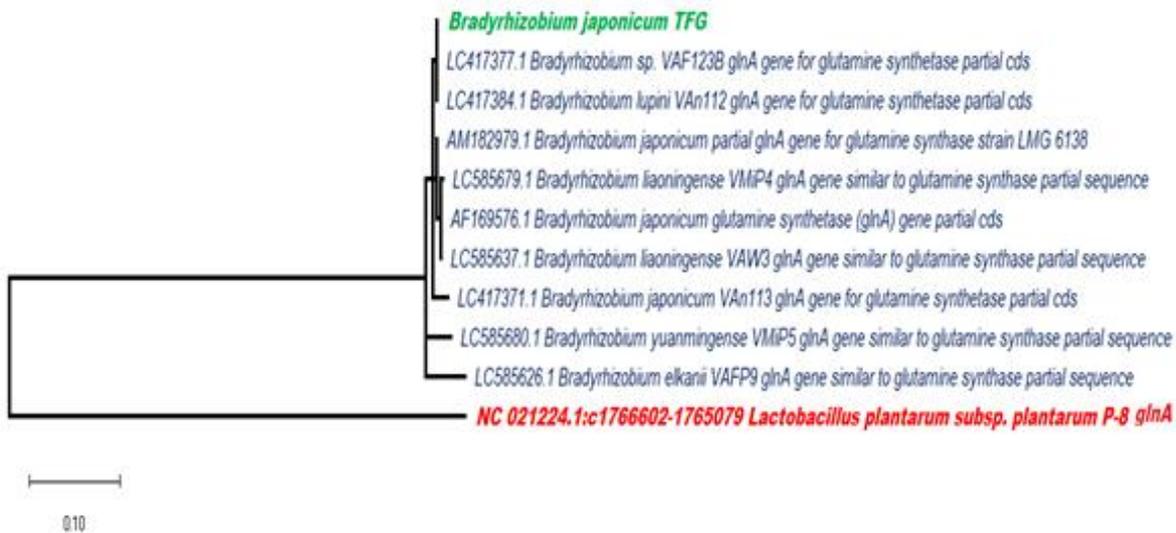


**Figura 6.12:** Árbol filogenético generado mediante la metodología ML a partir de las secuencias del gen ARN 16s analizado para las especies pertenecientes a PGPR. Utilizando como outgroup *Escherichia coli*.

En tanto que para la cepa de *Bradyrhizobium japonicum* TFG, además del gen ARNr 16S, se secuenció el gen GlnA (Fig. 6.13) y recA (Fig. 6.15). También se realizó un análisis con el programa Blast N. para dilucidar la identidad de la misma. Y hacer una búsqueda de secuencias coincidentes para realizar un alineamiento múltiple, y sus respectivos árboles filogenéticos (Fig. 6.14 y Fig. 6.16), utilizando como outgroup *Lactobacillus plantarum* para *GlnA* y *Termus thermophilus* para *RecA*. Observamos que para ambos genes se observa una correlación entre *Bradyrhizobium japonicum* TFG y las restantes secuencias obtenidas en la base de datos para ambos genes.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum VAF1269 glnA gene for glutamine synthetase .partial.cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum</a>	1033	1033	100%	0.0	100.00%	559	<a href="#">LC417385.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. VAF1238 glnA gene for glutamine synthetase .partial.cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium sp.</a>	1031	1031	99%	0.0	100.00%	558	<a href="#">LC417377.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum SEMA 5079 genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum SE...</a>	1031	1031	99%	0.0	100.00%	9583027	<a href="#">CP007569.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium lupini VAn112 glnA gene for glutamine synthetase .partial.cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium lupini</a>	1027	1027	99%	0.0	100.00%	558	<a href="#">LC417384.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain E109 .complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum</a>	1009	1009	99%	0.0	99.28%	9224208	<a href="#">CP010313.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain 5038 chromosome .complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum</a>	1009	1009	99%	0.0	99.28%	9226248	<a href="#">CP058354.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum USDA 5 DNA .complete genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum US...</a>	1009	1009	99%	0.0	99.28%	9207384	<a href="#">AP012206.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum partial glnA gene for glutamine synthase .strain LMG 6138</a>	<a href="#">Bradyrhizobium japonicum</a>	1007	1007	99%	0.0	99.28%	977	<a href="#">AM182979.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium liaoningense VAW7 glnA gene .similar to glutamine synthase .partial sequence</a>	<a href="#">Bradyrhizobium liaoningense</a>	990	990	99%	0.0	98.74%	557	<a href="#">LC505637.1</a>

**Figura 6.13:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen GlnA de *Bradyrhizobium japonicum* TFG, donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.



**Figura 6.14:** Árbol filogenético generado mediante la metodología ML a partir de las secuencias del gen GlnA analizado para *Bradyrhizobium japonicum* TFG. Utilizando como outgroup *Lactobacillus plantarum*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain CCBAU.83626 RecA (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	937	937	100%	0.0	100.00%	507	<a href="#">EU169224.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. CCBAU.83386 RecA (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	924	924	98%	0.0	100.00%	505	<a href="#">EF549474.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum strain CCBAU.83623 RecA (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	924	924	99%	0.0	99.60%	509	<a href="#">EU169223.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum bv. glycinearum strain X3-1 recombination protein A (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	900	900	96%	0.0	100.00%	511	<a href="#">AY591556.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. G22 genome assembly chromosome 1</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	881	881	100%	0.0	98.03%	9022917	<a href="#">LN907826.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. strain YIC1741 recombination protein (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	881	881	100%	0.0	98.03%	576	<a href="#">MW528325.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium sp. SEMIA.5046 recombinase A (recA) gene partial cds</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	876	876	93%	0.0	100.00%	580	<a href="#">KY607988.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone S15_FerulicAcidPickedCol_4 genomic sequence</a>	<a href="#">uncultured bact...</a>	876	876	100%	0.0	97.83%	4704	<a href="#">KT942807.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Bradyrhizobium japonicum SEMIA.5079 genome</a>	<a href="#">Bradyrhizobium...</a>	876	876	100%	0.0	97.83%	9583027	<a href="#">CP007569.1</a>

**Figura 6.15:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen RecA de *Bradyrhizobium japonicum* TFG, donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.



**Figura 6.16:** Árbol filogenético generado mediante la metodología ML a partir de las secuencias del gen RecA analizado para *Bradyrhizobium japonicum* TFG. Utilizando como outgroup *Thermus thermophilus*.

Por último para la cepa del hongo micorrízico *Rizophagus intrarradice* TFG, se hizo el secuenciamiento de los genes 18S, se realizó un análisis con el programa Blast N. para dilucidar la identidad del mismo. Y hacer una búsqueda de secuencias coincidentes para realizar un alineamiento múltiple (Fig. 6.18), y el árbol filogenético (Fig. 6.19), utilizando como outgroup *Wongia fusiformis*, se correlacionó con secuencias tanto de *Glomus*, como con secuencias de *Rizophagus*, presentes en la base de datos.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Pct Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhizophagus intraradices genomic DNA containing 18S rRNA gene ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2706	2706	100%	0.0	100.00%	1465	HE817879.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2575	2575	100%	0.0	98.36%	1545	FM0655602
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2575	2575	100%	0.0	98.36%	1544	FM0655603
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2575	2575	100%	0.0	98.36%	1545	FM0655587
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2575	2575	100%	0.0	98.36%	1544	FM065579
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2575	2575	100%	0.0	98.36%	1543	FM065574
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2569	2569	100%	0.0	98.30%	1543	FM065581
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2569	2569	100%	0.0	98.30%	1546	FM065572
<input type="checkbox"/> <a href="#">Glomus intraradices 18S rRNA gene (partial) ITS1 5.8S rRNA gene ITS2 and 28S rRNA gene (partial) isolat...</a>	<a href="#">Rhizophagus intr...</a>	2560	2560	100%	0.0	98.16%	1548	FM065575

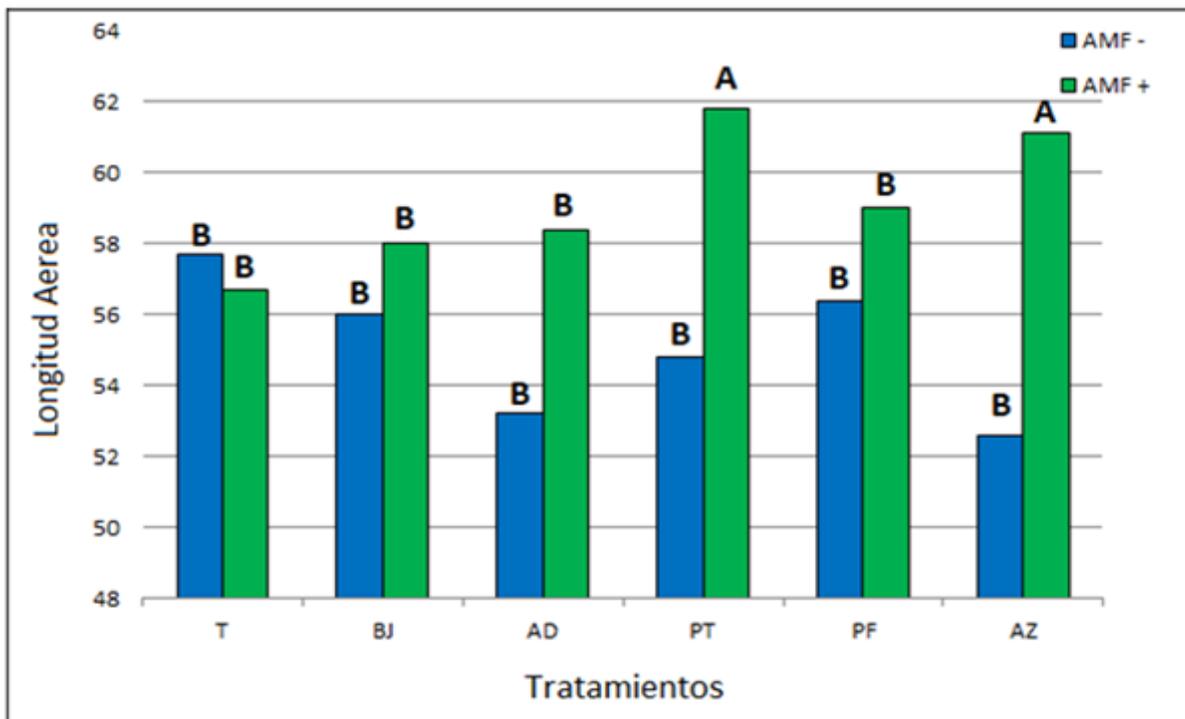
**Figura 6.17:** Resultado del análisis con el algoritmo BLASTn para la secuencia del gen 18s de *Rizophagus intrarradice* TFG, donde se seleccionaron las secuencias con mayor identidad para realizar el árbol filogenético.



