

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras
de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium
perenne* L. de suelo volcánico (modelo género
Azospirillum spp.)**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ciencias Agrarias

Mauricio Iván Schoebitz Cid

VALDIVIA-CHILE

2006

Profesor patrocinante : -----
Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Profesor copatrocinante : -----
Claudia M. Ribaudó
Lic. Ciencias Biológicas
Universidad de Buenos Aires,
Argentina

Profesores informantes : -----
Dante Pinochet T.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Ignacio López C. : -----
Ing. Agr., Ph. D.

INSTITUTO DE PRODUCCIÓN Y SANIDAD VEGETAL

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer el apoyo familiar que he recibido de forma constante a lo largo de mi vida manifestada en mi madre, madrina y mi hermano todo esto incrementado, por el apoyo del gran “clan” familiar que poseo, del cual me enorgullezco.

A mi Profesor Luigi Ciampi, en el descubrí y aprendí la necesidad de estar en constante búsqueda del conocimiento y que los deseos son reales siempre en la medida que se les imprima todo el esfuerzo y tesón posible.

Mis agradecimientos se amplían a mis profesores de la Universidad de Buenos Aires Alfredo Curá y Mónica Ribaudó que con toda amabilidad y apoyo me ayudaron a desarrollar mi trabajo en su laboratorio. Ellos fueron responsables de este logro y descubrí en ellos amigos muy generosos y de muy buen corazón.

A Ximena que formó parte de este trabajo, gracias a su entusiasmo y compañía me permitió desarrollar mi tesis. A mis amigos del laboratorio de Fitopatología por permitirme avanzar juntos en esta parte del camino de mi vida.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	3
2.2	Familia Enterobacteriaceae	3
2.2.1	Aislamiento	3
2.2.2	Efectos de promoción de crecimiento vegetal	4
2.2.3	Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	4
2.2.4	Eventos de colonización	5
2.3	El género <i>Azospirillum</i>	5
2.3.1	Aislamiento	6
2.3.2	Identificación	6
2.3.3	Colonización de raíces	7
2.3.4	Asociación bacteria-planta	7
2.3.5	Mecanismos promotores del crecimiento vegetal	8
2.3.6	Producción de ácido indol acético (AIA)	8
2.4	Efectos de inoculación con Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	9
3	MATERIALES Y MÉTODO	11
3.1	Aislamiento de PGPR	11
3.1.1	Recolección de muestras	11
3.1.2	Aislamiento	11

Capítulo		Página
3.2	Selección de cepas	12
3.2.1	Fijación biológica de nitrógeno	12
3.2.2	Detección de índoles en cultivo bacteriano	13
3.3	Caracterización de cepas seleccionadas	13
3.3.1	Medios selectivos y diferenciales de crecimiento	14
3.3.2	Pruebas bioquímicas	15
3.3.3	Identificación de los aislamientos	15
3.3.4	Identificación mediante secuenciación del ADNr 16S	16
3.3.5	Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal	16
3.4	Evaluación del efecto promotor del crecimiento en <i>L. perenne</i>	17
3.4.1	Material vegetal	17
3.4.2	Cepas bacterianas	18
3.4.3	Diseño experimental	18
3.4.4	Medición de variables de crecimiento	18
3.4.4.1	Determinación de peso fresco y seco de brotes y raíces	18
3.4.4.2	Altura de brotes y longitud radical	19
3.4.4.3	Determinación de la superficie radical	19
3.5	Control biológico de <i>Monilia</i> spp.	19
3.6	Modelo estadístico	20
4	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	21
4.1	Selección de organismos promotores de crecimiento	21
4.2	Biosíntesis de índoles de las cepas seleccionadas	23
4.3	Identificación taxonómica de las cepas C1 y C2	24
4.3.1	Pruebas bioquímicas	24
4.3.1.1	Género <i>Azospirillum</i> y <i>Herbaspirillum</i>	24
4.3.1.2	Género <i>Pseudomonas</i>	25

Capítulo		Página
4.3.1.3	Familia Enterobacteriaceae	27
4.3.2	Pruebas de identificación bacteriana APi 20 E	29
4.3.3	Identificación mediante la secuenciación del ADNr 16S	29
4.4	Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal	30
4.5	Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal en <i>L. perenne</i>	33
4.5.1	Peso fresco y seco aéreo	34
4.5.2	Altura de brotes	36
4.5.3	Peso fresco y seco de raíces	37
4.5.4	Longitud radical	39
4.5.5	Superficie radical	40
4.6	Control de antagonismo biológico sobre el hongo <i>Monilia</i> spp.	41
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
6	CONCLUSIONES	50
7	RESUMEN	51
	SUMMARY	52
8	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fijación biológica de N ₂ de las cepas preseleccionadas	22
2	Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen al género <i>Azospirillum</i> y/o <i>Herbaspirillum</i>	25
3	Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen al género <i>Pseudomonas</i>	26
4	Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen a la familia Enterobacteraceae	27
5	Utilización de los carbohidratos: glucosa, maltosa, sucrosa y lactosa para las cepas C1 y C2 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas	28

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de producción de índoles en cultivo bacteriano	23
2	Efecto de la inoculación realizada con la cepa C1 en raíz de alfalfa var. Sequel (80x)	31
3	Efecto de la inoculación realizada con la cepa C2 en ápice de crecimiento de la raíz principal en tomate var. Liso Marglobe (80x)	32
4	Efecto de la inoculación realizada con la cepa C1 en raíces laterales de tomate var. Liso Marglobe (80x)	33
5	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre peso fresco aéreo de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	34
6	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre peso seco aéreo de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	35
7	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre la longitud de brotes de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	36

Figura		Página
8	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre el peso fresco radical de plantas de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	37
9	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre el peso seco radical de plantas de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	38
10	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre la longitud radical de <i>L. perenne</i> , con 20 y 50 días posteriores a la inoculación	39
11	Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y <i>A. brasilense</i> sobre la superficie radical de plantas de <i>L. perenne</i> con 20 días posteriores a la inoculación	40
12	Placas agar papa dextrosa (APD) evidenciando la acción inhibitoria de las cepas bacterianas C1 y C2 frente al crecimiento del hongo <i>Monilia</i> spp	41

INDICE DE ANEXOS

Anexos		Página
1	Tinción de Gram	63
2	Composición agar urea Christensen	63
3	Composición medio P (piocianina)	63
4	Composición medio F (fluoreceina)	64
5	Composición agar ceftrimida	64
6	Composición caldo de cultivo NFb	65
7	Composición medio rojo congo ácido málico	65
8	Composición agar papa dextrosa (APD)	66
9	Composición agar peptona	66
10	Composición agar nutriente	66
11	Composición medio Hoagland	67

1 INTRODUCCIÓN

Existe abundante evidencia científica que ha establecido que el funcionamiento de un ecosistema terrestre depende de la actividad microbiana del suelo. Específicamente, la calidad del suelo y la productividad vegetal derivan de múltiples reacciones de los microorganismos que llevan a cabo en la zona afectada por las raíces de las plantas. En efecto, los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios a las plantas. Entre otras actividades: sintetizan fitohormonas que facilitan el enraizamiento, secretan compuestos que mejoran la estructura del suelo, facilitan la captación de nutrientes y protegen a la planta contra patógenos.

Dentro de los microorganismos del suelo que son beneficiosos para las plantas se destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se las conoce como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Entre ellas, muchos tipos se encuentran asociados a la familia Enterobacteriaceae, mientras que otros están relacionados con los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas*.

Este vasto grupo de bacterias, gracias a su metabolismo, ejerce positivos efectos en el crecimiento de las plantas y en el rendimiento de muchos cultivos de pastos y granos forrajeros. Estudios confirman que los efectos positivos que provocan estas bacterias sobre vegetales se deben a la síntesis de fitohormonas y a la fijación biológica de di-nitrógeno molecular (N₂).

Estos efectos sobre vegetales son derivados de muchos cambios morfológicos en las raíces que ocurren en plantas inoculadas. Asimismo, hay

aumento en la superficie y longitud radical que provocan un aumento en la absorción de agua y nutrientes.

Gran parte de los sistemas pastoriles se basan en la utilización de *Lolium perenne*. Esta importante planta forrajera es pieza fundamental en la alimentación animal. Por esto, el aumento en su contenido de nitrógeno, propiciado por bacterias, es una herramienta que ayuda a incrementar su calidad nutricional.

La hipótesis planteada, en esta investigación postula "bacterias aisladas de la rizósfera de *Lolium perenne* de suelo volcánico promueven el crecimiento vegetal".

En este trabajo se plantea el siguiente objetivo general:

aislar, caracterizar y evaluar la acción de bacterias promotoras de crecimiento vegetal obtenidas desde la rizósfera de *L. perenne* de suelo volcánico.

Los objetivos específicos son:

- aislar y evaluar bacterias con capacidad de fijación biológica de nitrógeno y biosíntesis de compuestos indólicos,
- caracterizar taxonómicamente las bacterias seleccionadas como promotoras de crecimiento vegetal,
- evaluar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las bacterias seleccionadas inoculadas en semillas de *L. perenne* cultivar Nui, *Medicago sativa* var. Sequel y *Lycopersicum esculentum* var. Liso Marglobe,
- evaluar el efecto antagonista de las cepas seleccionadas sobre el hongo fitopatógeno del género *Monilia* spp.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

En la microflora del suelo conviven distintos géneros bacterianos. Estos se encuentran preferentemente interactuando con las raíces de las plantas. Dicha acción puede ser benéfica, perjudicial o neutral desde el punto de vista del desarrollo y crecimiento vegetal. Aquellas bacterias rizosféricas capaces de impactar positivamente sobre el crecimiento de cualquier especie vegetal, son comúnmente conocidas como PGPR (GLICK *et al.*, 1999).

2.2 Familia Enterobacteriaceae.

Esta familia comprende un gran número de géneros, dentro de estas los géneros que se encuentran comúnmente en la rizósfera corresponden a: *Pantoea* (Gavini 1989), *Klebsiella* (Flügge 1886) Lautrop 1956, *Escherichia* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Erwinia* y *Serratia* (Bizio 1823) (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

De esta familia bacteriana, han sido consideradas como microorganismos PGPR, los géneros *Pantoea* (MERBACH *et al.*, 1998), *Enterobacter* (KÄMPFER *et al.*, 2005), *Serratia* (SAKASAKI, 1974; PRASAD *et al.*, 2001) y *Klebsiella* (CHELIUS y TRIPLETT, 2000).

2.2.1 Aislamiento. Diferentes cepas de *Pantoea agglomerans* (GAVINI *et al.*, 1989) han sido aislado de la rizósfera de cebada y trigo en Alemania (KLEEBERGER *et al.*, 1983; SINGH *et al.*, 1983) de maíz y trigo de invierno (RUPPEL *et al.*, 1992; RIGGS *et al.*, 2001) y además de oleaginosas como raps (BERG *et al.*, 2002).

ASIS y ADACHI (2004) han aislado *Pantoea agglomerans* cepa MY1 provenientes de superficies de tallos esterilizadas de plantas de camote, utilizando medios semi-sólidos libre de nitrógeno.

ADACHI *et al.* (2002) han aislado otra bacteria de la familia Enterobacteriaceae conocida como, *Klebsiella oxytoca* cepa BO-1, con capacidades para ser consideradas como PGPR.

2.2.2 Efectos de promoción de crecimiento vegetal. Varias cepas de bacterias fijadoras de N₂ fueron aisladas de las raíces y tallos de cuatro variedades de plantas de arroz. Estas cepas aisladas fueron identificadas como *Serratia marcescens* a través del análisis del gen ADNr 16S. Una de ellas, denominada IRB500, presentó actividad de reducción de acetileno sólo cuando se inoculó en medio de cultivo conteniendo bajos niveles de N. La inoculación de la cepa *S. marcescens* IRB500 provoca incrementos significativos en la longitud radical y en el peso seco de las raíces en plantas de arroz variedad IR72 (PRASAD *et al.*, 2001).

Enterobacter radicincitans corresponde a una PGPR aislada del rizoplano de trigo de invierno, capaz de fijar N₂ y producir fitohormonas, tales como auxinas y citoquininas. Esta cepa es capaz de aumentar el desarrollo de las raíces y el rendimiento de diferentes especies vegetales (KÄMPFER *et al.*, 2005).

2.2.3 Fijación biológica de nitrógeno (FBN). La fijación de N₂ por *P. agglomerans* fue determinado por la utilización de ¹⁵N₂. Demostrando FBN en cultivos puros y en asociación con plantas de trigo (MERBACH *et al.*, 1998).

La FBN de *P. agglomerans* MY1 fue confirmada por ADACHI y ASIS (2003) al realizar ensayos de reducción acetileno-etileno (ARA). Estos autores

afirmaron que la capacidad fijadora de N_2 fue aumentada al doble, cuando se medió ARA en cultivos de *P. agglomerans* acompañada con otra bacteria de la familia Enterobacteriaceae.

La actividad de la enzima nitrogenasa de *P. agglomerans* en cultivos puros fue disminuida por la adición de NH_4^+ , pero fue estimulada por la adición de NO_3^- . La FBN en asociación con plantas de trigo no fue afectada por la presencia de NH_4^+ y de NO_3^- . Sin embargo, el N derivado de la atmósfera contribuyó muy poco al conjunto de N de la nutrición de las plantas de trigo (MERBACH *et al.*, 1998).

Klebsiella pneumoniae, (Schroeter 1886) Trevisan 1887 corresponde a otro microorganismo endofítico de la familia Enterobacteriaceae, capaz de fijar N_2 del interior de tejidos de maíz (CHELIUS y TRIPLETT, 2000).

2.2.4 Eventos de colonización. Los eventos de colonización han sido estudiados en varias especies de pastos forrajeros. Cepas de *P. agglomerans* han sido aisladas de espacios intercelulares de raíces de trigo (RUPPEL *et al.*, 1992). Las especies de *Azoarcus* spp. colonizan las raíces de plantas de arroz. Especies del género *Klebsiella pneumoniae* colonizan la formación de pelos absorbentes (CHELIUS y TRIPLETT, 2000).

2.3 El género *Azospirillum*.

Este grupo de microorganismo incluye bacterias de vida libre, presentes en suelos de todo el mundo, capaces de fijar nitrógeno molecular del medio ambiente (OKON y LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Especies de este grupo presentan una característica cosmopolita, debido a que se distribuyen en regiones templadas y tropicales (PATRIQUIN *et al.*, 1983). Sin embargo, su ocurrencia es más abundante en regiones tropicales (DÖBEREINER *et al.*, 1976).

Las bacterias del género *Azospirillum* han sido, a la fecha, las más estudiadas entre las PGPR. Según una revisión de OKON y LABANDERA-GONZALEZ (1994) que reúne información de 20 años de experimentación a campo, el porcentaje de éxito debido a la inoculación con *Azospirillum* fue de 60 a 70%. Estos ensayos fueron realizados en diferentes suelos y regiones climáticas, y con distintos cultivos de importancia agronómica, logrando aumentos en rendimiento del orden del 5 a 30%.

2.3.1 Aislamiento. *Azospirillum* ha sido aislado de la rizósfera de una gran variedad de plantas, incluyendo pastos forrajeros como *Poa pratensis* L. y *Festuca arundinacea* Schribn. (SUNDARAM *et al.*, 1988).

El medio de cultivo utilizado universalmente para obtener un óptimo crecimiento de este género bacteriano corresponde a un sustrato denominado NFb (nitrogen free broth) utilizando malato como fuente de carbono (DÖBEREINER *et al.*, 1976).

Las bacterias después de ser cultivadas en sustrato NFb, se siembran en el agar selectivo, para bacterias del género *Azospirillum*, denominado rojo congo ácido málico, en el cual las colonias adquieren una coloración rojo escarlata, consistencia seca y abundante crecimiento (RODRIGUEZ-CACERES, 1982).

2.3.2 Identificación. El género *Azospirillum* presenta una morfología vibroide, pleomorfismo y movimiento en espiral. Posee un flagelo polar y corresponde a bacterias Gram negativas a Gram variables (TARRAND *et al.*, 1974).

Estas bacterias con su característica de ser PGPR, son de particular interés debido a su capacidad de FBN, producción de fitohormonas y su

capacidad para adherirse a cualquier sistema de raíces (BASHAN y HOLGUIN, 1997).

Las sustancias responsables de provocar el efecto promotor del crecimiento vegetal corresponden a: auxinas, giberelinas y citoquininas (TIEN *et al.*, 1979; BOTTINI *et al.*, 1989; BURDMAN *et al.*, 2000).

El citoplasma de las células contienen cantidades elevadas de sustancias de reservas lipídicas constituidas por poly- β -hidroxibutirato. Estos compuestos forman un 25-50% de su peso seco (OKON *et al.*, 1976).

2.3.3 Colonización de las raíces. *Azospirillum* posee un flagelo polar que lo utiliza para desplazarse en medios líquidos, mediante el cual migra hacia las raíces y se adhiere a la superficie radicular. Bajo condiciones de medios sólidos se induce la expresión de múltiples flagelos laterales (MOENS *et al.*, 1995). Estas estructuras laterales están envueltas en la colonización de las raíces, permitiendo a la bacteria adherirse a ellas. En contraste, bacterias mutantes, desprovistas de flagelos laterales y polares, pierden la capacidad de colonización (VANDE BROEK *et al.*, 1998).

El éxito colonizador de *Azospirillum* depende de un proceso indispensable llamado "quimiotaxis". Este evento corresponde a una fuerte atracción entre estas bacterias con las raíces de las plantas a través de sus propios exudados radiculares. Entre estos compuestos se encuentran: malato, succinato y fructosa (ALEXANDRE y ZHULIN, 2001).

2.3.4 Asociación bacteria-planta. Los sitios de colonización elegidos por estas bacterias corresponden a las áreas de elongación celular de las zona radical y las bases de los pelos radicales (KAPULNIK *et al.*, 1985b).

Los responsables de una efectiva asociación entre planta-bacteria son las proteínas y polisacáridos de la membrana exterior de *Azospirillum*. Estos, permiten una fuerte adhesión a las raíces de las plantas inoculadas (BURDMAN *et al.*, 2001).

2.3.5 Mecanismos promotores del crecimiento vegetal. Existen evidencias que indican que la FBN no es la única causa responsable del crecimiento en cereales y pastos forrajeros (BROWN *et al.*, 1974).

TIEN *et al.* (1979) sugirieron que las fitohormonas podrían ser las responsables del mejor crecimiento de la raíz y de la parte aérea de las plantas. Esto se debe a que los efectos de la inoculación son similares a los que se observan cuando las plantas son tratadas con estas sustancias.

El mecanismo estudiado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente de ácido indol acético (JAIN y PATRIQUIN, 1985). Este compuesto es producido por las bacterias logrando un aumento en el contenido de fitohormonas de las plantas produciendo la estimulación del crecimiento (BAR y OKON, 1992).

2.3.6 Producción de ácido indol acético (AIA). Las bacterias PGPR sintetizan AIA. Esta importante auxina secretadas por bacterias contribuiría al “pool” endógeno de hormonas de la planta, imitando el efecto de la aplicación de AIA exógeno (GLICK *et al.*, 1999). De esta forma, el AIA bacteriano estimularía el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta huésped. Al mismo tiempo, el consecuente incremento en la producción de metabolitos vegetales, utilizados por las bacterias para su propio crecimiento, pondría de manifiesto un beneficio recíproco en la relación planta-bacteria (PATTEN y GLICK, 2002).

La promoción de crecimiento radical es uno de los principales factores por los cuales se evalúa el efecto benéfico de las distintas PGPR. En este sentido, la producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona sería fundamental en la respuesta a la inoculación. Bacterias que secretan bajos niveles de AIA (10^{-9} a 10^{-12} M) estimularían la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (GLICK *et al.*, 1999).

2.4 Efectos de inoculación con Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

La inoculación de pastos y cereales forrajeros con PGPR ha logrado especial atención. Se han obtenido efectos positivos, tales como: aumento en rendimiento de granos y contenido de materia seca (O'HARA *et al.*, 1981; RENNIE y RENNIE, 1983; KAPULNIK *et al.*, 1985b).

Los efectos de la inoculación en el campo son positivos, cuando en los suelos existen niveles intermedios de fertilización de N, P y K, indicando que la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal no reemplaza la fertilización artificial. Sin embargo, mejora su utilización, logrando los mismos niveles de productividad con un menor gasto de fertilizante (OKON y KAPULNIK 1986).

HEGAZI *et al.* (1979) demostraron que la inoculación con *A. brasilense* (TARRAND *et al.*, 1974) en gramíneas en condiciones de campo provocó aumentos en la altura de plantas y aumento en el rendimiento de grano y paja. KAPULNIK *et al.* (1985a) encontraron en gramíneas aumentos en elongación, superficie radicular y peso seco de raíz.

Existen reportes de que los resultados de la inoculación en gramíneas están relacionados con la cepa de *Azospirillum*, genotipo de la planta y el tipo de suelo (Rinaudo *et al.*, 1981 citado por VOSE 1983).

3 MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Aislamiento de PGPR.

Esta sección presenta los materiales y la metodología para la obtención de aislamientos puros de PGPRs.

3.1.1 Recolección de muestras. Se utilizó un muestreo dirigido en las praderas del predio Santa Rosa, propiedad de Universidad Austral de Chile, ubicado en la Provincia de Valdivia, Décima Región, con presencia de *L. perenne*.

Se seleccionó muestras de rizósfera, hacia los puntos donde *L. perenne* se presentaba más robusto. La superficie del suelo en el punto elegido se delimitó mediante cuadros metálicos de 10 cm² y la extracción se realizó en forma manual considerando 10 cm de profundidad.

3.1.2 Aislamiento. Las raíces de *L. perenne* se lavaron suavemente con agua destilada para conservar el suelo adherido a las raíces. Posteriormente, las muestras de rizósfera se sembraron en matraces conteniendo caldo NFb libre de nitrógeno. Estos, fueron incubados a 33 °C en estufa de cultivo (Memmert) hasta el desarrollo de una película blanca, densa y ondulada por debajo de la superficie.

Se extrajo 1 mL de esta película para realizar diluciones seriadas al décimo con solución fisiológica (CINa, 0,85%), hasta llegar a una dilución de 10⁻⁴ y 10⁻⁵ del cultivo original. Posteriormente, se sembraron en medio

selectivo agar rojo congo ácido málico a una temperatura de 33 °C por un período de 96 h. Se consideraron muestras positivas colonias aisladas, rojas escarlatas, con abundante crecimiento, consistencia seca, superficie rugosa y borde irregular (RODRIGUEZ-CACERES, 1982).

3.2 Selección de cepas.

A las cepas bacterianas preseleccionadas se les evaluó la capacidad de fijación biológica de nitrógeno y posteriormente la producción de índoles totales en cultivo bacteriano.

3.2.1 Fijación biológica de nitrógeno. Las bacterias se incubaron en caldo NFb durante 16 h a 33 °C y un inóculo de 100 µL conteniendo igual número de bacterias (esto fue ajustado por diluciones en solución fisiológica) fue sembrado en medio NFb en frascos de penicilina de 10 mL herméticamente cerrados.

Después de 24 h de crecimiento se extrajo 0,5 mL de aire con una jeringa de 1 mL y se reemplazó por 0,5 mL de acetileno (10% del espacio atmosférico del frasco de penicilina). Después de esto se incubó a 33 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, una muestra de 1 mL se inyectó en el cromatógrafo de gases Serie II 5890 (Hewlett Packard).

El procedimiento de medición corresponde a 1 mL de muestra del espacio gaseoso, este se inyectó en el cromatógrafo gaseoso adaptado con una FID y una columna de nitrógeno Porapak de acero inoxidable (3.2 mm x 2 m, 80/100 mesh). El inyector, el horno y el detector poseen temperaturas de 110 °C, 90 °C y 250 °C respectivamente. N₂ fue usado como un gas transportador con una velocidad lineal de 4,5 cm/s (HARDY *et al.*, 1968).

3.2.2 Detección de índoles en cultivo bacteriano. La producción de índoles se detectó utilizando el reactivo de Salkowski bajo análisis colorimétrico. Cada cultivo bacteriano fue ajustado a un mismo tamaño de inóculo (600 nm) en caldo tripticasa de soya suplementado con triptófano (0.01 g/L). A distintos tiempos de incubación (16, 20, 24 y 48 h) se retiró un volumen de 1 mL de cada una de estas y se centrifugó (1000 rpm; durante 15 min), para recoger el líquido sobrenadante, donde se realizó la detección de índoles totales, según TORRES *et al.* (2000). Esta alícuota fue mezclada con el reactivo Salkowski (relación 2:1). Después de 30 min esta reacción desarrolló una coloración violácea que se midió en el espectrofotómetro (Shimadzu UV-110-02) a 530 nm. La concentración de índoles se calculó en una ocasión por una curva de calibración usando como patrón AIA.

3.3 Caracterización de cepas seleccionadas.

Existen diversas pruebas bioquímicas de laboratorio que permiten identificar géneros bacterianos. Para hacer esta identificación se realizó una serie de pruebas utilizando las cepas aisladas de la rizósfera de *L. perenne* y cepas patrones pertenecientes a diferentes géneros (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* y de la familia Enterobacteriaceae) que se encuentran normalmente en la rizósfera de las plantas, de esta manera se logró identificar el género bacteriano de los aislamientos realizados. Esta caracterización bioquímica se realizó en el laboratorio del Dr. José Alfredo Curá, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las cepas utilizadas como patrones de identificación fueron:

A. brasilense FT 326 (Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979) y *Herbaspirillum seropedicae* Z152 (Baldani 1986) cedidas al laboratorio del Dr. José Alfredo Curá por Johanna Döbereiner, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA), Ministerio de Agricultura do Abastecimiento.

Pseudomonas putida (Trevisan 1889) Migula 1895, *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan 1889) Migula 1895 y *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, cedidas al Dr. José Alfredo Curá por la cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

3.3.1 Medios selectivos y diferenciales de crecimiento. Se utilizaron los siguientes caldos y medios para la selección de cultivos puros, a partir de muestras rizosféricas de plantas de *L. perenne*.

- Medio de cultivo NFb, (DÖBEREINER *et al.*, 1976) carente de nitrógeno, que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente N₂. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono para bacterias del género *Azospirillum* (Anexo 6).
- Agar rojo congo ácido málico, (RODRIGUEZ-CACERES, 1982) medio selectivo para el crecimiento de bacterias del género *Azospirillum* (Anexo 7).
- Medio pirocianinas y fluoresceínas (medios P y F), permite observar, a luz ultravioleta, el desarrollo de pigmentos provocados por bacterias del género *Pseudomonas* (Anexo 3 y 4).
- Agar cetrimida, medio selectivo para el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* (Anexo 5).
- Agar MacCONKEY, medio de cultivo para bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae. Contiene sales biliares y como fuente de carbono utiliza lactosa. Otros géneros como *Azospirillum*, *Herbaspirillum* o *Pseudomonas* no se desarrollan o crecen en este medio de cultivo.

3.3.2 Pruebas bioquímicas. Para la identificación de las cepas aisladas se utilizaron las siguientes pruebas en medios y caldos de cultivo.