**Figura 6.18:** Árbol filogenético generado mediante la metodología ML a partir de las secuencias del gen 18s analizado para *Rizophagus intrarradice* TFG. Utilizando como outgroup *Wongia fusiformis*.

## 6.5 Estudiar el efecto sobre los parámetros vegetativos del desarrollo del cultivo, de la aplicación individual y la coinoculación de los productos biológicos.

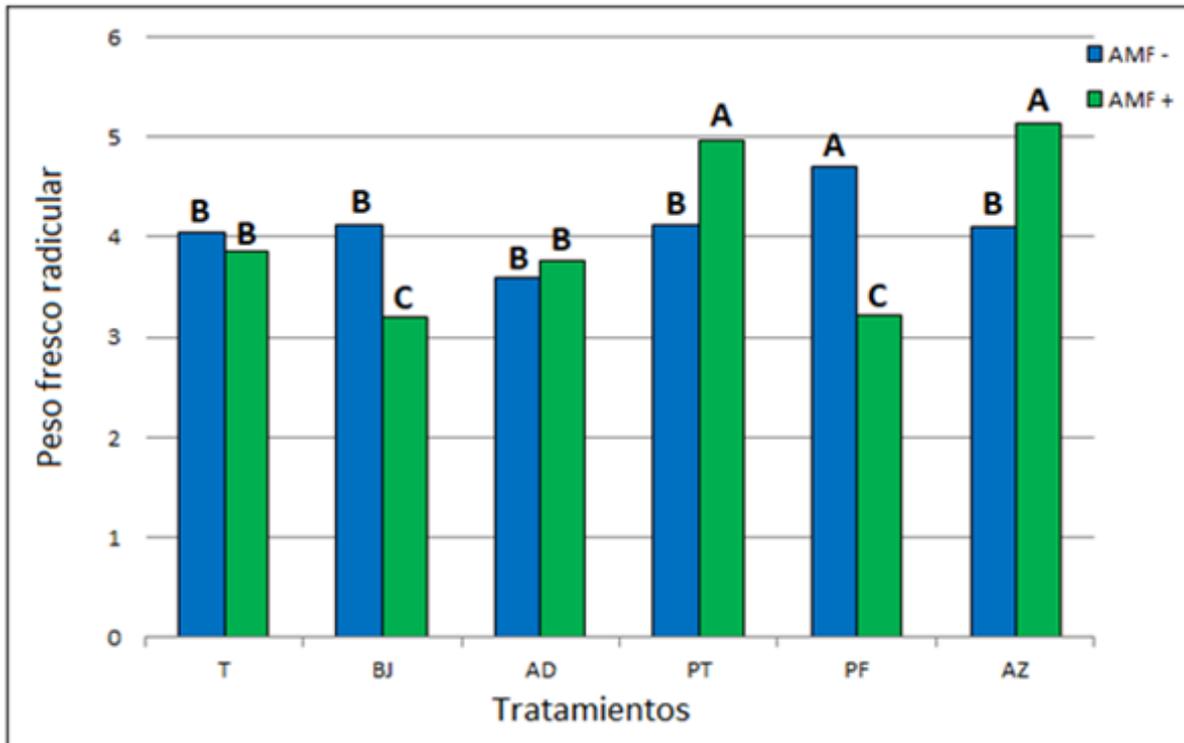
El análisis estadístico mostró los siguientes resultados al comparar los parámetros vegetativos de plantas en los distintos tratamientos probados. En cuanto a la longitud aérea, se observó que las plantas inoculadas con *Paenibacillus terrigena* cepa B241 + Micorrizas y *Azospirillum brasilense* cepa Az39 + Micorrizas fueron estadísticamente mayor que en todos los tratamientos restantes, donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos.



**Figura 6.19:** Longitud Aérea de plantas en distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ )

En lo referido a longitud radicular, peso fresco aéreo y volumen radicular no se presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (análisis estadísticos en anexos 10.5).

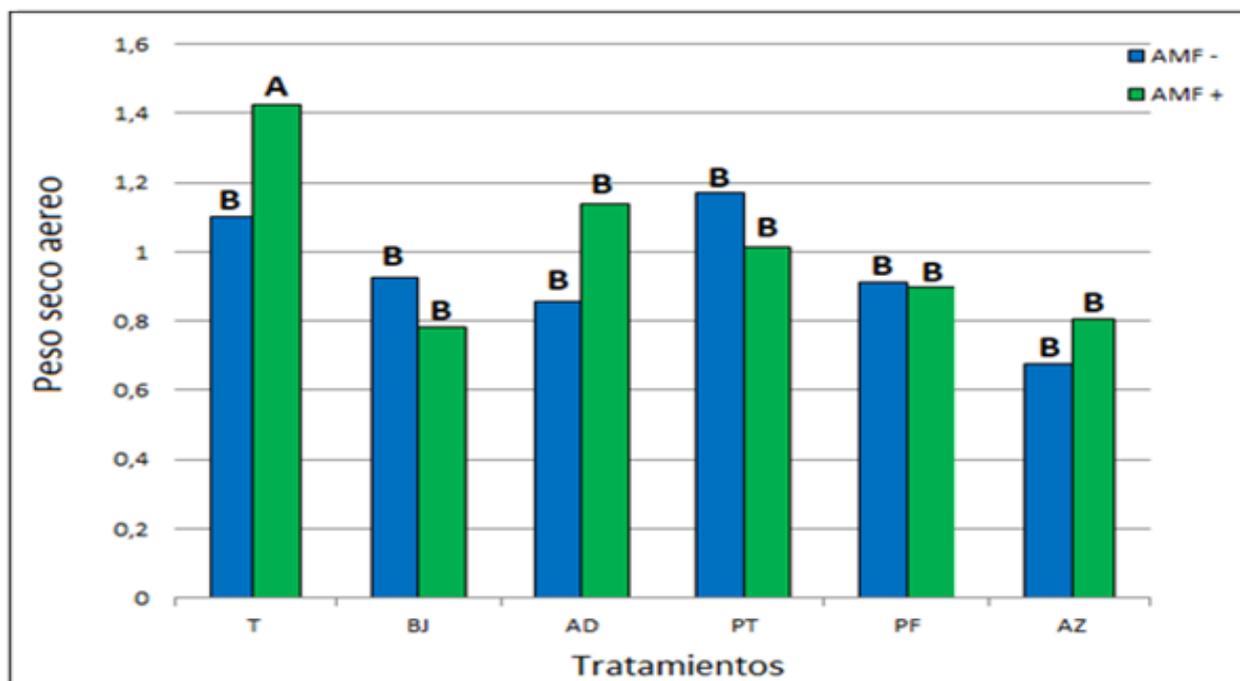
Respecto al peso fresco radicular, se vió que al comparar las plantas tratadas con *Azospirillum brasilense* + Micorrizas, *Paenibacillus terrigena* + Micorrizas y *Pseudomonas fluorescens* en contraste con los tratamientos con *Bradyrhizobium japonicum*, *Acidovorax delafieldii*, *Paenibacillus terrigena*, *Azospirillum brasilense* y *Acidovorax delafieldii* + Micorrizas, los primeros presentaron un aumento significativo de peso fresco radicular, notándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en tanto que en los tratamientos con *Pseudomonas fluorescens* + Micorrizas y *Bradyrhizobium japonicum* + Micorrizas, se observó una disminución estadísticamente significativa de este parámetro vegetativo, en relación con los demás tratamientos.