- Prueba de la ureasa, permite detectar la presencia de la enzima ureasa, muestras positivas presentan producción de amoníaco y CO₂ (Anexo 2).
- Prueba de la oxidasa, permite la identificación de bacterias del género *Pseudomonas*.
- Test O/F (oxidación/fermentación), permite diferenciar la capacidad del microorganismo para utilizar diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa), se produce cambio de acidez del medio de cultivo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.
- Utilización de citrato, se utiliza en bacterias de la familia Enterobacteriaceae, como única fuente de carbono, produce alcalinidad en el medio de cultivo.
- Triple azúcar hierro (TSI), permite observar la fermentación y utilización de hidratos de carbono y la producción de H₂S. Permite diferenciar entre microorganismos de la familia Enterobacteriaceae.

3.3.3 Identificación de los aislamientos. Aquellas cepas reconocidas como pertenecientes de la familia Enterobacteriaceae, fueron identificadas con las pruebas bioquímicas de microtubos deshidratados denominada APi 20 E. Este sistema de identificación de bacilos Gram negativos específicos para la familia Enterobacteriaceae, está estandarizado y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El "kit" consta de una galería de 20 microtubos conteniendo medios o sustratos en forma deshidratada. Los test convencionales se inocularon en una suspensión bacteriana de la cepa en estudio en solución

fisiológica. Tras un período de incubación de 18-24 h a 30 °C se pueden observar virajes de color en el medio. La lectura del APi 20 E (Biomèrieux) se realiza mediante la obtención de un código, que permite a través de un software identificar la especie bacteriana en cuestión. (Los carbohidratos y reactivos utilizados en esta prueba de identificación bacteriana corresponden a: D-glucosa, D-manitol, inositol, D-sorbitol, L-ramnosa, D-sacarosa, D-melibiosa, amigdalina, L-arabinosa, 2-nitro-fenil-D-galactopiranosida, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, citrato trisódico, tiosulfato sódico, urea, L-triptófano a 0,19 y 0,38 mg/micro tubo, piruvato sódico y gelatina de origen bovino).

3.3.4 Identificación mediante secuenciación del ADNr 16S. La comparación de las secuencias de los ADNr 16S (o de los genes que la codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la clasificación rápida y precisa de las bacterias.

La identificación de la cepa bacteriana se efectuó por amplificación directa por PCR del ADNr 16S, secuencia parcial del mismo (con lectura en dos direcciones) y análisis de la secuencia.

Esta identificación molecular basada en el ADNr 16S de la cepa C2 se realizó en el Instituto de Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España.

3.3.5 Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal. Se utilizaron diversas especies vegetales, entre ellas: pasto ovillo, festuca, alfalfa, arroz y tomate para observar las respuestas provocadas por las inoculaciones de las cepas bacterianas. Estas plantas fueron cultivadas durante 20 días, a 25 °C y con un fotoperíodo de 16 h. Posterior al período de cultivo, las raíces fueron

lavadas suavemente con agua destilada, separadas de la parte aérea de la planta y finalmente fueron teñidas con azul de algodón por 15 min, para luego registrar las respuestas de las plantas causado por las inoculaciones bacterianas (KRUMPHOLZ, 2003).

Las fotografías fueron tomadas en raíces laterales y ápices a igual distancia. Estas se tomaron en la misma zona radical en todos los tratamientos, tanto inoculados como tratamientos control. Este trabajo se realizó en los laboratorios de la cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

3.4 Evaluación del efecto promotor del crecimiento en *L. perenne*.

Una vez realizado el trabajo de aislamiento e identificación de las cepas procedió a inocular plantas de *L. perenne* en condiciones de esterilidad que aseguren la sola interacción entre la especie vegetal y la bacteria inoculada.

3.4.1 Material vegetal. Se cultivaron plantas de *Lolium perenne* cultivar Nui (Agrícola Curiñanco) en matraces de cultivo de 500 mL de capacidad, cada uno contenía 100 mL medio agar Hoagland (0,5 x) 0,5% P/V (Anexo 11). Se utilizaron en total 10 plantas por tratamiento. Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 30% y 0,1% de Tween 80 durante 15 min, seguidos de tres lavados con agua estéril de 10 min cada uno. El material vegetal se mantuvo en condiciones de esterilidad, asegurando una adecuada difusión de gases. Los frascos se mantuvieron en cámara de cultivo durante 20 y 50 días, con 16 h de fotoperíodo a 25 °C.

3.4.2 Cepas bacterianas. Se utilizaron las cepas seleccionadas como promotoras de crecimiento vegetal aisladas de la rizósfera de *L. perenne*. Además, como cepa patrón se utilizó *A. brasilense* FT 326, para comparar sus efectos de promoción de crecimiento con el de las cepas nativas aisladas, debido al ya conocido efecto sobre las plantas que presenta *A. brasilense*.

3.4.3 Diseño experimental. Se realizaron los siguientes tratamientos:

- a) plantas sin inocular (control)
- b) plantas inoculadas con *A. brasilense*
- c) plantas inoculadas con la cepa C1
- d) plantas inoculadas con la cepa C2.

Las semillas fueron inoculadas una vez emergida la radícula con una dosis de 30 μ L a una concentración de $1 \cdot 10^7$ unidad formadora de colonias por cada mL de solución fisiológica. De esta manera, el tratamiento control fue inoculado con 30 μ L de solución fisiológica estéril por cada semilla.

3.4.4 Medición de variables de crecimiento. Las variables de crecimiento vegetales medidos fueron:

- a) peso fresco y seco de brotes y raíces
- b) altura de brotes
- c) longitud radical
- d) superficie radical.

3.4.4.1. Determinación de peso fresco y seco de brotes y raíces. Esta medición se realizó secando en horno durante 48 h a 105°C, las partes aéreas y radicales de las plantas de *L. perenne*. Después de este período se midieron los diferentes pesos.

3.4.4.2 Altura de brotes y longitud radical. Las plantas de *L. perenne* se separaron sus partes aéreas de las radicales, para luego medir sus longitudes con una regla metálica de 30 cm de longitud.

3.4.4.3. Determinación de la superficie radical. Para esta variable, se utilizó el método indirecto basado en la adsorción de iones nitrito a la superficie radical y la posterior cuantificación del nitrito adsorbido en forma colorimétrica. Para ello, se lavaron las raíces y se sumergieron en una solución de NaNO_2 50 mM durante 10 s. Posterior a esto, se dejaron escurrir durante 5 min, permitiendo el drenaje del exceso de solución. Después de este período de tiempo, se transfirió cada una de las raíces a frascos de vidrio que contenían 50 mL de agua destilada, esto se agitó durante un período de 15 min en agitador orbital a 100 rpm. Una alícuota de 0,4 mL de la solución resultante del lavado de la raíz, conteniendo nitrito adsorbido, se transfirió a tubos de ensayo, adicionando 0,3 mL de sulfanilamida 1% P/V (preparada en 3 M de HCl) y 0,3 mL de naftiletildiamina 0,02% P/V. De esta forma se desarrolló una coloración rosada, la cual pudo ser leída en el espectrofotómetro (540 nm). Los datos de absorbancia obtenidos fueron transformados en valores de superficie mediante ecuaciones de regresión propuestas por ANSARI *et al.* (1995).

3.5 Control biológico de *Monilia* spp.

La forma de verificar la capacidad inhibitoria de las cepas C1 y C2 sobre hongos patógenos, es a través de pruebas de antagonismo sobre agar.

A partir de un cultivo fresco de las bacterias C1 y C2, se preparó un tapiz bacteriano en placas con agar papa dextrosa (APD), en el centro de las placas se colocó un disco de agar con el hongo del género *Monilia* spp, que fue obtenido con un sacabocado a partir de un cultivo fresco que contenía dicho hongo. Después de 5 días a una temperatura de 25 °C se determinó el efecto biocontrolador de las cepas aisladas sobre el hongo del género *Monilia* spp.

3.6 Modelo estadístico.

El modelo utilizado corresponde a un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones. El total de plantas por tratamiento fue de 10 unidades. La homogeneidad de varianzas fue realizado con el test de Hartley y la ANDEVA se confeccionó utilizando el test de Dunnett (STEEL y TORRIE, 1984) con 5% de confianza. Se utilizó este test porque permite obtener diferencias estadísticas no asumiendo varianzas iguales.

4 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo al punto 3.1.2 fueron seleccionados 14 aislamientos (Cuadro 1). Estos comparten características similares de sus colonias en el agar rojo congo ácido málico y la designación utilizando letras y números, se realizó para facilitar su identificación.

4.1 Selección de organismos promotores de crecimiento vegetal.

Los aislamientos fueron evaluados midiendo su capacidad de fijación biológica de N_2 y biosíntesis de compuestos indólicos. El Cuadro 1 resume la capacidad fijadora de nitrógeno de los aislamientos realizados, incluido la cepa patrón utilizado en este estudio *A. brasilense*.

La mayoría de las cepas presentaron valores menores a 5 nmol $C_2H_4/mL/24$ h. Por su parte, las cepas denominadas C1 y C2 presentaron altos niveles de FBN. En base a esta capacidad, éstas fueron seleccionadas y con ambas se continuó con la caracterización de producción de compuestos indólicos.

CUADRO 1 Fijación biológica de N₂ de las cepas preseleccionadas.

Cepas	nmoles C ₂ H ₄ /mL cultivo/24 h (1)
A1	2.69
A2	3.34
A3	4.72
A4	2.63
B1	3.37
B2	2.89
B3	3.03
C1	2506.73
C2	2538.86
C3	3.44
C4	2.78
C5	3.12
C6	1.69
C7	2.11
<i>A. brasilense</i>	4264.65

(1) Cultivo realizado en el medio NFb libre de nitrógeno.

4.2 Biosíntesis de índoles de las cepas seleccionadas.

La capacidad de biosíntesis de índoles es una característica importante para que una cepa sea considerada como PGPR. Se realizó la medición en cultivos líquidos bacterianos (ver 3.2.2) a distintos períodos de tiempo, como se observa en la Figura 1.

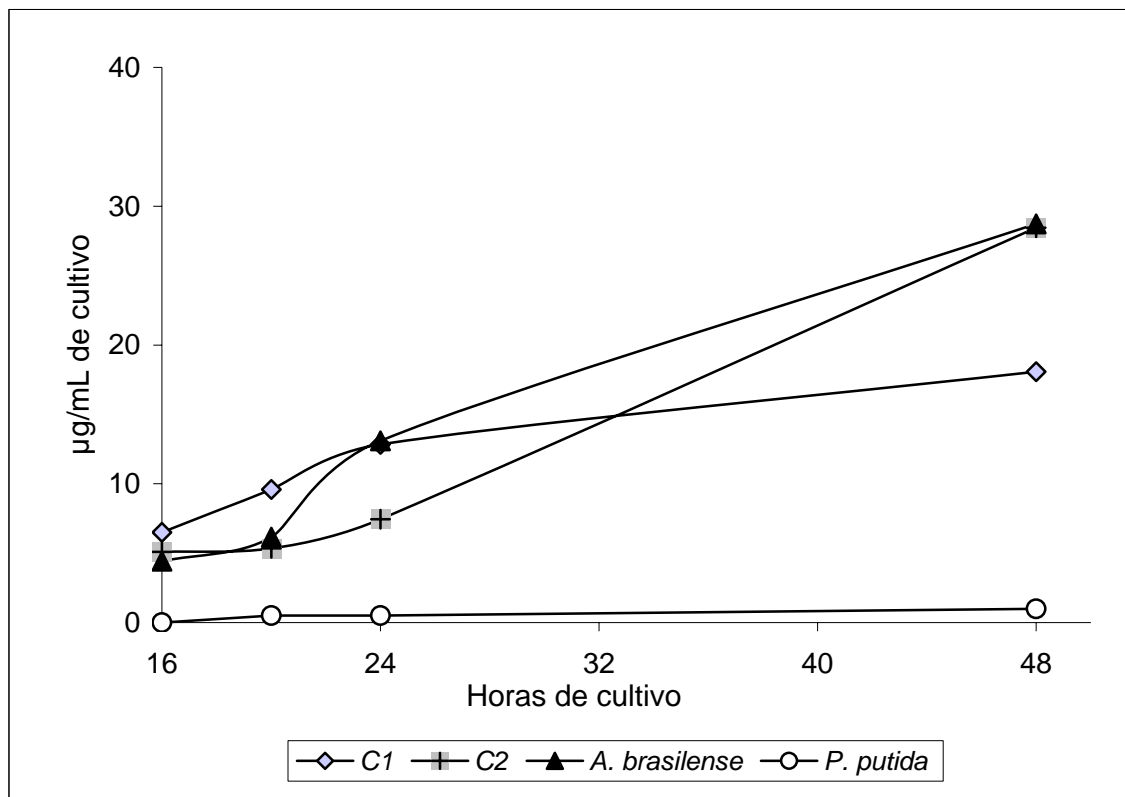


FIGURA 1 Curva de producción de índoles en cultivo bacteriano.

La detección de compuestos indólicos de las cepas C1 y C2 (seleccionadas por su alta capacidad de FBN, ver Cuadro 1) se realizó a partir de cultivo bacteriano, en cuatro períodos de tiempo (16, 20, 24 y 48 h). Para validar esta medición se utilizaron como controles las cepas *Azospirillum brasilense* FT 326, considerada como una cepa con alta capacidad de

biosíntesis de compuestos indólicos y la cepa *Pseudomonas putida*, identificada como una cepa no productora.

En las primeras horas de cultivo las cepas C1, C2 y *A. brasilense* presentaron similares producciones de índoles, hecho que se modifica a medida que transcurre el tiempo; destacando la similar biosíntesis que presentaron las cepas C2 y *A. brasilense* a las 48 h. *P. putida* se comportó tal como estaba previsto, debido a que no biosintetizó tales sustancias.

4.3 Identificación taxonómica de las cepas C1 y C2.

Realizados las mediciones de FBN y síntesis de compuestos indólicos se estableció que del total de cepas preseleccionadas sólo las cepas C1 y C2 obtuvieron rangos aceptables de FBN y de biosíntesis de índoles. Por esta razón, con estas dos se trabajó para determinar su clasificación taxonómica, a través de pruebas bioquímicas y moleculares.

4.3.1 Pruebas bioquímicas. En la rizósfera se encuentran presentes varios géneros bacterianos con capacidad fijadora de nitrógeno y que producen compuestos indólicos. Los más comunes corresponden a los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* y representantes de la familia de las Enterobacteriaceae. Por esto, se trabajó en la identificación de las cepas C1 y C2, utilizando como patrones bacterias de los géneros anteriormente mencionados (ver 3.3).

4.3.1.1. Género *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Utilizando las cepas *A. brasilense* FT 326 y *H. seropedicae* cepa Z152 se efectuaron diferentes pruebas bioquímicas preliminares para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen a estos géneros bacterianos.

El resultado de las respuestas de las cepas patrones frente a estas pruebas bioquímicas fue corroborado por los antecedentes del Manual de Bergey`s (TARRAND *et al.*, 1974).

CUADRO 2 Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen al género *Azospirillum* y/o *Herbaspirillum*.

Pruebas bioquímicas	C1	C2	<i>A. brasilense</i>	<i>H. seropedicae</i>
Fijación N ₂	+	+	+	+
Reducción NO ₃	+	+	+	+
Desnitrificación	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+
Crec. en agar RC	+	+	+	+
Crec. en caldo NFb	+	+	+	-
Ureasas	-	-	+	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	-	-
Color de la colonia en APD	Blancas	Blancas	Rosadas	Pardas

+/- Crecimiento y/o actividad bacteriana; RC = rojo congo; Crec. = crecimiento; APD = agar papa dextrosa.

El Cuadro 2 muestra las diferencias entre las cepas aisladas y los géneros *Azospirillum* y *Herbaspirillum* en la prueba de ureasas, hidrólisis de la gelatina y la coloración de las colonias en agar papa dextrosa.

4.3.1.2 Género *Pseudomonas*. Otro género frecuente en la rizósfera de las plantas corresponde a *Pseudomonas*. Por ello, para descartar o confirmar si las cepas aisladas pertenecen a éste se realizaron pruebas bioquímicas, utilizando como cepas patrones a *P. putida* y *P. fluorescens*.

CUADRO 3 Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen al género *Pseudomonas*.

Pruebas bioquímicas	C1	C2	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>A. brasilense</i>
Prueba de la oxidasa	-	-	+	+	-
Producción pigmentos en agar F (fluoreceína)	-	-	+	-	-
Producción pigmentos en agar P (piocianina)	-	-	+	-	-
Producción pigmentos en agar cetrimida	+	+	+	+	-
Crecimiento a 4°C	-	-	+	+	-
Crecimiento a 42°C	-	-	-	-	-

+/- crecimiento y / o actividad bacteriana

La prueba por excelencia para confirmar a una bacteria como perteneciente al género *Pseudomonas*, es el de la oxidasa. La gran mayoría de las *Pseudomonas* son positivas a ella. Sin embargo, las cepas C1 y C2 son oxidasa negativas. Por los resultados obtenidos en el Cuadro 3 se sugiere que las cepas en estudio no corresponden a este género.

Además, especies del género *Pseudomonas*, son capaces de generar pigmentos difusibles que son observables a luz UV en medio B de King como

las piocianinas y fluoresceínas. En este caso, las cepas C1 y C2 no presentaron producción de ambos pigmentos.

Otra característica de las bacterias de este género es su capacidad de crecer a temperaturas de 4 °C y 42 °C. En ambos casos, las cepas C1 y C2 no presentaron actividad de crecimiento en estos extremos de temperatura.

4.3.1.3 Familia Enterobacteriaceae. Esta familia comprende un gran número de géneros dentro de estos los que se encuentran comúnmente asociadas a la rizósfera corresponden a: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia* y *Citrobacter* (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987). Como representante de las Enterobacteriaceae se utilizó a la especie *Escherichia coli*.

CUADRO 4 Pruebas bioquímicas utilizadas para determinar si las cepas C1 y C2 pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.

Pruebas bioquímicas	C1	C2	<i>E. coli</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>P. putida</i>
Caldo verde brillante	-	-	+	-	-
Caldo MacCONKEY	+	+	+	-	-
Citrato Simmons	+	+	+	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	+	-	-
Triple azúcar hierro (TSI)	+	+	+	-	-

+/- Crecimiento y/o actividad bacteriana

El Cuadro 4 muestra las pruebas bioquímicas (ver 3.3.1 y 3.3.2) utilizadas para reconocer microorganismos pertenecientes a las Enterobacteriaceae y señalan la similitud que existe entre las cepas C1 y C2 y la cepa *E. coli* representante de la familia Enterobacteriaceae, diferenciándose en el crecimiento en el caldo verde brillante, lo que implica que las cepas C1 y C2 no pueden utilizar estas sales biliares que componen este caldo para sus procesos metabólicos. Para confirmar si las cepas C1 y C2 pertenecen a esta familia, se realizaron pruebas a confirmar la capacidad de estas cepas de oxidar y fermentar (O/F) utilizando distintos tipos de carbohidratos, entre ellos, glucosa, maltosa, sucrosa y lactosa, debido a la característica anaeróbicas facultativa que presentan las Enterobacteriaceae, lo que sugeriría que estas cepas pertenecerían a esta familia.

CUADRO 5 Utilización de los carbohidratos: glucosa, maltosa, sucrosa y lactosa para las cepas C1 y C2 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

CEPAS	GLUCOSA		MALTOSA		SUCROSA		LACTOSA	
	A	ANA	A	ANA	A	ANA	A	ANA
C1	+	+	+	+	+	-	+	+
C2	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. brasilense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

A: aeróbico; ANA: anaeróbico

+ /- Crecimiento y/o actividad bacteriana

El Cuadro 5 señala que las cepas C1 y C2 presentaron capacidad de utilización oxidativa y fermentativa de la mayoría de los carbohidratos suministrados, a excepción de su incapacidad de utilizar la sucrosa en

condiciones anaeróbicas. Por esta razón es acertado considerar que ambas cepas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Por ello, se escogió un sistema de identificación bacteriana APi 20 E exclusivo para identificar especies de la familia Enterobacteriaceae.

4.3.2 Pruebas de identificación bacteriana APi 20 E. Las cepas C1 y C2 fueron evaluadas con el método de identificación APi 20 E obteniendo como resultado que las cepas C1 y C2 pertenecerían a la especie *Serratia liquefaciens* con un 82,5% de similitud.

Esta prueba se realizó de forma duplicada, dando como resultado en las dos ocasiones *S. liquefaciens*. No obstante, el porcentaje de similitud de 82,5% no fue contundente, debido a que presenta un margen bastante amplio de probabilidades a que corresponda a otra especie de la familia Enterobacteraceae.

4.3.3 Identificación mediante la secuenciación del ADNr 16S. Se escogió la cepa C2, por su mayor biosíntesis de compuestos indólicos, para su identificación molecular mediante la secuenciación del ADNr 16S. Este proceso representa un método más fidedigno de caracterización que el método APi 20 E, debido a que se basa en la comparación de bases nitrogenadas del gen del ADN ribosomal de las cepas en evaluación con las secuencias génicas de cepas patrones conocidas y presentes en una base de datos.

La identificación de la cepa bacteriana ha sido efectuada por amplificación directa por PCR del ADNr 16S, secuencia parcial del mismo (con lectura en dos direcciones) y análisis de la secuencia.

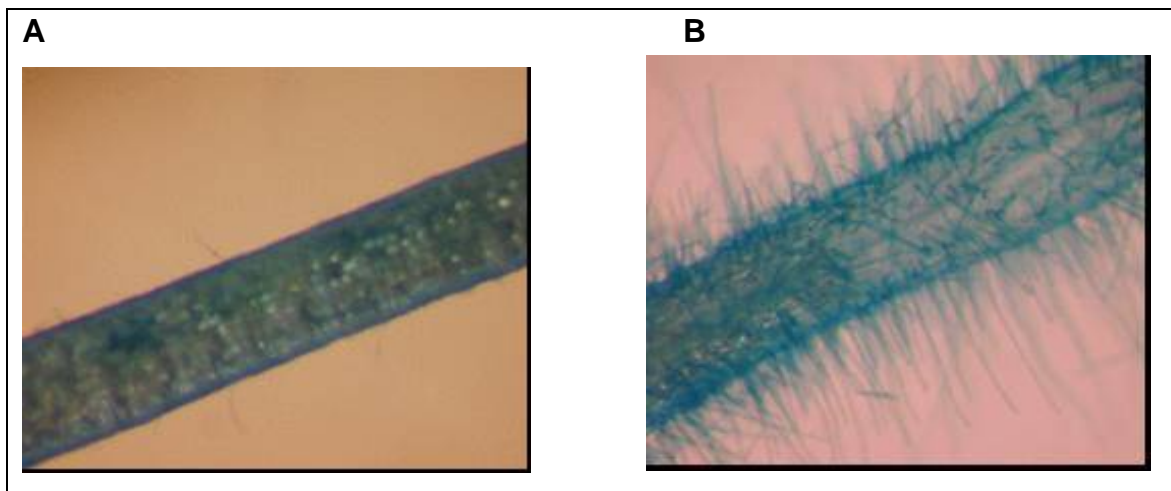
El resultado por Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997) frente a datos del NCBI recogiendo la extensión del segmento solapado, el porcentaje de semejanza, y el nombre del microorganismo con un mayor grado de identidad de secuencia corresponde a:

Cepa C2:

Pantoea agglomerans con una semejanza 1017/1032pb (98,5%) sobre la secuencia AB 004691 (cepa tipo JCM 1236). (Como se señaló anteriormente esto lo realizó el servicio de secuenciación del Instituto de Colección Española de Cultivos Tipo, Burjassot, Valencia, España).

4.4 Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal.

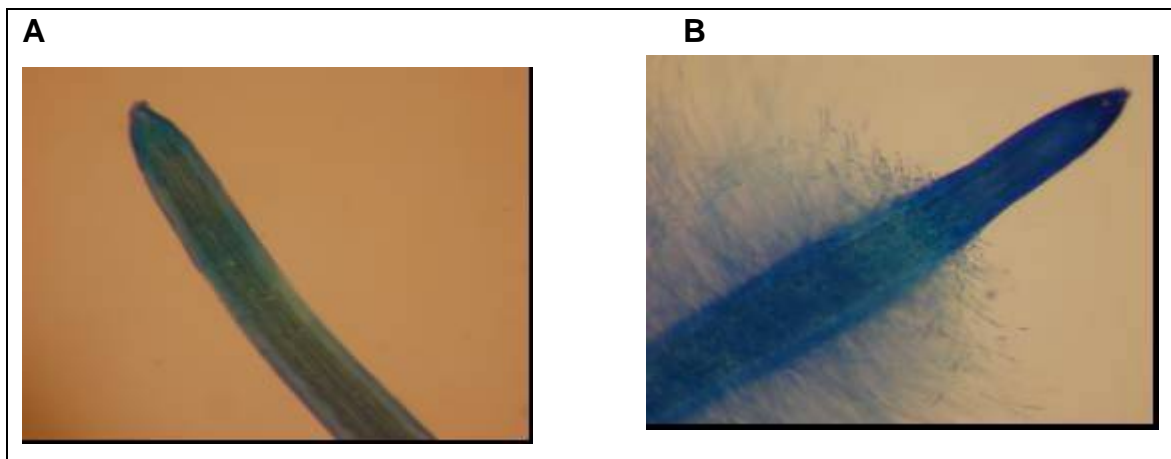
Se utilizaron diversas especies vegetales, entre ellas pasto ovillo, festuca, arroz, alfalfa y tomate, de las cuales sólo las plantas de alfalfa variedad Sequel y tomate variedad Liso Marglobe presentaron respuestas positivas a las inoculaciones. La metodología empleada para el crecimiento y la inoculación de las plantas es la misma que se detalla para *L. perenne*. Estas plantas fueron evaluadas a los 20 días de desarrollo, bajo condiciones de temperatura y fotoperíodo controlado, como se describe en el punto 3.3.5. Las diferencias en la cantidad y en el desarrollo de raíces absorbentes quedaron registradas en las siguientes fotografías (A y B Figuras 2, 3 y 4).



A la izquierda (A) un control sin inocular. A la derecha (B) el efecto de la cepa C1 evidenciando un incremento de pelos radicales absorbentes.

FIGURA 2 Efecto de la inoculación realizada con la cepa C1 en raíz de alfalfa var. Sequel (80x).

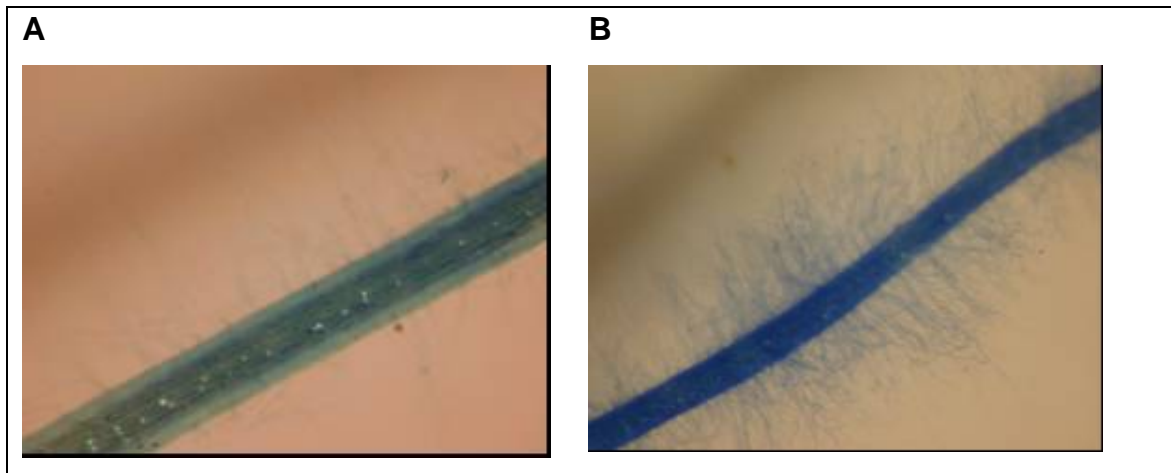
La Figura 2 evidencia el aumento de pelos absorbentes en las raíces de plantas de alfalfa, causado por la cepa C1. Estas raíces corresponden a raíces laterales cercanas a la raíz principal del vegetal. Las fotografías fueron tomadas en las mismas zonas radicales para los distintos tratamientos, tanto control como inoculado.