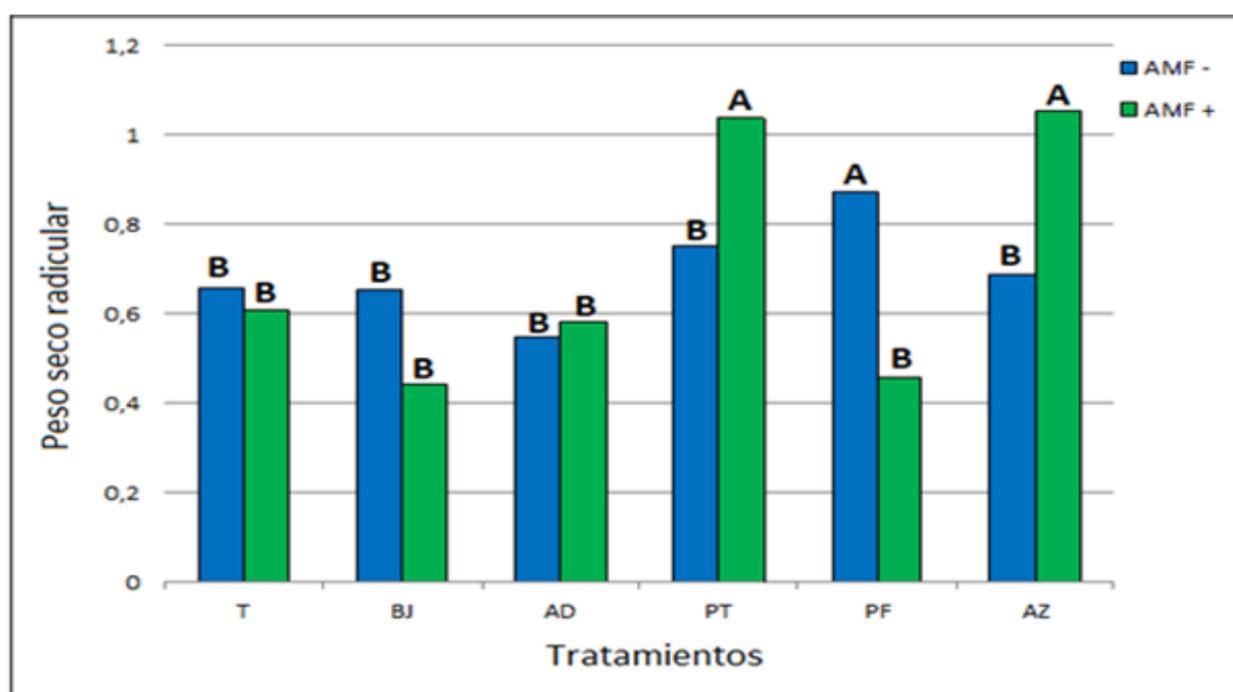
**Figura 6.20:** Peso fresco radicular de plantas en distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En cuanto al peso seco aéreo, se observó que el tratamiento con el testigo positivo (Micorriza), presentó un aumento estadísticamente significativo en este parámetro, en contraste con los demás tratamientos (Figura 6.21).

En tanto que el peso seco radicular, los tratamientos con *Azospirillum brasilense* + Micorrizas, *Paenibacillus terrigena* + Micorrizas y *Pseudomonas fluorescens*, presentaron un aumento en dicho parámetro, observándose diferencias estadísticamente significativas entre estos y los restantes tratamientos (Figura 6.22).

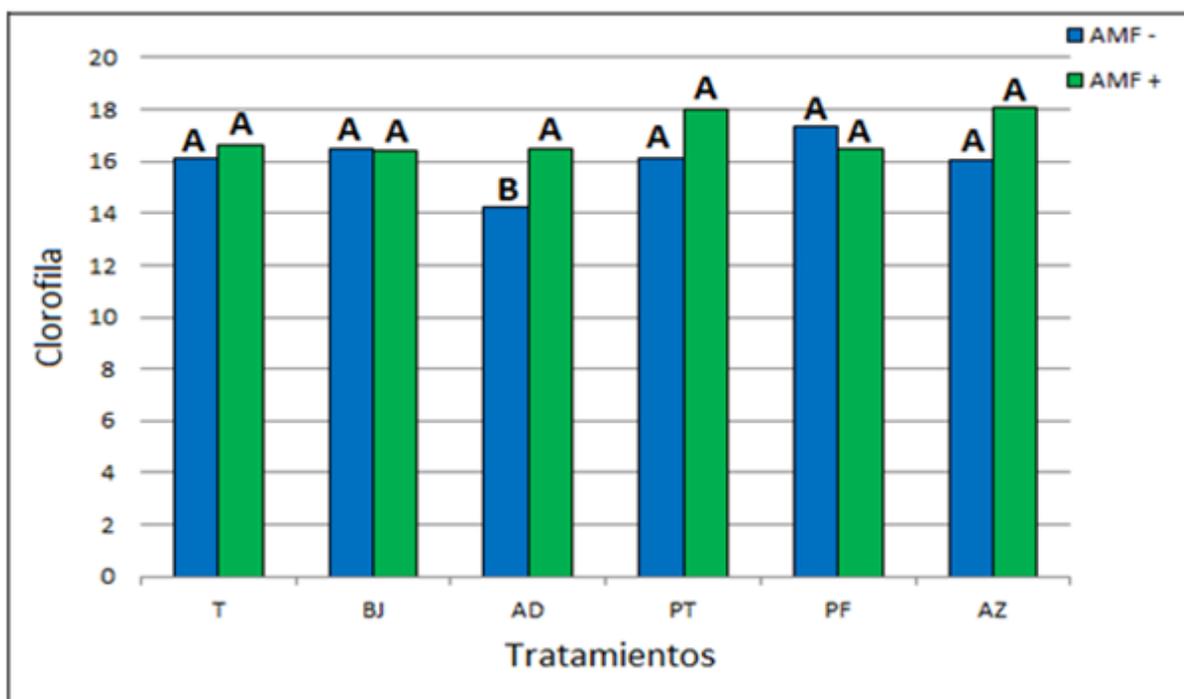


**Figura 6.21:** Peso seco aéreo de plantas en distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 6.22:** Peso seco radicular de plantas en distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Por último en cuanto a clorofila medida en la hoja bandera a cada lado del nervio central, se observó que todos los tratamientos tuvieron un comportamiento similar, salvo el tratamiento con *Acidovorax delafieldii*, donde se observó una disminución estadísticamente significativa entre este y los demás tratamientos.

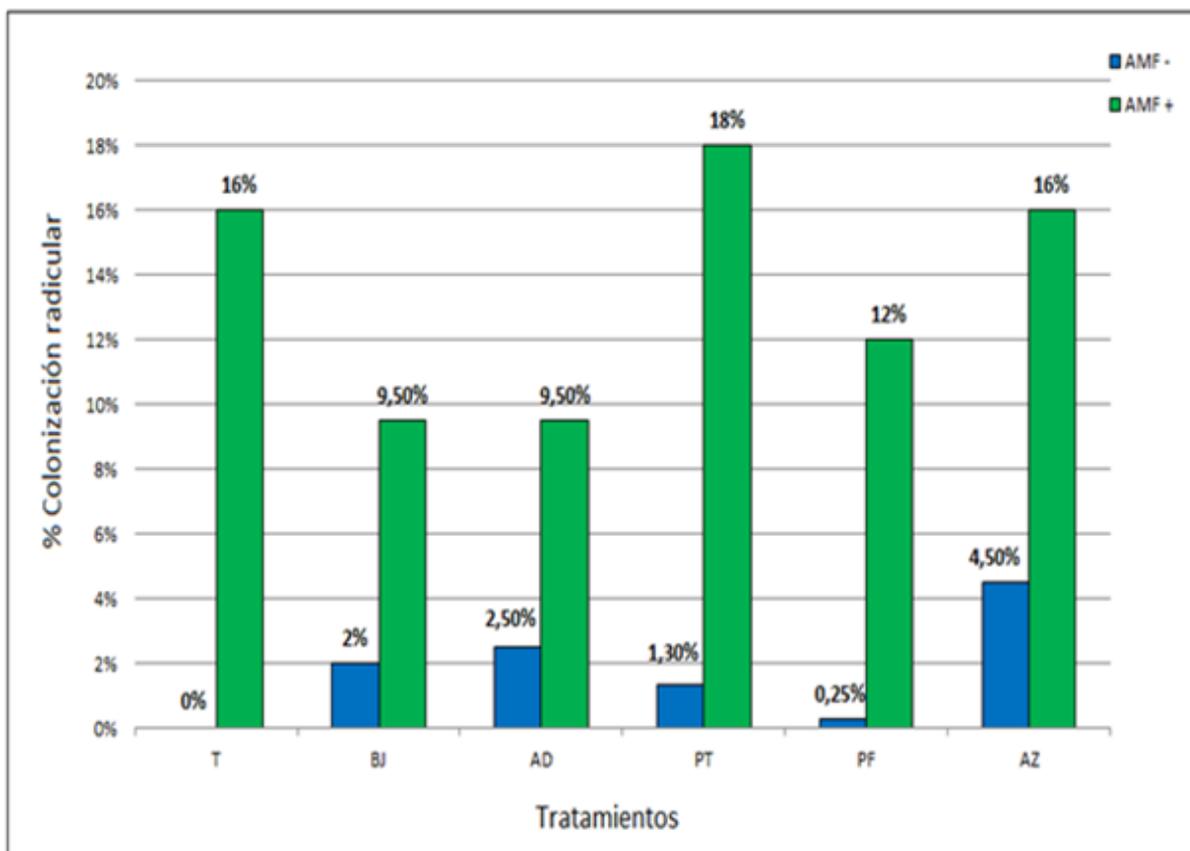


**Figura 6.23:** Clorofila de plantas en distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF. Medias con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

## 6.6 Efecto de coinoculación sobre la colonización micorrízica

Luego de realizar las observaciones al microscopio para determinar el porcentaje de infección por HMA en los distintos tratamientos, se observa que el tratamiento de coinoculación con *Paenibacillus terrigena* y HMA con un 18 % de colonización radicular, fue el que poseía mayor porcentaje de infección. Luego le siguieron los tratamientos de coinoculación con *Azospirillum brasilense* y HMA 16% y el testigo con HMA con 16 %.

Los tratamientos inoculados con *Pseudomonas fluorescens* y HMA, *Bradyrhizobium japonicum* y HMA, y *Acidovorax delafieldii* y HMA, presentaron niveles de infección de entre 9 % y 12 %. Por último, los tratamientos restantes, aunque no estuvieron tratados con HMA mostraron un bajo porcentaje de infección (La presencia del bajo porcentaje de raíces colonizadas por hongos micorrízicos que no fueron inoculadas con HMA podría deberse a la sobrevivencia, de hongos naturalizados, en el suelo).



**Figura 6.24:** Porcentaje de colonización radicular por AMF en los distintos tratamientos. T= testigo; BJ= *Bradyrhizobium japonicum*; AD= *Acidovorax delafieldii*; PT= *Paenibacillus terrigena*; PF= *Pseudomonas fluorescens*; AZ= *Azospirillum brasilense*; AMF-= sin coinoculación de AMF; AMF+= coinoculación de AMF.