A la izquierda (A) un control sin inocular. A la derecha (B) el efecto de la cepa C2 evidenciando un incremento de pelos radicales absorbentes.

FIGURA 3 Efecto de la inoculación realizada con la cepa C2 en ápice de crecimiento de la raíz principal en tomate var. Liso Marglobe (80x).

La Figura 3 muestra que la cepa C2, del mismo modo que la cepa C1 presentó un excelente efecto promotor de crecimiento vegetal, al ser inoculado en plantas de tomate. Este estímulo del crecimiento se vislumbra en el ápice del vegetal, aumentando la cantidad de pelos absorbentes en otra zona radical distinta a lo presentado en la Figura 2.



A la izquierda (A) un control sin inocular. A la derecha (B) el efecto de la cepa C1 evidenciando un incremento de pelos radicales absorbentes.

FIGURA 4 Efecto de la inoculación realizada con la cepa C1 en raíces laterales de tomate var. Liso Marglobe (80x).

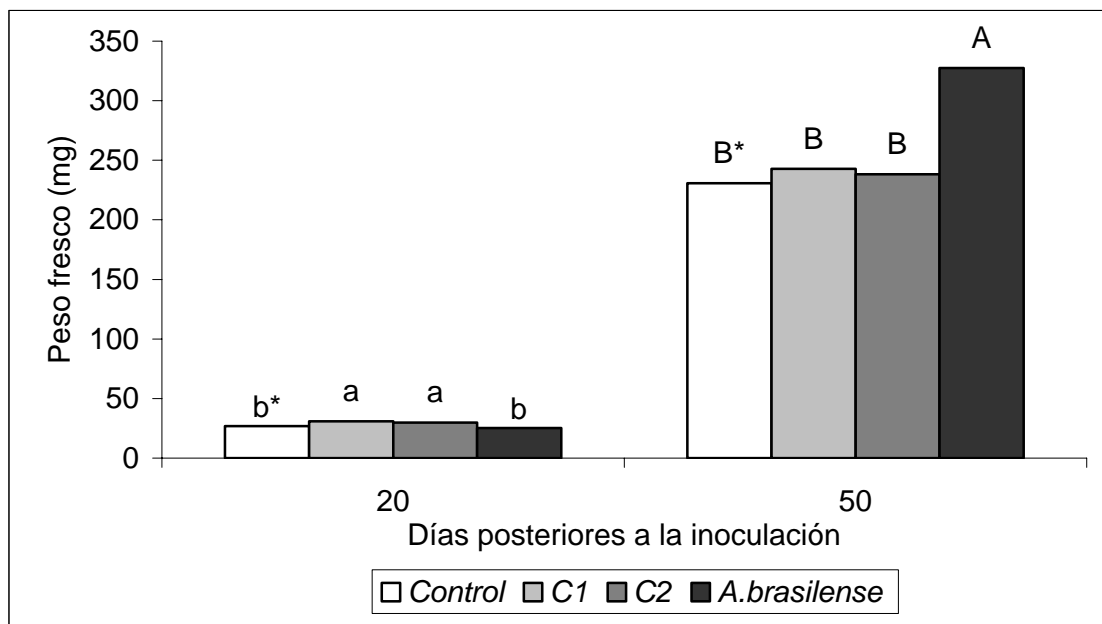
La Figura 4 confirma el efecto promotor del crecimiento de la cepa C1 en plantas de tomate, detallando el incremento positivo que provoca los microorganismos en los pelos absorbentes de raíces laterales del vegetal.

En base a la caracterización de las cepas autóctonas se procedió a evaluar el efecto promotor de crecimiento vegetal sobre un cultivo de interés para praderas de la Décima Región como corresponde a *L. perenne*.

4.5 Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal en *L. perenne*.

Las plantas fueron evaluadas a los 20 y 50 días después de la inoculación. Después de este período, se registró el crecimiento de las plantas del tratamiento control y las plantas inoculadas con las cepas C1, C2 y cepa patrón *A. brasilense* (ver 3.4.2).

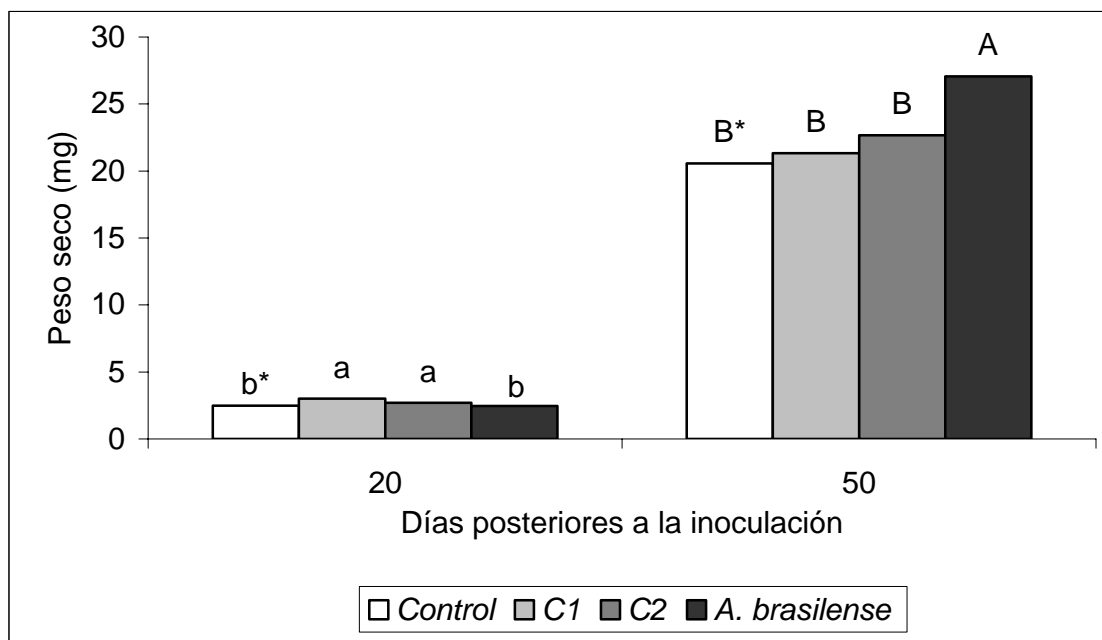
4.5.1 Peso fresco y seco aéreo. Respuesta de las inoculaciones con las cepas: *A. brasilense*, C1 y C2 sobre el peso fresco y seco aéreo de *L. perenne*.



* Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 5 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre peso fresco aéreo de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

En la Figura 5 el efecto sobre el peso fresco aéreo fue positivo desde los 20 días después de la inoculación. En este período las cepas C1 y C2 presentaron diferencias estadísticas significativas, manifestándose en incrementos en peso fresco de un 14% con respecto al tratamiento control. Estas diferencias aún son más notorias a los 50 días después de la inoculación, en el cual la cepa *A. brasilense* presentó diferencias estadísticas significativas, de un 42% de incremento con respecto al tratamiento control. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticas entre las cepas C1 y C2 y el tratamiento control.



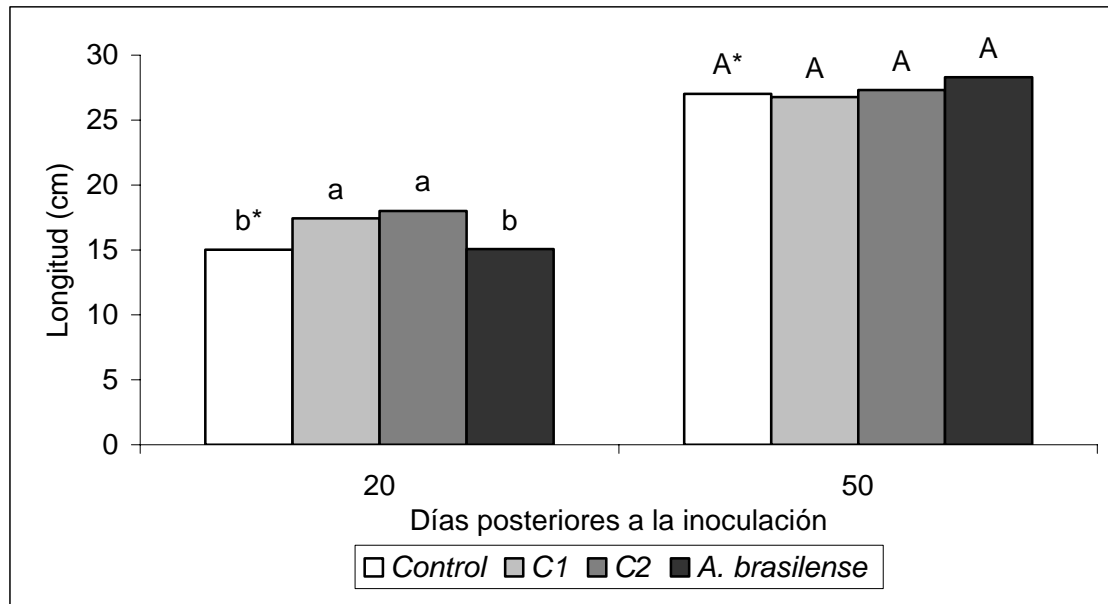
* Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 6 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre peso seco aéreo de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

Al analizar la variación en peso seco detallada en la Figura 6, se determinó que hubo un incremento de un 20% en plantas tratadas con la cepa C1, por sobre el tratamiento control a los 20 días después de la inoculación. Sin embargo, estas diferencias no se manifestaron al transcurrir 30 días más, en la cual la cepa que presentó diferencias significativas con respecto al control, fue la cepa *A. brasilense*, con un 31% de incremento en peso seco de los brotes. En contraste, en este mismo período de tiempo no hubo diferencias significativas entre las cepas C1 y C2 y el tratamiento control.

Uno de los efectos conocidos de las bacterias PGPR es el incremento en la parte aérea del vegetal. Se midió la altura alcanzada por las plantas después de la inoculación como se observa en la Figura 7.

4.5.2 Altura de brotes. Efecto de las inoculaciones con las cepas *A. brasilense*, C1 y C2 sobre la altura de la zona aérea.

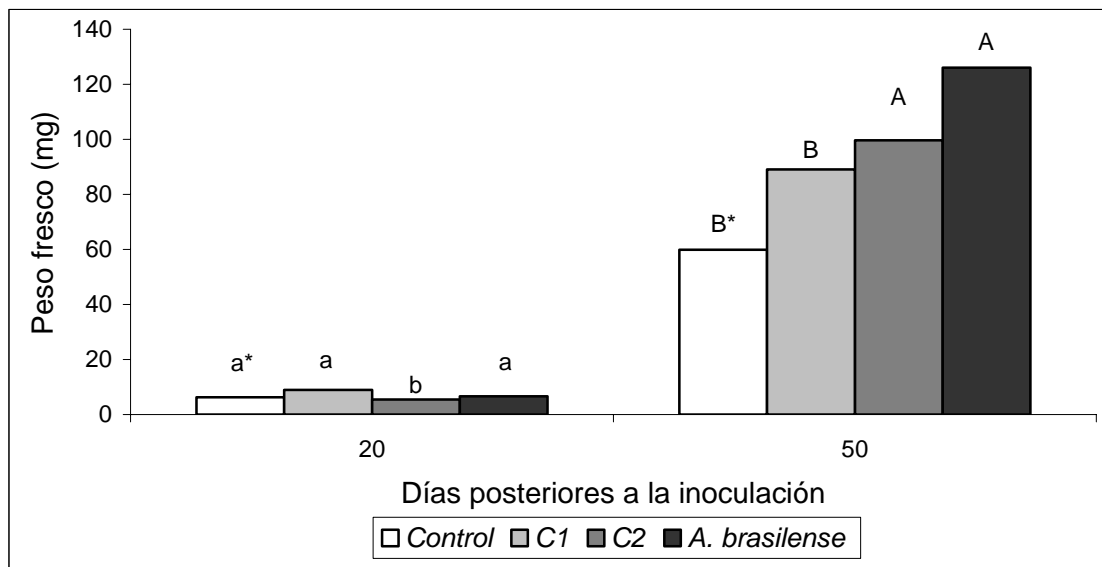


*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 7 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre la longitud de brotes de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

Las cepas C1 y C2 a los 20 días posteriores a la inoculación presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la longitud de los brotes. De la Figura 7 se desprende que la cepa C2 presentó un 20% de incremento en longitud de brotes por sobre el tratamiento control. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas a los 50 días posteriores a la inoculación.

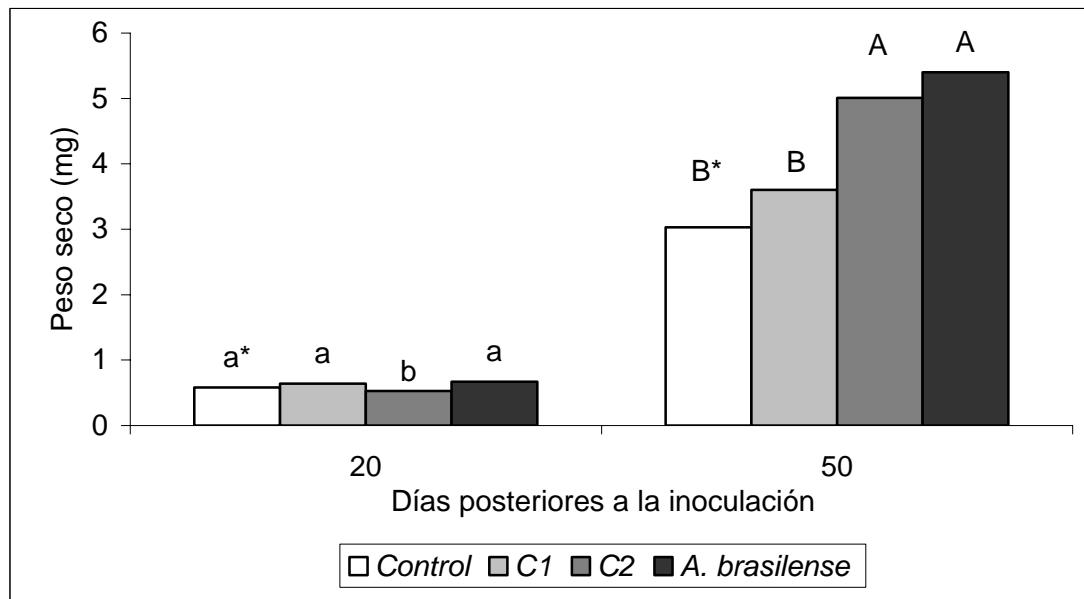
4.5.3 Peso fresco y seco de raíces. Efecto de las inoculaciones con las cepas bacterianas sobre *L. perenne* sobre el peso fresco y seco de raíces.



*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 8 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre el peso fresco radical de plantas de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

En la Figura 8 se muestra que a los 20 días de inoculación la cepa C2 obtuvo el menor crecimiento en peso fresco diferenciándose del control y los tratamientos con la cepa C1 y *A. brasilense*. Sin embargo, a los 50 días desde la inoculación, la cepa C2 produjo en conjunto con *A. brasilense* el mayor peso fresco de raíces y por sobre lo determinado para el tratamiento con la cepa C1 y el tratamiento control.



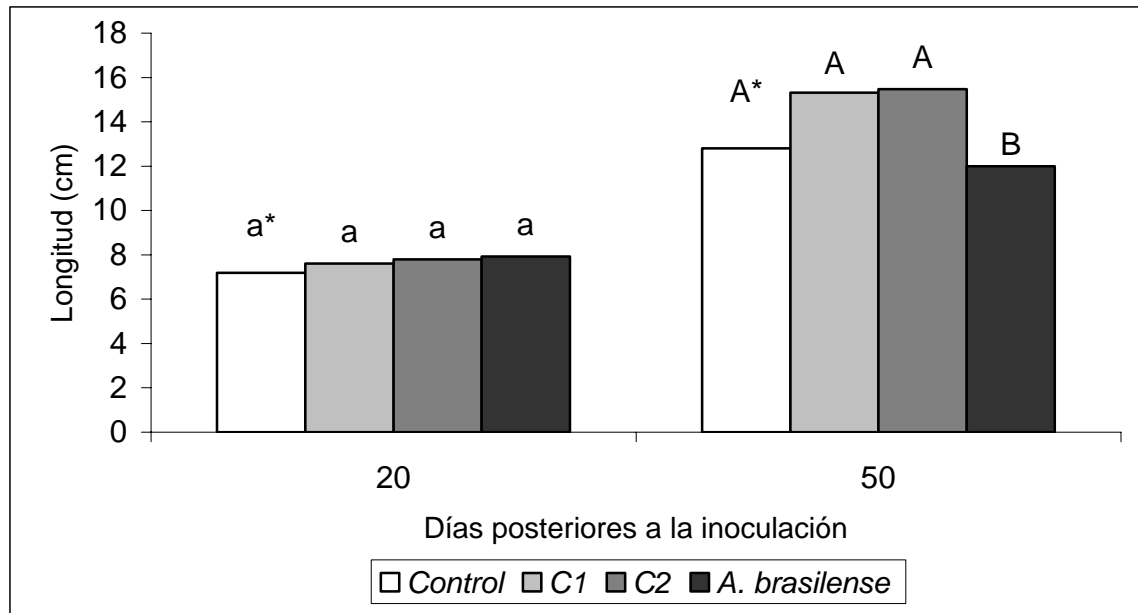
*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 9 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre el peso seco radical de plantas de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

A los 20 días de desarrollo no se presenta un incremento en el peso seco radical en las plantas causado por las cepas bacterianas, inclusive la Figura 9 muestra que la cepa C2 presenta diferencias estadísticas con el tratamiento control. Las diferencias se presentan a los 50 días de desarrollo, debido a que las cepas C2 y *A. brasilense* presentan diferencias estadísticamente significativas en relación al tratamiento con la cepa C1 y el tratamiento control. Esto se manifiesta, en un 80% de incremento en peso seco radical entre el tratamiento con la cepa *A. brasilense* y el tratamiento control.

Además, de las determinaciones de pesos sobre el sistema radical se midió la longitud de la raíz principal y la superficie radical. En la Figura 10 y 11 se observa el efecto de las inoculaciones sobre el desarrollo radical.

4.5.4 Longitud radical. Efecto de las inoculaciones con las cepas: *A. brasilense*, C1 y C2 sobre la longitud radical.

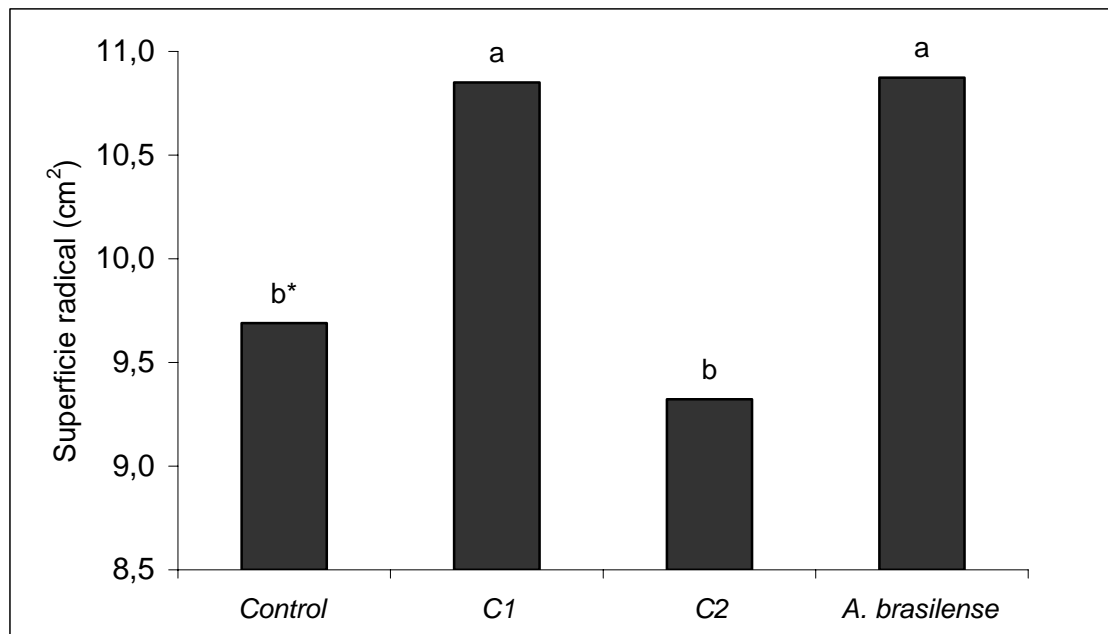


*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett) para cada uno de los tiempos del experimento

FIGURA 10 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre la longitud radical de *L. perenne*, con 20 y 50 días posteriores a la inoculación.

La Figura 10 muestra que a los 20 días posteriores a la inoculación no existieron diferencias estadísticamente significativas de longitud radical entre los tratamientos inoculados y tratamiento control. A los 50 días de inoculación la longitud de raíces de *L. perenne* presentó diferencias estadísticas con el tratamiento de *A. brasilense*, el cual fue menor que el tratamiento control. Sin embargo, los tratamientos inoculados con la cepa C1 y C2 no produjeron diferencias estadísticas en longitud radical con respecto al tratamiento control.

4.5.5 Superficie radical. Efecto de las inoculaciones con las cepas: *A. brasilense*, C1 y C2 sobre la superficie radical.



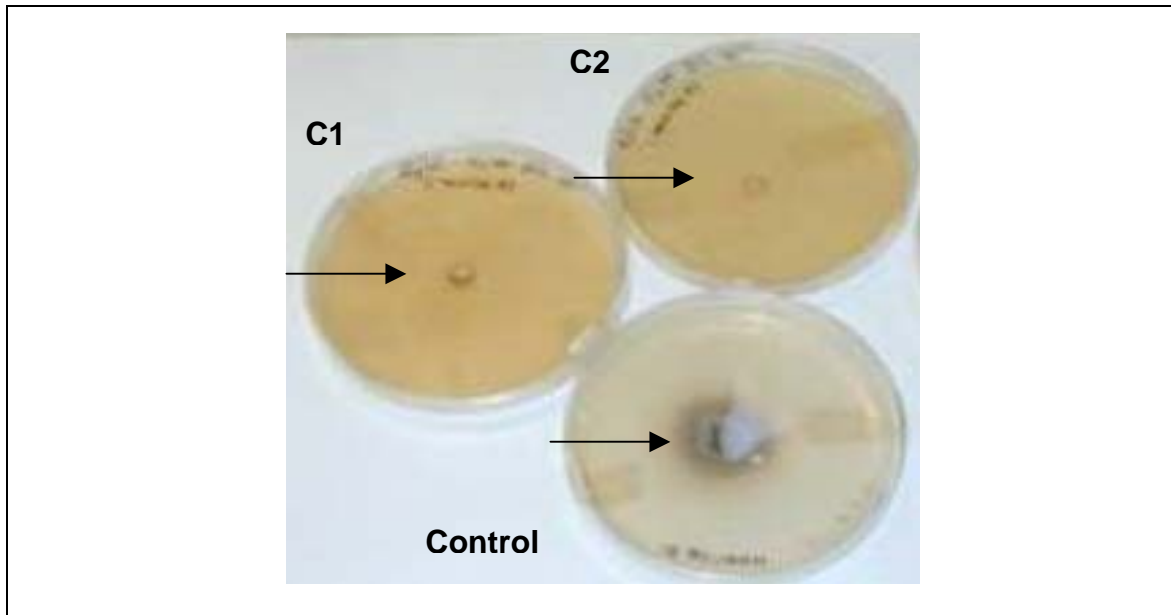
*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% (Dunnett)

FIGURA 11 Efectos de las inoculaciones con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* sobre la superficie radical de plantas de *L. perenne* a los 20 días posteriores a la inoculación.

La Figura 11 muestra las diferencias estadísticamente significativas en la superficie radical, cuando las plantas de *L. perenne* fueron inoculadas con las cepas C1 y *A. brasilense*. Ambas presentaron diferencias estadísticas al evaluar el efecto causado en la superficie radical de plantas de *L. perenne*, incrementando la superficie radical en un 12%. Sin embargo, la cepa C2 no presentó diferencias estadísticas en la superficie radical en relación al tratamiento control.

4.6 Control de antagonismo biológico sobre el hongo *Monilia* spp.

El control de antagonismo fue realizado utilizando las cepas C1 y C2 enfrentándolas al hongo fitopatógeno del género *Monilia* spp. La metodología empleada, fue anteriormente señalada (ver 3.4). La fotografía evidencia una actividad antagonista de las cepas bacterianas sobre este hongo patógeno.



Se incluye una placa de APD Control con abundante crecimiento del hongo.

Las flechas señalan el crecimiento del hongo sobre el césped bacteriano.

FIGURA 12 Placas agar papa dextrosa (APD) evidenciando la acción inhibitoria de las cepas bacterianas C1 y C2 frente al crecimiento del hongo *Monilia* spp.

La Figura 12 detalla el efecto inhibitorio de crecimiento que presentan las cepas bacterianas en contra del hongo del género *Monilia* spp. Se presentan la acción de las cepas C1 y C2. La placa control no posee ninguna cepa bacteriana y es la placa que presenta el mayor crecimiento del hongo, en contraste las placas con las cepas C1 y C2 detienen el crecimiento del hongo, manifestando un efecto de antagonismo en contra del mencionado hongo.

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las muestras de rizósfera de *L. perenne* fueron obtenidas de suelo volcánico como se indica en el punto 3.1.1. El trabajo de aislamiento de las bacterias fue realizado utilizando caldos y medios de cultivo libre de nitrógeno (ver 3.1.2). Utilizando agar rojo congo con ácido málico, como medio selectivo para aislar microorganismos fijadores de N_2 . Según RODRIGUEZ-CACERES (1982) son muestras positivas las colonias aisladas, rojas escarlatas, consistencia seca, borde irregular, superficie rugosa y con abundante crecimiento, utilizando estos criterios se obtuvieron 14 colonias.

Del total de 14 cepas aisladas, se seleccionaron sólo dos, las denominadas C1 y C2. La razón de esta selección radica en que ambas presentaban niveles FBN, superior a 2500 nmol C_2H_4 /mL/día. Las restantes poseían rangos de fijación que no sobrepasaban los 5 nmol C_2H_4 /mL/día (ver Cuadro 1). Lo que representa una muy baja FBN, no siendo consideradas como bacterias fijadoras de N_2 . SELDIN *et al.* (1984) aislaron desde suelo y raíces de trigo y pastos forrajeros bacterias del género *Bacillus*. Este representante de género anaerobio facultativo fue considerado como un eficiente fijador, ya que alcanzaba promedios de 3120 nmol C_2H_4 /mL/día.