## 7. DISCUSIÓN

Con respecto a la puesta a punto del sistema de siembra, riego y desarrollo del cultivo de maíz en Cone-tainers<sup>TM</sup>, el resultado fue exitoso. El protocolo de desinfección de semillas fue descartado dado que los resultados no fueron los esperados y así mismo esto no sería lo que pasa en una situación real a campo.

En el ensayo de elección del mejor sustrato se evaluó el uso de diferentes sustratos y las características vegetativas de plantas de maíz en condiciones de cámara de crecimiento.

La morfología del sistema radical de un cultivo está definida por la genética, mientras que las condiciones físicas del suelo modifican la distribución espacial de las mismas (Barrios *et al.*, 2014). Sabiendo que en los distintos sustratos se sembraron semillas de maíz del mismo híbrido, se descarta la influencia genética en las diferencias estadísticamente significativas observadas en los parámetros vegetativos entre distintos sustratos.

El crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales produce un aumento de la superficie de absorción de las plantas, lo que favorece el intercambio de nutrientes. Muchos autores han reportado la capacidad de las PGPRs de potenciar estos cambios morfológicos en los sistemas radiculares de los cultivos (Kapulnik *et al.*, 1985; de-Bashan *et al.*, 2007; Spaepen *et al.*, 2008).

La radícula y las raíces seminales son fundamentales hasta que la planta alcanza tres hojas, estado en que la presencia de raíces principales es aún muy escasa. Al estado de cuatro hojas las raíces primarias dejan de crecer y van perdiendo gradualmente su importancia, luego de la emergencia del coleóptilo, el crecimiento del sistema de raíces seminales disminuye y luego se detiene aproximadamente en V3, por ello es importante evaluar el crecimiento radicular en los primeros estadios del cultivo, por lo que los datos obtenidos en los ensayos a los 28-35 días desde la siembra son de suma importancia (Troyer, 2009).

Las plantas implantadas en el sustrato suelo presentaron una longitud radicular significativamente mayor que las implantadas en los otros tres sustratos evaluados. Se sabe que el crecimiento de las raíces está influenciado por la densidad aparente, porosidad, aireación, agua, temperatura, materia orgánica

(Barrios *et al.*, 2014). Dicha observación se corresponde con la disminución en el aporte de nutrientes, mayor aireación, menor retención de agua y nula materia orgánica por parte de los sustratos inertes (arenas y perlita). En cuanto a la parte aérea las plantas implantadas en suelo-arena, suelo-arena-perlita, presentan una longitud significativamente mayor que las implantadas en suelo, y a su vez con las implantadas en arena gruesa-arena fina, compensando de esta manera la menor longitud radicular. Cuando se evaluó la masa, tanto fresca como seca, se observó que la biomasa producida en el sustrato arena gruesa-arena fina es en todos los casos significativamente menor estadísticamente. Esto indica un mejor desarrollo del cultivo en los sustratos restantes, seguramente debido a las características poco favorables del sustrato arena. En general, la arena tiene baja capacidad de retención de humedad (16 % a capacidad de campo y 11 % a punto de marchitamiento permanente) (Porta *et al.*, 1999), y retiene agua disponible fácilmente, pero la pierde rápidamente (Segura Castruita *et al.* 2008). Por lo tanto la decisión de seguir con el sustrato suelo fue lo más adecuado, dado que presentó los valores más altos en la mayoría de los parámetros vegetativos en estudio (tabla de anexo 10.5), y estructuralmente le da un mejor soporte al cultivo.

El inoculante en base de *Bradyrhizobium japonicum* contenía  $1,2 \times 10^{10}$  ufc/ml, superando de ésta manera a lo indicado por el fabricante, de  $1 \times 10^{10}$  ufc/mL a la fecha de elaboración y  $1 \times 10^9$  ufc/mL a la fecha de vencimiento. En cuanto a la resolución-264-2011-SENASA, establece en el capítulo 3 referido al registro de productos, en el ítem D fertilizantes biológicos, concentración mínima para productos formulados en base a *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* de  $1 \times 10^8$  ufc / ml al vencimiento, por lo que el inoculante utilizado superó ampliamente dicha cantidad.

En el caso del inoculante en base a *Pseudomonas fluorescens* contenía  $1,03 \times 10^9$  ufc/ml, en concordancia a lo indicado por el fabricante, de  $1 \times 10^9$  ufc/mL a la elaboración,  $1 \times 10^8$  ufc/mL al vencimiento.

El inoculante en base a *Azospirillum brasilense* contenía  $6,47 \times 10^8$  ufc/ml, superando de esta manera a lo indicado en la resolución-262-2011-SENASA, donde se describe como requerimiento para el registro de productos una concentración mínima para los productos al vencimiento de  $1 \times 10^7$  ufc / ml.

Con respecto a los inoculantes formulados en base a *Acidovorax delafieldii* y *Paenibacillus terrigena*, con  $1,54 \times 10^9$  ufc/ml y  $1,40 \times 10^8$  ufc/ml respectivamente, se consideran títulos adecuados para su utilización.

En cuanto a la recuperación de bacterias viables sobre semillas, las concentraciones encontradas se consideraron adecuadas para continuar con los ensayos.

En relación a la corroboración de la identidad genética de las secuencias de ADN de las cepas evaluadas, mediante la búsqueda de secuencias coincidentes, el alineamiento múltiple y la generación de árboles filogenéticos se pudo observar, a nivel de especie, la identidad de las cepas analizadas. La información obtenida por medios bioinformáticos coincidió con la brindada por el fabricante, en el caso de las cepas utilizadas. La colonización de hongos formadores de micorrizas puede afectar a las poblaciones microbianas de la rizósfera directa o indirectamente, a través de cambios en los exudados de la raíz (cuantitativa y cualitativamente), lo que se conoce como “efecto de micorrizósfera” (Linderman, 1992). La colonización por HMA puede aumentar, no afectar o disminuir el número total de bacterias en la rizósfera (Christensen y Jakobsen, 1993). Balota *et al.* (1995) describieron la estimulación del establecimiento de HMA en raíces por parte de bacterias productoras de ácido indol-3-acético (auxina más conocida). Este efecto se relaciona con la capacidad de los compuestos que promueven el crecimiento de estimular la susceptibilidad de las plantas a la colonización micorrízica, germinación de esporas o crecimiento de micelio, aumentando así la posibilidad de contacto entre hifas fúngicas y raíces, y en consecuencia aumentar el establecimiento de HMA.

Lo dicho anteriormente se aplica al caso de *Azospirillum brasilense*, que produce reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, óxido nítrico y poliaminas (Prinsen *et al.*, 1993; Cassán *et al.*, 2009).

La mayor proporción de nitrógeno en los ecosistemas terrestres y acuáticos proviene de la fijación biológica, FBN (Roesch *et al.*, 2008). La integración de FBN a la producción de cultivos mejoraría la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, como maíz. A la relación biológica entre raíz y bacterias diazotróficas que realizan FBN, se conoce como asociación rizosférica o endofítica (Montañéz *et al.*, 2008).

Es el caso de *Azospirillum* (Lodewyckx *et al.*, 2002), que se establece y alimenta en la raíz (Akello *et al.*, 2008; El-Tarabily *et al.*, 2009) y suministra nitrógeno a la planta (Mayz-Figueroa 2004, Bashan y de-Bashan 2010). *Azospirillum* es la rizobacteria de importancia para mejorar crecimiento o rendimiento de cultivos, bajo diversos ambientes y condiciones edáficas (Bashan *et al.* 2004). *Azospirillum brasilense* ha sido exitosa, pues se reportaron incrementos mayores al 30 %, en la producción de grano y materia seca de cultivos tales como maíz y trigo (Holguin *et al.* 2003). Lo que concuerda con lo obtenido en el estudio de colonización radicular por HMA, donde uno de los mayores porcentajes de infección se obtuvo en el tratamiento con *Azospirillum brasilense* + HMA.

Se ha demostrado que la inoculación de gramíneas, incluido el maíz, con especies de bacterias diazotrofas producen aumentos en la producción, más allá de que no se confirme que ese aumento sea debido al aporte de N por fijación biológica o por otro mecanismo de promoción del crecimiento (Kennedy, 2004; Ahmand, 2006; Jha y Kumar, 2009) concordando con que los mejores resultados en cuanto a parámetros vegetativos estudiados y porcentaje de coinoculación con HMA sean los tratamientos de *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA.

Vosátka y Gryndler (1999) plantean que el uso de inoculante en base a microorganismos de vida libre como biocontrol, como es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, da la posibilidad de que los antagonistas fúngicos interactúen no solo con hongos patógenos, sino también con HMA. Aunque también plantean que los inoculantes a base de *Pseudomonas* pueden estimular la colonización de las micorrizas. Además, se sabe que *Pseudomonas sp.* Produce metabolitos secundarios (O'Sullivan y O'Gara, 1992), que mejoran el crecimiento de HMA por lo que mejora la colonización radicular.

En adhesión a lo anteriormente mencionado, en los ensayos realizados en este trabajo, las raíces de las plantas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* + HMA, mostraron un porcentaje de colonización radicular por HMA de 12 %. Los tratamientos con *Bradyrhizobium japonicum* + HMA y *Acidovorax delafieldii* + HMA fueron los que presentaron menor porcentaje de coinoculación, siendo también los que tuvieron una merma en la mayoría de los parámetros vegetativos analizados. La presencia del bajo porcentaje de raíces colonizadas por hongos

micorrízicos que no fueron inoculadas con HMA podría deberse a la sobrevivencia, de hongos naturalizados, en el suelo pasteurizado.

La relación entre la inoculación con PGPR y la clorofila se encuentra en la fijación biológica de nitrógeno, que es responsable del aumento de verdor en las hojas (Cabrera, 2004) y el verdor de las hojas de una planta es un indicador de la mejora en el contenido de clorofila (Bojović y Marković, 2009). Dado que el nitrógeno es un elemento estructural de la clorofila, su disponibilidad da como resultado un aumento en el contenido de clorofila. En este trabajo, en todos los tratamientos (a excepción del tratamiento con *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA) al coinocular con HMA se observó una tendencia estadísticamente no significativa a disminuir los parámetros vegetativos (especialmente en longitud aérea) con respecto a los no inoculados con HMA.