En la rizósfera de varias plantas, especialmente cereales, se ha podido encontrar asociadas, varios microorganismos de distintos géneros bacterianos. Entre ellos, anaerobios facultativos (*Bacillus* spp. y especies de la familia Enterobacteriaceae), organismos microaerofílicos como *Azospirillum* y organismos aerobios que pueden fijar N_2 . Al comparar microorganismos con metabolismo fermentativo como las Enterobacteriaceae y los de fosforilación

oxidativa, éstas últimas son más eficientes en términos de producción de energía. Esto, se traduce en una mayor capacidad de fijación de N_2 por gramo de hidrato de carbono consumido (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Si bien, las cepas C1 y C2 no representaron la habilidad fijadora de un microorganismo microaerófilico como el género *Azospirillum*, ni mucho menos la de un microorganismo simbiote, se puede considerar que presenta una habilidad fijadora de N_2 . Sin embargo, estas cepas presentarían un metabolismo menos eficiente, consumiendo una mayor cantidad de hidratos de carbono para realizar la fijación biológica de N_2 (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Dentro de la familia Enterobacteriaceae existen varias especies que se encuentran comúnmente asociadas a las raíces de las plantas, entre ellas: *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Sin embargo, solamente en la especie *P. agglomerans* se ha podido encontrar en su plasmidio la presencia de los genes *nif*, cuya expresión es responsable de la fijación biológica de N_2 (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Se han aislado dos cepas fijadoras de N_2 , que poseen la particularidad de ser autóctonas lo que les confiere una característica fundamental en comparación a cepas alóctonas que no están adaptadas, a las condiciones de clima y suelo de nuestra zona.

La FBN no es la única propiedad que poseen estas bacterias promotoras de crecimiento vegetal, sino también la capacidad de biosintetizar sustancias promotoras de crecimiento, como las auxinas, esta habilidad se manifiesta en medios suplementados con L-triptófano, el principal precursor de la biosíntesis de AIA (BRANDL *et al.*, 1996).

Existen varias vías de biosíntesis de AIA que han sido reportadas. La producción de AIA vía indol-3-acetamida ha sido descrita para la especie patógena *Agrobacterium tumefaciens* causante de tumores en vegetales. En contraste, microorganismos no patógenos como *P. agglomerans* utilizan las vías de síntesis de AIA, las llamadas indol-3-pirúvico e indol-3-acetaldehído (BRANDL *et al.*, 1996). Esto, también fue propuesto como la vía de síntesis de AIA de varios microorganismos, entre ellos, bacterias del género *Azospirillum* (COSTACURTA *et al.*, 1994).

Al agregar suplementos de triptófano *P. agglomerans* es capaz de sintetizar grandes cantidades de AIA (BRANDL *et al.*, 1996). Sin embargo, al no agregar este suplemento al medio de cultivo *P. agglomerans* sólo sintetiza pequeñas cantidades de AIA, debido a que la poca cantidad de triptófano que sintetiza este microorganismo es utilizado en sus procesos metabólicos (BRANDL *et al.*, 1996). Este hecho también ha sido demostrado en *A. brasilense* Cd (OMAY *et al.*, 1993). Las cepas C1 y C2 presentaron biosíntesis de compuestos indólicos, cuando se suplementaron con pequeñas cantidades de triptófano al medio de cultivo, equivalentes a *A. brasilense* FT326, cepa seleccionada por su alta capacidad de síntesis de AIA.

Las cepas C1 y C2 poseen altos rangos de biosíntesis de compuestos indólicos. A las 48h se presentó la máxima biosíntesis (equivalente a 30 µg/mL de cultivo, ver Figura 1). Sería interesante realizar mediciones a tiempos mayores a las 48 h, debido a que en este período, ésta continuaba incrementándose. De esta manera, se determinaría el período de tiempo en que la producción de índoles se estabilizaría o disminuiría, utilizando esta información para precisar el momento adecuado de inoculación y mejorar las respuestas en la interacción bacteria-planta.

Al analizar el resultado del APi 20 E que otorgó como resultado que las cepas C1 y C2 pertenecían al género *Serratia* (82,5% de certeza), por los resultados de la amplificación directa por PCR del ADNr 16S, secuencia parcial del mismo (con lectura en dos direcciones) que determinó que la cepa C2 pertenecía al género *Pantoea* (98,5% de similitud, ver 4.3.3). El resultado de la secuenciación molecular por ser un sistema de identificación bacteriana fidedigno y con una metodología que otorga un mayor grado de confianza, se determinó que la cepa aislada pertenece a la especie *Pantoea agglomerans*.

Utilizando como metodología de identificación bacteriana la secuenciación molecular del ADNr 16S, KÄMPFER *et al.* (2005) consideraron como porcentajes altos y confiables de similitud porcentajes entre 98,5 % y 99 % cuando identificó microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, *Enterobacter dissolvens* y *Enterobacter cloacae*, respectivamente.

El género *Pantoea* pertenece a un grupo bacteriano nuevo, debido a que fue creado por GAVINI *et al.* (1989), es decir, posee menos de 20 años. Es por esto que la información que se ha descrito hasta la fecha es poca comparado con otros géneros bacterianos. Un aporte de esta investigación radica en contribuir con más antecedentes para el estudio del género *Pantoea*. En este sentido, es importante añadir información en la caracterización de estas cepas que poseen la capacidad de fijar N₂ atmosférico y biosintetizar compuestos indólicos.

LOIRET *et al.* (2004), aislaron una nueva bacteria endofítica fijadora de N₂, identificada vía secuenciación del ADNr 16S, esta bacteria corresponde al género *Pantoea*, capaz de producir H₂ y crecer en un rango amplio de condiciones, fue aislada de tejidos de tallos de caña de azúcar. Los autores concluyen que esta cepa, con estos atributos, puede ser de gran utilidad para la agricultura.

En relación a la proliferación de raíces causado por las cepas C1 y C2 en plantas, OKON y CASTRO-SOWINSKI (2004) señalan que el AIA proporcionado por las bacterias PGPR causa un mayor desarrollo de raíces, aumento del nivel de nutrientes y eventualmente el aumento en el crecimiento de la planta. Sin embargo, la incorporación de AIA debe ser regulada estrictamente, porque el exceso de AIA puede causar inhibición en la longitud de las raíces de la planta.

GLICK *et al.* (1999) proponen que las bacterias que secretan bajos niveles de AIA (10^{-9} a 10^{-12} M) estimulan la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales y adventicias, causando un aumento en la superficie radical. Esto se evidenció en las plantas de *L. perenne* que aumentaron en 12% la superficie radical de las plantas inoculadas con respecto al tratamiento control, sin encontrar diferencias en la longitud de la raíz principal.

El aumento de la proliferación de pelos absorbentes provocado por microorganismos que biosintetizan compuestos indólicos fue observada en esta investigación, cuando se inocularon las cepas C1 y C2 en plantas de alfalfa y tomate (Figuras 2,3 y 4).

KAPULNIK *et al.* (1985a) inoculando plantas de trigo con distintas concentraciones de *A. brasilense*, demostraron que existen ciertas concentraciones bacterianas que promueven mayores respuestas de crecimiento en las plantas. Las óptimas concentraciones que aumentaron la longitud radical de las plantas de trigo cv. Miriam es de 10^5 - 10^6 UFC/mL. Por otro lado, concentraciones de 10^8 - 10^9 UFC/mL causan un efecto contrario e inhiben el desarrollo radical.

Las inoculaciones a *L. perenne* con las cepas C1, C2 y *A. brasilense* fueron efectuadas con una concentración de 10^7 UFC/mL. KAPULNIK *et al.* (1985a) al inocular siete variedades de trigo demostraron que la óptima concentración de células de *A. brasilense* para aumentar la elongación de la raíz es de 10^4 UFC/mL, concentraciones mayores inhiben el desarrollo de la longitud radical. Esto es causado por una competencia por parte de las bacterias que se presenta por la colonización de sitios específicos de activo crecimiento en las raíces de las plantas.

KRUMPHOLZ (2003) no encontró diferencias significativas en longitud radical entre tratamientos de plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* FT 326. Idéntica situación se presentó en este trabajo con plantas de *L. perenne*, las inoculaciones con las cepas C1 y C2 no presentaron estímulos para provocar el aumento en longitud radical. Las diferencias entre plantas inoculadas y control se evidenciaron notoriamente en el peso fresco y seco radical, en la cual existieron diferencias de 40% a los 20 días y de más de 100% a los 50 días después de inoculado en peso fresco radical (Figuras 10 y 11).

En general, se ha encontrado testimonios de inoculaciones en diversas gramíneas utilizando la cepa *A. brasilense* FT 326 modificando positivamente el contenido de biomasa fresca (KAPULNIK *et al.*, 1985a; RIBAUDO *et al.*, 1998 y 2001; CURÁ *et al.*, 2005).

Los incrementos en peso fresco de brotes fueron estimulados por las inoculaciones de las cepas bacterianas. La Figura 5 muestra que a los 20 días después de inoculado la cepa C2 aumento en un 14% el peso fresco de los brotes. Este porcentaje de incremento fue más notorio cuando las plantas de *L. perenne* fueron cosechadas a los 50 días después de la inoculación, en el cual la cepa *A. brasilense* aumento en un 42% el peso fresco aéreo. CURÁ *et*

al. (2005) al inocular plantas de arroz variedad El Paso 144 reportaron incrementos de 151% en peso fresco aéreo entre planta inoculadas con *A. brasilense* FT 326 y tratamiento testigo.

La Figura 6 presenta el incremento en el peso seco de brotes de plantas inoculadas con las cepas C1 y C2 con respecto al tratamiento testigo en ambos períodos de tiempo de evaluación. A los 20 días de inoculación existe un 20% de incremento, esta cifra aumenta a un 30% cuando las plantas fueron cosechadas a los 50 días después de la inoculación. Por ello, estos resultados sugieren que existe un factor tiempo de contacto entre planta y microorganismo que beneficia al vegetal para incrementar su crecimiento, dependiendo de la cepa.

Experimentos anteriores, al evaluar la altura de vástagos en plantas de tomate se ha observado que tratamientos inoculados con *A. brasilense* FT 326 superaron en un 20% al tratamiento control (KRUMPHOLZ, 2003). Esto concuerda con lo hallado por BASHAN (1998) en ensayos realizados con bacterias del género *Azospirillum* sobre plantas de tomate. En este estudio, la longitud de los brotes de ballicas fueron estimulados por las inoculaciones de las cepas C1 y C2, existiendo diferencias de un 20% con respecto al tratamiento control.

OKON y LABANDERA-GONZALEZ (1994) realizaron una acabada revisión durante 20 años (1974-1994) de las experiencias realizadas con respecto a las inoculación de de PGPR en distintos países y en condiciones edáficas y climáticas muy diversas. Efectos positivos fueron obtenidos en el 60-70% de los experimentos de inoculación, con incrementos significativos, generalmente en el rango de 5-30% en los rendimientos de los cultivos. En contraste, en la literatura internacional se encuentran estudios que indican que

las respuestas a la inoculación con PGPR son variables y en algunos casos inconsistentes.

En relación al efecto antagonista reportado en esta investigación de las cepas aisladas en contra de *Monilia* spp., hongo que ataca al duraznero. EL-GOORANI *et al.* (1992) proponen que diferentes cepas de *P. agglomerans* poseen diversos espectros de acción antimicrobiana y antifúngica. WRIGHT *et al.* (2001) determinaron que el efecto del antagonismo de *P. agglomerans* sobre *Erwinia amylovora*, causante del tizón del fuego en árboles frutales de manzanas y peras, era causado por dos antibióticos producidos por la bacteria denominados pantocina A y B.

El efecto antagonista presentado por las cepas C1 y C2 se muestra como un interesante atributo de estas cepas, que debe ser estudiado con mayor profundidad, para analizar su utilidad y real alcance en el biocontrol de hongos patógenos.

6 CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis planteada que, existen cepas bacterianas obtenidas de la rizósfera de suelo volcánico, que al ser inoculadas en plantas de *Lolium perenne* cultivar Nui promueven el crecimiento vegetal.

De un total de 14 cepas evaluadas, sólo dos cepas (C1 y C2) presentaron capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Además, éstas fueron capaces de biosintetizar compuestos indólicos.

La síntesis de sustancias indólicas de la cepa C2 fue de similares características producida por la cepa *A. brasilense* FT 326, considerada como altamente productora de este tipo de sustancias.

La cepa C2 fue identificada, mediante la secuenciación de ADNr 16S, indicando que corresponde a la especie *Pantoea agglomerans*.

La promoción del crecimiento se evidenció en *L. perenne* al incrementar el desarrollo de la zona aérea y radical, destacando el aumento en peso seco de brotes en un 30% en plantas de 50 días posterior a la inoculación. Además, se evidenció el aumento de pelos absorbentes en tomate y alfalfa que sugiere una promoción del crecimiento radical.

Aparentemente, las cepas C1 y C2 presentan un efecto antagonista del crecimiento del hongo patógeno del género *Monilia* spp., el cual debe ser estudiado y cuantificado en estudios posteriores.

7 RESUMEN

Se recolectaron muestras de rizósfera de *L. perenne* de un suelo volcánico, de la Provincia de Valdivia. A partir de éstas, se aislaron bacterias que fueron evaluadas por su fijación biológica de N₂, de las cuales las cepas denominadas C1 y C2 presentaron actividad de la enzima nitrogenasa.

Estas cepas autóctonas fueron evaluadas por su biosíntesis de compuestos indólicos. Siendo, la cepa C2 la de mayor producción, igualando la capacidad de síntesis de *A. brasilense* FT 326, considerada como altamente productora de auxinas.

Estas cepas fueron identificadas taxonómicamente por pruebas bioquímicas, identificación bacteriana y molecular. Estas, permitieron determinar que la cepa C2, pertenece a la especie *Pantoea agglomerans*.