Respecto al desarrollo radicular, tanto para la longitud como para el volumen, no se observó diferencias estadísticamente significativas al comparar las plantas, pero si hubo un mejor comportamiento en cuanto a peso seco y fresco radicular. Sin embargo en cuanto a los parámetros aéreos medidos, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo los tratamientos con *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA los de mejor y más regular comportamiento. Teniendo en cuenta que una planta que posee un sistema radicular más corto y menos prolífero es capaz de explorar menos volumen de suelo para la obtención de agua y nutrientes. Una menor longitud de raíces por unidad de volumen de suelo o una menor densidad radicular requieren que la tasa de absorción de agua y nutrientes se mantengan más elevadas de lo normal a fin de satisfacer las demandas (Bennie, 1991). Por lo cual se puede decir que los tratamientos de coinoculación al no presentar una diferencia estadísticamente significativa en parámetros radiculares, el incremento en parámetros aéreo podría estar establecido por ventajas otorgadas por ciertas PGPR en coinoculación con el hongo micorrízico. Encontrando en los tratamientos con *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA resultados radiculares similares a los otros tratamientos, pero mejorando notablemente los parámetros aéreos y mostrando el mayor porcentaje de infección radicular por HMA, así mismo los parámetros radiculares obtenidos son buenos y en su mayoría superiores o iguales al testigo, por lo tanto estos darán un mejor soporte,

una mayor exploración de suelo y una mayor reposición de carbono (en combinación con la biomasa aérea), y a su vez otorgaran beneficios para una mayor biomasa y formación de granos, siendo estos otorgados por la interacción PGPR y HMA.

Por otro lado, se sabe que los HMA proporcionan a la planta hospedante nutrientes minerales y agua, a cambio de productos fotosintéticos (Smith y Read, 2008). Además, las hifas fúngicas son mucho más delgadas que las raíces y, por lo tanto, pueden penetrar poros más pequeños (Allen, 2011). Los carbohidratos y los nutrientes minerales se intercambian dentro de las raíces a través de la interfaz entre la planta y el hongo. Las hifas fúngicas colonizan la raíz y forman arbúsculos, que se consideran el sitio funcional de intercambio de nutrientes (Balestrini *et al.*, 2015). Por lo tanto, los HMA pueden aliviar la limitación en el crecimiento de las plantas causada por un suministro inadecuado de nutrientes (Nouri *et al.*, 2014). Por lo que, en el tratamiento con *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA, la mejoría de un sistema aéreo en comparación con los demás tratamientos, un mayor porcentaje de infección, teniendo todos parámetros radiculares similares, podría decirse que, en este caso en particular, los HMA están aportado al sistema radicular la capacidad de captar y asimilar mejor los nutrientes y agua. En los tratamientos restantes no se encontró una evidente relación entre sistema aéreo y sistema radicular como en lo anteriormente mencionado.

Este estudio deja muy buenos resultados de cara al futuro, dado que la coinoculación de ciertas PGPR con HMA dieron un aumento estadísticamente significativo en los parámetros vegetativos en cuestión, en especial los tratamientos con *Paenibacillus terrigena* + HMA y *Azospirillum brasilense* + HMA, siendo estas las que mejores resultados mostraron en parámetros vegetativos aéreos, manteniendo buenos resultados radiculares.

Dilucidándose un posible aumento en el rendimiento, biomasa del cultivo y aportes a la estructura del suelo, y nutrientes, gracias a la coinoculación de estos microorganismos.

## 8. CONCLUSIONES

La puesta a punto del sistema de siembra, riego y desarrollo del cultivo de Maíz en Cone-tainers™ se llevó a cabo con éxito, dejando un protocolo estandarizado para el uso de Cone-tainers™ en el cultivo de Maíz. El sustrato seleccionado para continuar con los ensayos en este sistema fue el suelo libre de *Bradyrhizobium sp.*

Los tratamientos con PGPR sin coinoculación con HMA no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento control.

En tanto que los tratamientos de PGPR coinoculado con HMA, específicamente los tratamientos de *Paenibacillus terrigena* + Micorrizas y *Azospirillum brasilense* + Micorrizas dieron diferencias estadísticamente significativas, dando como resultado el mayor porcentaje de infección radicular por HMA, y también los parámetros vegetativos más significativos en el cultivo de Maíz.

Notándose un aumento en el desempeño del sistema radicular micorrizado y su biomasa aérea, siendo esto de especial importancia para un buen rendimiento, aumento de biomasa, y aportes al sistema suelo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Acosta Peñaloza, G.S., Palacios Rincón, D.J., Carvajal Restrepo, L.G., 2013. Evaluación de la esterilización húmeda y la esterilización por microondas de dos tipos de suelos. Revista científica, [S.l.], v. 1, n. 17, p. 87- 93, ISSN 2344-8350.

Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos tropicales, 30(2), 00-00.

Ahmad, F.; Ahmad, I.; Aqil, F.; Wani, A.A. and Sousche, Y. (2006). Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. Biotechnology Journal.10:1112-1123.

Akello, J; Dubois, T; Coyne, D; Kyamanywa, S. 2008. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* and their damage in tissue-cultured banana plants. Entomologia Experimentalis et Applicata 129:157-165.

Allen, M.F., 2011. Linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems. J. Arid Land 3,155–163. doi: 10.3724/SP.J.1227.2011.00155.

Altieri, M.A., Nicholls, C.I., 2000. Applying agroecological concepts to development of ecologically based pest management strategies. In: National Research Council (Ed.), Professional societies and ecologically based pest management: proceedings of a workshop, National Academy Press, Washington DC, USA, p. 60.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 403-410.

Alvarez, R. (2006). Balance de carbono en los suelos. Información técnica de trigo campaña, 36-43.

Anandhakumar J., Zeller W. (2008). Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. J. Plant Dis. Protect. 115: 49-56.

Araújo, F. F. and Guerreiro, R. T. 2010. Bioprospection of *Bacillus* isolates promoters of corn growth in natural and sterile soil. Ciência e Agrotecnologia. 4(34):837-844. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000400007>.

Araya, C.M., 2003. Coevolución de interacciones hospedante patógeno en frijol común. Fitopatol. Bras; 28:221-228.

Arshad M., Frankenberger W.T. Jr. (1998). Plant-growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.

Augé, R. M., Toler, H. D., Saxton A. M., 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13–24. 10.1007/s00572-014- 0585-4.

Baca B.E., Elmerich C. (2007). Microbial production of plant hormones. En: *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Elmerich C., Newton W.E. (Eds.). Springer, Dordrecht, Netherlands. 113-143.

Baldani, V., Baldani, J., Do"bereiner, J., 1987 Inoculation of fieldgrown wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum* spp. Brazil, *Biol. Fertil. Soils* 4 37–40.

Balestrini, R., Lumini, E., Borriello, R., Bianciotto, V., 2015. "Plant-soil biota interactions," in *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, ed E.A. Paul (London: Academic Press; Elsevier), 311–338. doi: 10.1016/b978-0-12-415955-6.00011-6.

Balota, E.L., Lopes, E.S., Hungria, M., Döbereiner, J., 1995. Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 30, 1335–1345.

Barea, J.M., 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. In: *Monzón de Asconegui, M.A., García de Salamone, I.E., Miyazaki, S.S. (Eds.), Biología del suelo. Transformaciones L.P. Di Salvo et al. Applied Soil Ecology xxx (xxxx) xxx–xxx* 6 de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos, Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina, pp. 7–11.

Barrios, M.B., Buján, A., Debelis, S.P., Sokolowski, A.C., Blasón, Á.D., Rodríguez, H.A., López, S.C., De Grazia, J., Mazo, C.R., Gagey, M.C., 2014.

Relación de raíz/biomasa total de Soja (*Glycine max*) en dos sistemas de labranza. *Terra Latinoamericana*, 32(3), 221-230.

Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C. L., Guilbaud, C., Balestra, G. M., Varvaro, L., ... & Morris, C. E. (2014). The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environmental microbiology*, 16(7), 2301-2315.

Bashan, Y; de-Bashan, LE. 2010. Chapter Two. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth. A Critical Assessment *Advances in Agronomy* 108:77-136.

Bashan, Y; Holguin, G; de-Bashan, LE. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50(8):521-557.

Bashan, Y., Trejo, A., de-Bashan, L.E., 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biol. Fertil. Soils*, 47, 963–969.

Beneduzi A., Peres D., Vargas L.K., Bodanese-Zanettini M.H., Passaglia L.M.P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39: 311-320.

Bender, S.F., Plantenga, F., Nefteel, A., Jocher, M., Oberholzer, H.R., Köhl, L., 2014. Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N<sub>2</sub>O emissions from soil. *ISME J.* 8, 1336–1345. 10.1038/ismej.2013.224.

Bennie, A.T., 1991. Groth and mechanical impedance. pp. 393-416. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi (eds.). *Plants root: The hidden half*. Marcel Dekker. New York, NY, USA.

Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., Bianciotto, V., 2015. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1559.

Bojović, B, Marković, A., 2009. Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Kragujevac Journal of Science.*;31:69-74.

Bolsa de Comercio de Rosario, Informe cierre de campaña soja 2020/21 (en línea). Disponible en <https://bcr.com.ar/es>.

Bonfante, P., Anca, I., 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. 63:363–83.

Borrego Muñoz, D. A. (2016). Evaluación de factores útiles para orientar la prospección de PGPR formadoras de endospora en maíz.

Bowen, G. D., Rovira, A. D., 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1-102.

Buchelt, A. C.; Metzler, C. R.; Castiglioni, J. L.; Dassoller, T. F. y Lubian, M. S. 2019. Aplicação de bioestimulantes e *Bacillus subtilis* na germinação e desenvolvimento inicial da cultura do milho. *Revista de Agricultura Neotropical.* 4(6):69-74. <https://doi.org/10.32404/rean.v6i4.2762>.

Cabrera, R.I., 2004. Evaluating yield and quality of roses with respect to nitrogen fertilization and leaf nitrogen status. XXV International Horticulturae Congress, *ISHS Acta Horticulturae.* 511:157-170.

Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.

Cassán, F.D., Díaz-Zorita, M., 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. *Soil Biol. Bioch.* 103, 117–130.

Cassán, F., Maiale, S., Masciarelli, O., Vidal, A., Luna, V., Ruiz, O., 2009. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* 45:12–19.

Cheeke, TE; Rosenstiel, TN; Cruzan, MB. 2012. Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of Bt maize. *American Journal of Botany.* 99(4):700-707.

Chen, F; Wang, M; Zheng, Y; Li, S; Wang, H; Han, D; Guo, S. 2013. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE. *Current microbiology*. 67(2):177-182.

Clares, C. C. (2006). Impacto de inoculantes basados en "Azospirillum" modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz: tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada.

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.

Cook, R. J., 2002. Advances in plant health management in the twentieth century. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38:95-116.

Cornelis, P., 2008. *Pseudomonas: Genomics and molecular biology*. 1st eE. Caister Academic Press.

Christensen, H., Jakobsen, I., 1993. Reduction of bacterial growth by a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol. Fert. Soils* 15, 253– 258.

Dénarie, J., Debelle, F., Rosenberg, C., 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 497-531.

De Bashan L.E., Holguin G., Glick B.R., Bashan Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Ferrera-Cerrato R., Alarcon A. (Eds.). Editorial Trillas, México City, México. 8: 170-224.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2011. *InfoStat versión 2011*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

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*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 871–887.

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

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. y Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969-1973.

El-Tarabily, KA; Nassar, AH; Hardy, GESJ; Sivasithamparam, K. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology* 106:13-26.

Evans H.J., Burris R.H. (1992). Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J (Eds). Chapman and Hall, New York, USA.1-42.

Fischer H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.

Fontanetto, H., Keller, O., Giailevra, D., Negro, C., & Belotti, L. (2008). Efecto del fósforo y de promotores del crecimiento vegetal en maíz. Campaña 2007/08. *Revista técnica Maíz en Siembra Directa*. AAPRESID.

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

García de Salamone, I.E., 2011. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Rev. Argent. Microbiol.* 43, 1–3.

García de Salamone, I.E., 2012. Use of soil microorganisms to improve plant growth and ecosystem sustainability. In: Caliskan, M. (Ed.), *the molecular basis of plant genetic diversity*. INTECH, Rijeka, Croatia, pp. 233–258 Open

access: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/use-of-soil-microorganisms-to-improve-plant-growth-and-ecosystem-sustainability>.

García de Salamone, I.E., Di Salvo, L.P., Escobar Ortega, J.S., Boa Sorte, M.P., Urquiaga, S., Dos Santos Teixeira, K.R., 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 Soil* 336, 351–362.

García de Salamone, I.E., Döbereiner, J., 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils* 21, 193–196.

García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of microbiology*, 47(5), 404-411.

García de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2006. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 173–195.

Gear, J. R. (2006). *El cultivo del maíz en la Argentina*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, Volumen II: Maíz y Nutrición, 4.

Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Springer, Dordrecht. 47-68.

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

Goldstein A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agri*. 1: 51-7.

Haag, A., Arnold, M., Myka, K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G., 2013. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. *FEMS microbiology reviews*, 37(3), 364-383.

Haas, D., Defago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3:307–319.

Hadas, R., Okon, Y., 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 5, 241–247.

Hayat, R., Ahmed, I., Sheirdil, R.A., 2012. An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. In: Ashraf, M., Öztürk, M., Ahmad, M.S.A., Aksoy, A. (Eds.), *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 557–579.

Hernández-Hernández, E. J.; Hernández-Rios, I.; Almaraz-Suarez, J. J.; López-López, A.; Torres-Aquino, M. y Flores, F. J. M. 2018. Caracterización in vitro de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off em Chile. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(9):525-537. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.335>.

Holguin G, Bashan Y, Puente ME, Carrillo A, Bethlenfalvay G, Rojas A, Vázquez P, Toledo G, Bacilio-Jiménez M, Glick BR, González de-Bashan LE, Lebsky V, Moreno M, Hernández JP 2003. *Agricultura Técnica en México* 29: 201-211; Irizar G M, Vargas P, Garza D, Tut C, Rojas M, Trujillo A, García R, Aguirre D, Martínez J, Alvarado S, Grageda O, Valero J, Aguirre J 2003. *Agricultura Técnica en México* 29: 213-225; Aguirre-Medina JF 2004.

Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B., Piche Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 233-242.

Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M., Triplett E.W., (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 169-178.

Jain, D. K., Patriquin, D. G., 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31, 206– 210.

Jha, P. and Kumar, A.(2009). Characterization of Novel Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. *Microbial Ecology*, 58:179–188

Kapulnik Y., Okon Y., Henis Y. (1985). Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.

Kennedy, I.R.; Choudhury, A.T. y Kecskes, M.L.(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.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter.* Vol. 2, Station de Pathologie Végétale et Phytobacteriologie. Pages 879-882.

Leifheit, E.F., Verbruggen, E., Rillig, M.C., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce decomposition of woody plant litter while increasing soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* 81, 323–328. 10.1016/j.soilbio.2014.12.003.

Leifheit, E.F., Veresoglou, S.D., Lehmann, A., Morris, E.K., Rillig, M.C., 2014. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. *Plant Soil* 374, 523–537. 10.1007/s11104-013-1899-2.

Li, D., Rothballer, M., Schmid, M., Esperschütz, J., Hartmann, A., 2011. *Acidovorax radialis* sp. nov., a wheat root-colonizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2589–2594.

Linderman, R.G., 1992. Vesicular–arbuscular mycorrhizae and soil microbiota interactions. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds.), *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. Am. Soc. Agron., Madison, pp. 45–70.

Lodewyckx, C; Vangronsveld, J; Porteous, F; Moore, ERB; Taghavi, S; Mezgeay, M; van der Lelie, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(6): 583-606.

Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 597–609.

Madigan, M., Martinko, J., 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. Prentice Hall.

Ma, M.C., Wang, C.C., Ding, Y.Q., Li, L., Shen, D.L., Jiang, X., Guan, D.W., Cao, F.M., Chen, H.J., Feng, R.H., 2011. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth-promoting rhizobacterium with broadspectrum antimicrobial activity. *J Bacteriol* 193:311–31.

Ma, Y., Xia, Z., Liu, X., Chen, S., 2007a. *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:6–11.

Ma, Y., Zhang, J., Chen, S., 2007b. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *zanthoxylum simulans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:873–877.

Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *UDO Agrícola* 4(1):1-20.

McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A., 1990. A New Method Which Gives an Objective Measure of Colonization of Roots by Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501.

Meier, S., Cornejo, P., Cartes, P., Borie, F., Medina, J., Azcón R., 2015. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 126–135. 10.1002/jpln.201400092.

Mergaert, J., Swings, J., 1996. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 17: 463–469.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (en línea). Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/agricultura>.

Molina-Favero, C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L., 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1001–1009.

Montañez, A; Abreu, C; Paul, R. Gill, PR; Hardarson, G; Sicardi, M. 2008. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and

identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils* 45(3):253-263.

Nelson, L. M., 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV.

Neetus, N., Aggarwal, A., Tanwar, A., Alpa, A., 2012. Influence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Pseudomonas fluorescens* at Different Superphosphate Levels on Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Growth Response. *Chilean journal of agricultural research*, 72(2), 237-243.

Newman, MM; Lorenz, N; Hoilett, N; Lee, NR; Dick, RP; Liles, MR; Ramsier, C; Kloepper, JW. 2016. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Science of the Total Environment*. 553:32-41.

Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., and Reinhardt, D., 2014. Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *petunia hybrida*. *PLoS ONE* 9:e90841. doi: 10.1371/journal.pone.0090841.

Okon, Y., 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture, *Trends Biotechnol.* 3 223–228.

Oliveira A.L.M., Urquiaga S., Döbereiner J., Baldani J.I. (2002). The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242: 205-215.

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

Paliwal, L. L. El maíz en los trópicos. Disponible en: <[http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/DOCREP/003/X7650S/x7650s15.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/003/X7650S/x7650s15.htm)>. Consultado (3-3-2001), 2001>.

Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., Ávila Quezada, G., 2015. *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11: 789–799.

Pliego, C., Kamilova, F., Lugtenberg, B., 2011. Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in agrobiolology: plant growth responses*. Springer, Verlag, Berlin, pp. 295–343.

Porta, C.J., López-Acevedo, R.M., Roquero, L.C., 1999. *Edafología, para la Agricultura y el Medio Ambiente*. Mundi-Prensa. México. 849 pp.

Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 393–398. 10.1016/j.pbi.2007.05.004.

Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H., 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a nontryptophan dependent pathway. *Mol. Plant. Microb. Interact.* 6:609–615.

Ratz, R. J.; Palácio, S. M.; Espinoza-Quiñones, F. R.; Vicentino, R. C.; Michelim, H. J. y Richter, L. M. 2017. Potencial biotecnológico de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas no cultivo de milho e soja. *Engevista*. 4(19):890-905. Doi: 10.22409/engevista.v19i4.894.

Riera, M; Medina, N. 2005. Influencia de las micorrizas sobre las poblaciones bacterianas y su efecto sobre los rendimientos en secuencias de cultivos. *Cultivos tropicales*. 26(4):21-27.

Rillig, M.C., Aguilar-Trigueros, C.A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S.D., Lehmann, A., 2015. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol.* 205, 1385–1388. 10.1111/nph.13045.