Posteriormente, se determinó el efecto promotor de crecimiento vegetal; al inocularlas en semillas de *L. perenne* cultivar Nui, destacando el aumento en el peso seco de brotes de un 30% en plantas de 50 días después de la inoculación. En alfalfa y tomate se confirmó el efecto promotor de crecimiento vegetal, aumentando la cantidad de pelos absorbentes en plantas inoculadas.

Además, se sugiere evaluar y cuantificar el efecto antagonista de hongos que otorgó resultados positivos sobre *Monilia* spp.

SUMMARY

Plants of ryegrass (*Lolium perenne*) growing on a volcanic soil from the province of Valdivia (Chile) were used to isolate bacteria from their rhizosphere. From these isolations, tests were conducted in order to select biological nitrogen fixers. Two strains designated as C1 and C2 showed the highest levels of nitrogenase activity.

Both autochthonous isolates were used to test their activity for biosynthesis of indole compounds. Isolate C2 demonstrated a high level of production of this substance, equaling the capacity of *Azospirillum brasilense* FT 326 considered one of the top indole producers.

These strains were taxonomically identified by molecular and biochemical assays. Results indicated that C2 belongs to the specie *Pantoea agglomerans*.

The plant growth promotion effect was also determined inoculating raygrass seedlings cv. Nui. Dry weight was increased by 30%, after fifty days of plant growth. Using alfalfa and tomatoes seedlings the effect of plant growth promotion was confirmed through an increase on the amount of radical absorbent roots of inoculated seedlings.

Finally, we also report the antagonistic effect of both isolates C1 and C2, on mycelium growth detention of the brown root pathogen *Monilia* spp.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADACHI, K., NAKATANI, M. y MOCHIDA H.. 2002. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48: 889-895.
- ADACHI, K. y ASIS, C. A. JR. 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* from sweetpotato stem and enhancement of N₂-fixing activity of *P. agglomerans* by co-culture with non-diazotrophic endophyte *Enterobacter asburiae*. *Kyushu Okinawa Nougyou Kenkyu Seika Jouhou* 18: 583-584.
- ALEXANDRE, G. y ZHULIN, I. B. 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* 183: 4681-4686.
- ALTSCHUL, S., MODDEN, T., SCHAFER, A., ZHANG, J., MILLER, W. y LIPMAN, D. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3404.
- ANSARI, S. A., PRAMOD, K. y GUPTA B. N. 1995. Root surface area measurements based on adsorption and desorption of nitrite. *Plant and Soil* 175: 133-137.
- ASIS, JR. C. A. y ADACHI, K. 2004. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Let. Appl. Microbiol.* 38: 19-23.

- BAR, T. y OKON, Y. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Can. J. Microbiol.* 39: 81-86.
- BASHAN, J. y HOLGUIN, G. 1997. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2120-2131.
- BASHAN, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44: 168-174.
- BERG, G.; ZOCK, A.; SMALLA, K.; EBERL, L.; ROSKOT, N.; y STEIDLE, A. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3328-3338.
- BOTTINI, R., FULCHIERI, M., PEARCE, D. y PHARIS, R. P. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90: 45-47.
- BRANDL, M., CLARK Y. y LINDOW, S.E. 1996. Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an apiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Can. J. Microbiol.* 42: 586-592.
- BROWN, M. E., BURLINGHAM, S. K. y JACKSON, R. M. 1974. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effect of artificial inoculation on crop yields. *Plant Soil* 20: 194-214.

- BURDMAN, S., OKON, Y., y JURKEVITCH, E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots, CRC. Crit. Rev. Microbiol. 26: 91-110.
- BURDMAN, S., DULGUEROVA, G., OKON, Y., y JURKEVITCH, E. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. American Phytopath. Soc. 14: 551-561.
- CHELIUS, M. y TRIPLETT, E. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase Reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. Appl. Environ. Microbiol. 66: 783-787.
- COSTACURTA, A., DEIJERS, V. y VANDERLEYDEN, J. 1994. Molecular and sequence analysis of and *A. brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. Mol. Gen. Genet. 243: 463-472.
- CURÁ; J. A., RIBAUDO; C. M., GAETANO, A. M. y GHIGLIONE, H. 2005. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en cultivo de arroz durante las primeras etapas del desarrollo. Rev. Foro Arrocerero Lat. 11: 10-13.
- DÖBEREINER, J., MARRIEL, I. E. y NERY, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Manual of determinative Bacteriology. Williams y Wilkins. Estados Unidos. pp 40-42.
- DÖBEREINER, J. y PEDROSA, F. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers. Estados Unidos. 155 p.

- EL-GOORANI, M. A., HASSANEIN, F. M. y SHOEIB, A. A. 1992. Antibacterial and Antifungal spectra of antibiotics produced by different strains of *Erwinia amylovora* (= *Pantoea agglomerans*). J. Phytopathol. 136: 335-339.
- GAVINI, F., MERGAERT, A. BEJI, C. MIELCAREK, D. IZARD, K. KERSTERS, A y DELEY, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1888) Swing and Fife 1972 to *Pantoea agglomerans* gen nov. as *P. agglomerans* comb. Nov. and description of *P. dispersa* sp. nov. Int. J. Bacteriol. 39: 337-345.
- GLICK, B. R., PATTEN, C. L., HOLGUIN, G. y PENROSE, D. M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College press. London. 270 p.
- HARDY, R. W. F., HOLSTEN, R. D., JACKSON, E. K. y BURNS, R. C. 1968. The acetylene ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43: 1185-1207.
- HEGAZI, N. A., EID, N., FARAQ, R. y MONIB, M. 1979. Asymbiotic N₂ fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid conditions of Egypt. Rev. Ecol. Biol. Sol. 16: 232-237.
- JAIN, D. K., y PATRIQUIN, D. G. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. Can. J. Microbiol. 31: 206-210.
- KÄMPFER, P., RUPPEL, S. y REINER, R. 2005. *Enterobacter radicincitans* sp. Nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. Systematic App. Microbiol. 28: 213-221.

- KAPULNIK, Y., GAFNY, R. y OKON, Y. 1985a. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.* 63: 627-631.
- KAPULNIK, Y., OKON, Y. y HENIS, Y. 1985b. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- KLEEBERGER, A., CASTORPH, H. y KLINGMÜLLER, W. 1983. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* 136: 306-311.
- KRUMPHOLZ, E. 2003. Cambios en el patrón de crecimiento y producción de etileno en plantas de tomate inoculadas con *Azospirillum*. Tesis Lic. Agr. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 35 p.
- LOIRET, F. G., ORTEGA, E., KLEINER, D., ORTEGA-RODÉS, P., RODÉS, R. y DONG, Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. From sugarcane. *J. Appl. Microbiology.* 97: 504-511.
- MERBACH, W., RUPPEL, S. y SCHULZE, J. 1998. Dinitrogen Fixation of Microbe-Plant Associations as Affected by Nitrate and Ammonium Supply. *Environ. and Health St.* 34: 67-73.
- MOENS, S.; K. MICHIELS; V. KEIJERS; F. VAN LEUVEN; y VANDERLEYDEN, J. 1995. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 177: 5419-5426.

- O'HARA, G. W., DAVEY, M. R. y LUCAS, J. A. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 27: 871-877.
- OMAY, S.H., SCHMIDT, W.A., y MARTIN, P. 1993. Indolacetic acid production by rhizosphere bacterium *A. brasilense* Cd under in vitro conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 187-192.
- OKON, Y., ALBRECHT, S. L. y BURRIS, R. H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 127: 1248-1254.
- OKON, Y. y KAPULNIK, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 90: 30-35.
- OKON, Y., y LABANDERA-GONZÁLEZ, C. A.. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- OKON, Y. y CASTRO-SOWINSKI, S. 2004. Physiological features of *Azospirillum* in the rhizosphere. In: M. Monzon de Asconegui, I. García de Salamote y S. Miyazaki. (eds). *Biología del suelo*. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires, Argentina. pp. 34-35.
- PATRIQUIN, D. C., DÖBEREINER, J y JAIN, D. K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-915.
- PATTEN, CH. y GLICK, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indolacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.

- PRASAD, G., EVAN, K., NATARAJAN, M., PALLAVOLU, M., REINHOLD-HUREK, B. y LADHA, J. 2001. Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634-2645.
- RENNIE, R. J. y RENNIE, D.A. 1983. Techniques for quantifying N₂ fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.* 29: 1022-1035.
- RIBAUDO C.M., RONDANINI D.P., PACCUSSE A.N., CURÁ J.A. y FRASCHINA, A. 1998. *Azospirillum*-maize association: effects on dry matter yield and nitrate reductase activity. *Agr Trop Subtrop* 31: 61-70.
- RIBAUDO C. M., RONDANINI D. P., CURÁ J. A. y FRASCHINA, A. 2001. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. *Biol. Plant.* 44: 631-634.
- RIGGS, P.J., CHELIUS, M.K., INIGUEZ, A.L., KAEPLER, S.M. y TRIPLETT, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 829-836.
- RODRÍGUEZ-CÁCERES, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- RUPPEL, S., C. HECHT-BUCHHOLZ, R. REMUS, U. ORTMANN y SCHMELZER, R. 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant Soil* 145: 261-273.

- SAKASAKI, R. 1974. Genus IX. *Serratia* Bizio 1823. In: R. Buchanan and N. Gibbons (eds). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* 8th.Edn. Williams and Wilkins, Baltimore. 326 p.
- SELDIN, L., VAN ELSAS, J. D. y PENIDO, E. 1984. *Bacillus azotofixans* sp. Nov. a nitrogen-fixing specie from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 451-456.
- SINGH, M., KLEEBERGER, A. y KLINGMÜLLER, W. 1983. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen. Genet.* 190: 373-378.
- STEEL, R. G. D. y TORRIE, J. H. 1984. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Bogotá. McGraw-Hill. 622 p.
- SUNDARAM, S., ARUNAKUMARI, A. y KLUCAS, R. V. 1988. Characterization of *azospirilla* isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34: 212-217.
- TARRAND, M., KRIEG, N. y DÖBEREINER, J. 1974. The genus *Azospirillum*. In: N. Krieg and J. Döbereiner (eds). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* 8th. Edn. Williams and Wilkins, Baltimore. pp 94-104.
- TIEN, T. M., GASKINS, M. H. y HUBBELL, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- TORRES, M., VALENCIA, S. BERNAL, J. y MARTINEZ, P. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* spp., producers of

Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Lat. Microbiol.* 42: 171-176.

VANDE BROEK A.; LAMBRECHT, M. y VANDERLEYDEN, J. 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 144: 2599-2606.

VOSE, P. B. 1983. Developments in non legume N₂-fixing systems. *Can. J. Microbiol.* 29: 837-850.

WRIGHT, S., ZUMOFF, C. SCHNEIDER, L. y BEER, S. 2001. *Pantoea agglomerans* EH318 producer two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora in vitro*. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 284-292.

ANEXOS

ANEXO 1. Tinción de Gram.

Tinción de células con reactivos: violeta de genciana, lugol, etanol 96% y fucsina de Gram.

ANEXO 2. Composición agar urea Christensen.

Se utiliza para determinar la presencia de la enzima ureasa.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona	1,0
Glucosa	1,0
NaCl	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Rojo Fenol	0,012
Agar	20,0
Extracto Levadura	0,1
Urea	20,0
Agua	1L

ANEXO 3. Composición medio P (piocianinas):

Permite determinar la producción de pigmentos difusibles por parte de los microorganismos estudiados.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona	20,0
Cloruro de Magnesio	1,4
Sulfato de potasio	10,0
Glicerol	10 mL
Agar	13,0

ANEXO 4. Composición medio F (fluoreceinas).

Permite determinar la producción de pigmentos difusibles por parte de los microorganismos estudiados.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona de caseina	10,0
Peptona de carne	10,0
Sulfato de Magnesio	1,5
Fosfato de Potasio dibasico	1,5
Agar	12,0

ANEXO 5. Composición agar cetrimida.

Prueba bioquímica selectiva para bacterias del género *Pseudomonas*.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Peptona de gelatina	20,0
Cloruro de Magnesio	1,4
Sulfato de Potasio	10,0
Cetrimida	0,3
Agar	13

ANEXO 6. Composición caldo de cultivo NFb.

Caldo de cultivo selectivo para asilar bacterias fijadoras de N₂.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Ácido málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	0,02
Solución de micronutrientes	2ml
Azul de bromotimol en KOH 0,2 N	sol 0,5% 2 mL
Fe EDTA sol 1,64%	4 mL
KOH	4,5
Solución vitamínica	1 mL

ANEXO 7. Composición medio rojo congo ácido málico.

Medio selectivo para aislar bacterias fijadoras de N₂ y que utilicen ácido málico como principal fuente de carbono.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Ácido málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extracto Levadura	0,5
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,015
KOH	4,8
Agar	20,0
Solución Rojo Congo (1:400)	15 ml. (Esterilizado por filtración) pH 6.5

ANEXO 8. Composición agar papa dextrosa (APD).

Utilizado para la obtención de colonias puras.

APD Merck	39g
Agua destilada	1L

ANEXO 9. Composición agar peptona.

Utilizado para la obtención de colonias puras.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
Extracto de carne	3
NaCl	5
Peptona de Caseína	10
Agar	20
Agua destilada	1L

ANEXO 10. Composición agar nutriente.

Utilizado para la obtención de colonias puras.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (g/L)</u>
AN OXOID	23
Extracto de levadura	0,5
Agar	0,5
Agua destilada	1L

Los medios serán ajustados a pH 6,5 con KOH y autoclavado a 121°C a una atmósfera por 15 min.

ANEXO 11.Composición medio Hoagland.

Solución nutritiva utilizada como sustrato para el cultivo y desarrollo de plantas de *L. perenne*.

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad (mL/L)</u>
Ca(NO ₃) ₂	5
K(NO ₃)	5
MgSO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
Sol. Fe EDTA(1.64%)	1
Sol. Micronutrientes	1
Agua	1L
pH 6.0	