Rillig, M.C., Mummey D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171, 41–53. 10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x.

Roesch, LFW; Camargo, FAO; Bento, FM; Triplett, EW. 2008. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil* 302(1-2):91-104.

Santi C., Bogusz D., Franche C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111: 743-767.

Segura Castruita, M.Á., Preciado Rangel, P., González Cervantes, G., Frías Ramírez, J.E., García Legaspi, G., Orozco Vidal, J.A., Enríquez Sánchez, M., 2008. Adición de material pomáceo a sustratos de arena para incrementar la capacidad de retención de humedad. *Interciencia*, 33(12), 923-928.

Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 23-32.

Showkat, S., Murtaza, I., Laila, O., Ali, A., 2012. Biological Control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* Isolated From Wheat Rhizosphere Soil of Kashmir. *J Pharm Biol Sci.* 1(4): 24-32.

Sieh, D., Watanabe, M., Devers, E.A., Brueckner, F., Hoefgen, R., and Krajinski, F., 2013. The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulphur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 197,606–616. doi: 10.1111/nph.12034.

Smith, F.A., Jakobsen, I., Smith, S.E., 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 147,357–366. doi: 10.1046/j.1469- 8137.2000.00695.x.

Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. New York: Academic. 3rd ed.

Spaepen S., Dobbelaere S., Croonenborghs A., Vanderleyden J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312: 15-23

Stuewe & Sons, Inc., 2018. Ray Leach Cone Tainers (en línea). Consultado el 12 de julio 2021. Disponible en <https://www.stuewe.com/products/rayleach.php>.

Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 1-30.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Tarrand, J.J., Krieg, N.R., 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. *Can. J. Microbiol.*, 24, 967–980.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677.

Torres, M. (2016). Fertilización Nitrogenada del cultivo de maíz. Obtenido de [http://www.fertilizando.com/articulos/Fertilizacion% 20Nitrogenada% 20del% 20Cultiv o% 20de% 20Maiz. asp](http://www.fertilizando.com/articulos/Fertilizacion%20Nitrogenada%20del%20Cultivo%20de%20Maiz.asp).

Trifonova, R; Postma, J; Schilder, MT; van Elsas, JD.2009. Microbial Enrichment of a Novel Growing Substrate and its Effect on Plant Growth. *Microbial ecology*. 58(3):632-641.

Troyer, A. F. 2009. Development of Hybrid Corn and the Seed Corn Industry. In *Maize Handbook – Volume II: Genetics and Genomics*. pp. 87-95. J. L. Bennetzen and S. Hake (eds.).

Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., StreitwolfEngel, R., Boller, T., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72. 10.1038/23932.

Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Lavakush, Singh, V., 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agric. Res.* 5, 954–983.

Vitousek, P., Aber, J., Howarth, R., Likens, G., Matson, P., Schindler, D., Schlessinger, H., Tilman, D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.

Vosátka, M., Gryndler, M., 1999. Treatment with culture fractions from *Pseudomonas putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation. *Appl. Soil Ecol.* 11, 245–251.

Weller D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogen in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathology*. 26: 379-407.

Wernitznig, S; Adlassnig, W; Sprocati, AR; Turnau, K; Neagoe, A; Alisi, C; Sassmann, S; Nicoara, A; Pinto, V; Cremisini, C; Lichtscheidl, I. 2013. Plant growth promotion by inoculation with selected bacterial strains versus mineral soil supplements. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(11):6877-6887.

Willems, A., & Gillis, M. (2015). *Acidovorax*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-16.

Xie, J.B., Zhang, L.H., Zhou, Y.G., Liu, H.C., Chen, S.F., 2012. *Paenibacillus taohuashanense* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of the root of *Caragana kansuensis* Pojark. *Antonie van Leeuwenhoek* 102:735–741.

Zuberer, D., 2005. Biological dinitrogen fixation: Introduction and nonsymbiotic. *Principles and Applications of Soil Microbiology* (2nd Ed.) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds), pp. 373-404. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.

## 10. ANEXOS

**Tabla 10.1:** Caracterización de las condiciones edáficas del sustrato Suelo.

Suelo	PH	CE	MO (%)	P disp. (ppm)	NO3 (ppm)	N-NO3 (ppm)	N-NO3 (Kg/ha)	SO4 (ppm)
No estéril	6.38	0.09	0.83	9.57	86.15	19.45	48.64	ND
Estéril	6.73	0.07	0.89	10	30.11	6.80	17.00	ND

Determinaciones analíticas realizadas en el Laboratorio Agronómico S.A. (Chacabuco).

**Tabla 10.2:** Compuestos y concentraciones finales de la solución Hoagland

Compuesto	Concentración final
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0.25 mM
KNO <sub>3</sub>	0.25 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 mM
NaFe EDTA	50 µM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.2 µM
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 µM
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	2 µM
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.5 µM
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.2 µM
HCl	25 µM
MES	0.5 mM

Ajuste de pH 6,1.

<b>Tabla 10.3:</b> Protocolo de extracción de DNA
1- Centrifugar 1.5 ml de cultivo crecido toda la noche.
2- Descartar el sobrenadante: *Para microorganismos Gram +: Re suspender las células en 480 µl de EDTA 50mM y agitar en vortex. Luego agregar 120 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubar 60 minutos a 37°C. Centrifugar y descartar el sobrenadante y continuar en paso (3). Para microorganismos Gram – no realizar este procedimiento y continuar en paso (3).
3- Agregar 600 µl de buffer de lisis y mezclar, incubar 10 minutos a 80°C y luego dejar enfriar a temperatura ambiente.
4- Cuando la temperatura descendió, agregar 3 µl de ARN (10 mg/ml) e incubar a 37° C por 30 minutos.
5- Agregar 200 µl de solución de precipitación proteica e incubar en hielo por 20 minutos.
6- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos, colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y descartar el precipitado.
7- Agregar 600 µl de isopropanol y mezclar.
8- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante.
9- Agregar 500 µl de etanol al 70% (en agua) y mezclar.
10- Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante.
11- Secar el pellet (puede no ser visible) por 4 – 6 horas en estufa a 37°C, cuando no se perciba restos de etanol, resuspender la muestra en agua calidad miliQ.

**Tabla 10.4:** elección mejor sustrato análisis estadístico.

**ANOVA (DGC) longitud aérea**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
long aerea	40	0,58	0,55	8,71

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	940,10	3	313,37	16,70	<0,0001
tratamiento	940,10	3	313,37	16,70	<0,0001
Error	675,40	36	18,76		
Total	1615,50	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=4,1201**  
**Error: 18,7611 gl: 36**

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo-arena-perlita	54,60	10	1,37 A
suelo-arena	54,10	10	1,37 A
suelo	47,30	10	1,37 B
arena G/F	43,00	10	1,37 C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

**ANOVA (DGC) longitud radicular**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
long radicular	40	0,20	0,14	9,84

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	57,08	3	19,03	3,05	0,0407
tratamiento	57,08	3	19,03	3,05	0,0407
Error	224,30	36	6,23		
Total	281,38	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,3743**  
**Error: 6,2306 gl: 36**

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo	27,40	10	0,79 A
arena G/F	24,90	10	0,79 B
suelo-arena-perlita	24,90	10	0,79 B
suelo-arena	24,30	10	0,79 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Peso aéreo fresco

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso aereo fresco	40	0,57	0,53	18,27

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10,91	3	3,64	15,84	<0,0001
tratamiento	10,91	3	3,64	15,84	<0,0001
Error	8,26	36	0,23		
Total	19,17	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,4557**  
**Error: 0,2296 gl: 36**

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo-arena	3,05	10	0,15 A
suelo-arena-perlita	2,98	10	0,15 A
suelo	2,72	10	0,15 A
arena G/F	1,75	10	0,15 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Peso seco aéreo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso seco aereo	40	0,46	0,41	21,96

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,26	3	0,09	10,04	0,0001
tratamiento	0,26	3	0,09	10,04	0,0001
Error	0,31	36	0,01		
Total	0,56	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,0877**  
**Error: 0,0085 gl: 36**

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo-arena	0,51	10	0,03 A
suelo-arena-perlita	0,47	10	0,03 A
suelo	0,41	10	0,03 A
arena G/F	0,30	10	0,03 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Peso radicular fresco

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso radicular fresco	40	0,10	0,03	18,30

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	3	0,14	1,36	0,2693
tratamiento	0,41	3	0,14	1,36	0,2693
Error	3,62	36	0,10		
Total	4,03	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,3017**  
 Error: 0,1006 gl: 36

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo-arena	1,90	10	0,10 A
suelo	1,72	10	0,10 A
arena G/F	1,66	10	0,10 A
suelo-arena-perlita	1,65	10	0,10 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Peso seco radicular

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
peso seco radicular	40	0,12	0,05	22,46

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	3	4,6E-03	1,68	0,1879
tratamiento	0,01	3	4,6E-03	1,68	0,1879
Error	0,10	36	2,7E-03		
Total	0,11	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,0497**  
 Error: 0,0027 gl: 36

tratamiento	Medias	n	E.E.
suelo-arena	0,26	10	0,02 A
suelo	0,24	10	0,02 A
arena G/F	0,22	10	0,02 A
suelo-arena-perlita	0,22	10	0,02 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

**ANOVA (DGC) Volumen radicular**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
volumen radicular	40	0,21	0,14	24,17

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,55	3	2,18	3,13	0,0375
tratamiento	6,55	3	2,18	3,13	0,0375
Error	25,13	36	0,70		
Total	31,68	39			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,7948**  
**Error: 0,6981 gl: 36**

tratamiento	Medias	n	E.E.	
suelo	4,15	10	0,26	A
arena G/F	3,31	10	0,26	B
suelo-arena	3,23	10	0,26	B
suelo-arena-perlita	3,14	10	0,26	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

**Tabla 10.5:** análisis estadísticos parámetros vegetativos.

**ANOVA (DGC) Longitud aérea**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud Aerea	120	0,19	0,11	10,17

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	871,49	11	79,23	2,35	0,0124
Tratamientos	871,49	11	79,23	2,35	0,0124
Error	3645,10	108	33,75		
Total	4516,59	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=5,1700**  
**Error: 33,7509 gl: 108**

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
PT + M	61,80	10	1,84	A
AZ + M	61,10	10	1,84	A
PF + M	59,00	10	1,84	B
AD + M	58,40	10	1,84	B
BJ + M	58,00	10	1,84	B
T.A	57,70	10	1,84	B
M	56,70	10	1,84	B
PF	56,40	10	1,84	B
BJ	56,00	10	1,84	B
PT	54,80	10	1,84	B
AD	53,20	10	1,84	B
AZ	52,60	10	1,84	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Longitud radicular

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud Radicular	120	0,10	0,01	15,01

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	203,89	11	18,54	1,09	0,3778
Tratamientos	203,89	11	18,54	1,09	0,3778
Error	1840,10	108	17,04		
Total	2043,99	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=3,8454**  
**Error: 17,0380 gl: 108**

Tratamientos	Medias	n	E.E.
PT	29,90	10	1,31 A
BJ	29,20	10	1,31 A
PT + M	28,50	10	1,31 A
AZ + M	28,40	10	1,31 A
PF	28,00	10	1,31 A
T.A	27,80	10	1,31 A
AZ	27,10	10	1,31 A
BJ + M	27,10	10	1,31 A
M	26,40	10	1,31 A
PF + M	26,20	10	1,31 A
AD + M	26,10	10	1,31 A
AD	25,40	10	1,31 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Peso fresco aéreo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Fresco Aereo	120	0,08	0,00	13,76

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,58	11	0,60	0,88	0,5665
Tratamientos	6,58	11	0,60	0,88	0,5665
Error	73,79	108	0,68		
Total	80,36	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,7700**  
**Error: 0,6832 gl: 108**

Tratamientos	Medias	n	E.E.
AZ + M	6,62	10	0,26 A
M	6,17	10	0,26 A
AD + M	6,15	10	0,26 A
PT	6,06	10	0,26 A
PF + M	6,02	10	0,26 A
PT + M	5,99	10	0,26 A
BJ + M	5,98	10	0,26 A
T.A	5,95	10	0,26 A
PF	5,89	10	0,26 A
AD	5,89	10	0,26 A
BJ	5,73	10	0,26 A
AZ	5,65	10	0,26 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

### ANOVA (DGC) Volumen radicular

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
volumen radicular	120	0,13	0,04	29,26

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22,68	11	2,06	1,45	0,1622
Tratamientos	22,68	11	2,06	1,45	0,1622
Error	153,80	108	1,42		
Total	176,48	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,1117**  
**Error: 1,4240 gl: 108**

Tratamientos	Medias	n	E.E.
PT + M	4,72	10	0,38 A
AD + M	4,55	10	0,38 A
PF	4,50	10	0,38 A
AZ + M	4,33	10	0,38 A
M	4,27	10	0,38 A
PF + M	4,26	10	0,38 A
AD	4,23	10	0,38 A
BJ + M	3,98	10	0,38 A
AZ	3,75	10	0,38 A
PT	3,59	10	0,38 A
T.A	3,39	10	0,38 A
BJ	3,38	10	0,38 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

### ANOVA (DGC) Peso fresco radicular

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Fresco Radicular	120	0,49	0,43	15,78

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	41,94	11	3,81	9,25	<0,0001
Tratamientos	41,94	11	3,81	9,25	<0,0001
Error	44,53	108	0,41		
Total	86,47	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,5982**  
**Error: 0,4123 gl: 108**

Tratamientos	Medias	n	E.E.
AZ + M	5,13	10	0,20 A
PT + M	4,97	10	0,20 A
PF	4,70	10	0,20 A
PT	4,13	10	0,20 B
BJ	4,11	10	0,20 B
AZ	4,09	10	0,20 B
T.A	4,05	10	0,20 B
M	3,87	10	0,20 B
AD + M	3,76	10	0,20 B
AD	3,59	10	0,20 B
PF + M	3,22	10	0,20 C
BJ + M	3,20	10	0,20 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

### ANOVA (DGC) Peso seco aéreo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso seco Aereo	120	0,14	0,06	51,41

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,59	11	0,42	1,66	0,0914
Tratamientos	4,59	11	0,42	1,66	0,0914
Error	27,09	108	0,25		
Total	31,68	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,4665**  
 Error: 0,2508 gl: 108

Tratamientos	Medias	n	E.E.
M	1,42	10	0,16 A
PT	1,17	10	0,16 B
AD + M	1,14	10	0,16 B
T.A	1,10	10	0,16 B
PT + M	1,01	10	0,16 B
BJ	0,93	10	0,16 B
PF	0,91	10	0,16 B
PF + M	0,90	10	0,16 B
AD	0,86	10	0,16 B
AZ + M	0,81	10	0,16 B
BJ + M	0,78	10	0,16 B
AZ	0,68	10	0,16 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

### ANOVA (DGC) Peso seco radicular

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Peso Seco Radicular	120	0,40	0,34	35,98

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,46	11	0,41	6,45	<0,0001
Tratamientos	4,46	11	0,41	6,45	<0,0001
Error	6,79	108	0,06		
Total	11,26	119			

**Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2337**  
 Error: 0,0629 gl: 108

Tratamientos	Medias	n	E.E.
AZ + M	1,05	10	0,08 A
PT + M	1,04	10	0,08 A
PF	0,87	10	0,08 A
PT	0,75	10	0,08 B
AZ	0,69	10	0,08 B
T.A	0,66	10	0,08 B
BJ	0,66	10	0,08 B
M	0,61	10	0,08 B
AD + M	0,59	10	0,08 B
AD	0,55	10	0,08 B
PF + M	0,46	10	0,08 B
BJ + M	0,44	10	0,08 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

## ANOVA (DGC) Clorofila

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Clorofila	120	0,13	0,04	15,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	110,07	11	10,01	1,50	0,1418
Tratamientos	110,07	11	10,01	1,50	0,1418
Error	720,40	108	6,67		
Total	830,48	119			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,4061  
 Error: 6,6704 gl: 108

Tratamientos	Medias	n	E.E.
AZ + M	18,10	10	0,82 A
PT + M	17,98	10	0,82 A
PF	17,32	10	0,82 A
M	16,64	10	0,82 A
PF + M	16,49	10	0,82 A
BJ	16,48	10	0,82 A
AD + M	16,46	10	0,82 A
BJ + M	16,42	10	0,82 A
T.A	16,10	10	0,82 A
PT	16,10	10	0,82 A
AZ	16,02	10	0,82 A
AD	14,26	10	0,82 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Tabla 10.6:** Valores medio de parámetros vegetativos en distintos sustratos.

tratamiento	Longitud aérea	Longitud radicular	peso aéreo fresco	peso radicular fresco	peso seco aéreo	peso seco radicular	volumen radicular
suelo	47,3 B	27,4 A	2,72 A	1,72	0,41 A	0,24	4,15 A
suelo-arena	54,1 A	24,3 B	3,05 A	1,9	0,51 A	0,26	3,23 B
suelo-arena-perlita	54,6 A	24,9 B	2,98 A	1,65	0,47 A	0,22	3,14 B
arena G/F	43 C	24,9 B	1,75 B	1,66	0,3 B	0,22	3,31 B

Dentro de cada columna, medias con una letra distinta son significativamente diferentes (p > 0,05).

**Tabla 10.7:** Valores medios de parámetros vegetativos en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Longitud aérea	Longitud radicular	Peso fresco aéreo	Peso fresco radicular	Peso seco aéreo	Peso seco radicular	Clorofila	Volumen radicular	% de colonización radicular
<i>Testigo</i>	57,7 B	27,8	5,953	4,053 B	1,102 B	0,656 B	16,1 A	3,39	0%
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	56 B	29,2	5,734	4,114 B	0,926 B	0,655 B	16,48 A	3,38	2%
<i>Acidovorax delafieldii cepa A736</i>	53,2 B	25,4	5,888	3,592 B	0,856 B	0,549 B	14,26 B	4,23	2,50%
<i>Paenibacillus terrigena cepa B241</i>	54,8 B	29,9	6,064	4,129 B	1,171 B	0,753 B	16,1 A	3,59	1,30%
<i>Pseudomonas fluorescens cepa 1008</i>	56,4 B	28	5,893	4,704 A	0,912 B	0,873 A	17,32 A	4,5	0,25%
<i>Azospirillum brasilense cepa Az39</i>	52,6 B	27,1	5,648	4,094 B	0,675 B	0,689 B	16,02 A	3,75	4,50%
<i>Bradyrhizobium japonicum + Micorrizas</i>	58 B	27,1	5,984	3,204 C	0,783 B	0,444 B	16,42 A	3,98	9,50%
<i>Acidovorax delafieldii cepa A736+micorriza</i>	58,4 B	26,1	6,149	3,761 B	1,136 B	0,583 B	16,46 A	4,55	9,50%
<i>Paenibacillus terrigena cepa B241 + micorrizas</i>	61,8 A	28,5	5,992	4,971 A	1,012 B	1,039 A	17,98 A	4,72	18%
<i>Pseudomonas fluorescens cepa 1008 + micorrizas</i>	59 B	26,2	6,018	3,224 C	0,897 B	0,456 B	16,49 A	4,26	12%
<i>Azospirillum brasilense cepa Az39 + micorrizas</i>	61,1 A	28,4	6,623	5,128 A	0,806 B	1,052 A	18,1 A	4,33	16%
<i>Micorrizas</i>	56,7 B	26,4	6,169	3,865 B	1,423 A	0,608 B	16,64 A	4,27	16%

Dentro de cada columna, medias con una letra distinta son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).