

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

Efecto promotor del crecimiento vegetal de dos cepas de
Pantoea agglomerans (Ewing y Fife, 1972) sobre ballica
inglesa (*Lolium perenne* L.) Cv. Nui

Tesis presentada como parte de los requisitos
para optar al grado de Licenciado en
Agronomía.

CAROL ANNE WIJNANT MACLEAN

VALDIVIA-CHILE

2008

Profesor patrocinante:

Luigi Ciampi P.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luigi Ciampi', written over a horizontal line.

Profesor informante:

Ignacio Lopez C.
Ing. Agr., Ph. D.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ignacio Lopez C.', written over a horizontal line.

Profesor informante:

Juan Nissen M.
Ing. Agr., Dr. rer. Hort.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Juan Nissen', written over a horizontal line.

A mis padres, de todo corazón, a quienes amo y agradezco su constante apoyo a lo largo de toda mi vida.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Ballica inglesa (<i>Lolium perenne</i> L.)	3
2.2	Fijación biológica de nitrógeno	3
2.3	Rizósfera	5
2.4	Microorganismos fijadores de nitrógeno	6
2.4.1	Fijación asociativa de N	7
2.5	Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.5.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	8
2.5.2	PGPR	9
2.5.2.1	Acido indol acético	10
2.5.3	Colonización	11
2.5.3.1	Quimiotaxis	12
2.6	Biofertilizantes	13
2.6.1	Encapsulación	14
3	MATERIALES Y METODO	15
3.1	Realización y ubicación del ensayo	15
3.2	Bioencapsulación de las cepas	16
3.2.1	Fuente de las cepas	16
3.2.2	Bioatrapamiento de las cepas	18
3.2.2.1	Encapsulación de las cepas	18
3.2.2.2	Método para inocular bacterias en caldo	18
3.2.2.3	Concentración celular	18
3.2.2.4	Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)	20

3.3	Parámetros de evaluación con ballica	21
3.3.1	Constitución del ensayo en macetas	21
3.3.2	Pruebas de germinación	22
3.3.3	Enmienda y fertilización del sustrato	23
3.3.4	Siembra en invernadero	24
3.3.5	Riego de las plantas de <i>L. perenne</i>	25
3.3.6	Cortes	25
3.3.7	Evaluación del estudio	26
3.3.7.1	Altura de planta	27
3.3.7.2	Área foliar	27
3.3.7.3	Peso fresco y peso seco	27
3.3.7.4	Peso y número de macollos	27
3.3.7.5	Evaluación de contenido de nitrógeno	28
3.3.8	Diseño experimental	28
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	31
4.1	Biocápsulas	31
4.2	Primera evaluación	33
4.2.1	Peso seco aéreo	33
4.2.2	Area foliar	35
4.2.3	Altura de planta	36
4.3	Segunda evaluación	38
4.3.1	Peso seco aéreo	38
4.3.2	Área Foliar	41
4.3.3	Peso seco radical	43
4.3.4	Número y peso de macollos	46
4.4	Resultados totales	51
4.4.1	Peso seco aéreo total	51
4.4.2	Área foliar total	53
4.5	Efecto de la inoculación de <i>P. agglomerans</i> sobre	

	el nitrógeno presente en plantas de ballica inglesa	54
4.5.1	Extracción de nitrógeno a nivel foliar al 1er corte	55
4.5.2	Extracción de nitrógeno a nivel foliar al 2do corte	55
4.5.3	Extracción total de nitrógeno a nivel foliar (1er y 2do corte)	56
4.5.4	Extracción de nitrógeno a nivel radicular	57
5	CONCLUSIONES	60
6	RESUMEN	61
	SUMMARY	63
7	BIBLIOGRAFIA	65
	ANEXOS	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Análisis químico del suelo usado como sustrato antes y después del proceso de esterilización (1 atm/30 min)	22
2	Diseño experimental utilizado en el ensayo	28
3	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Peso seco aéreo al 1er corte de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	34
4	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Area foliar al 1er corte de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	36
5	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre la Altura de plantas (mm) de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	36
6	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Peso seco aéreo al 2do corte (g) de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	39
7	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Area foliar al 2do corte de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	42

8	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Peso seco radical de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	43
9	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Número de macollos de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	48
10	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Peso de macollos de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	50
11	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Peso seco aéreo total (g) de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	52
12	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre el Area foliar total (cm ²) de plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	54
13	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre la Extracción de nitrógeno foliar al 1er corte (g) en plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	55
14	Efecto de <i>Pantoea agglomerans</i> sobre la Extracción de nitrógeno aéreo al 2do corte (g) en plantas de <i>Lolium perenne</i> crecidas en macetas.	56

- 15 Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno foliar total (g) en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas. 57
- 16 Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno radicular (g) en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas. 58

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cepas liofilizadas reconstituidas con 1ml de caldo peptona por tubo	17
2	Cepa 1 comprobada de <i>Pantoea agglomerans</i> , luego de realizar tinción Gram	17
3	Suspensión de bacterias antes de centrifugar	19
4	Pellet de bacterias obtenido luego de centrifugar	19
5	Encapsulación de bacterias con jeringa	20
6	Plantas de ballica antes del primer corte	25
7	1er corte de plantas de ballica	26
8	Biocápsulas conteniendo a las cepas C1 y C2	32
9	Cápsulas sembradas en las macetas	33

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Reconstitución de cepas	75
2	Preparación de agar papa dextrosa (APD)	75
3	Tinción de Gram, Prueba de la oxidasa	75
4	Caldo papa dextrosa (CPD)	76
5	Homogeneizado	76
6	Centrifugación	77
7	Acido glucónico	77
8	Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)	77
9	Cálculo dosis de semillas	78
10	Cálculo de dosis de fertilización	79
11	Cálculo peso seco del suelo	80

- 12 Figuras y Cuadros “Fertilización” para: Área foliar 1er corte; Peso de macollos; Extracción de nitrógeno aéreo 1er corte; Extracción de nitrógeno aéreo 2do corte; Extracción de nitrógeno aéreo total 80
- 13 Peso seco aéreo obtenido al primer corte, Área foliar al primer corte, Altura de planta, Peso seco aéreo obtenido al segundo corte, Área foliar al segundo corte, Peso seco radical, Número de macollos, Peso de macollos, Peso seco aéreo total, Área foliar total, Extracción de nitrógeno aéreo al primer corte, Extracción de nitrógeno aéreo al segundo corte, Extracción de nitrógeno total, Extracción de nitrógeno en tejido radicular. 87

1. INTRODUCCION

Numerosas variedades de especies gramíneas y leguminosas constituyen las principales fuentes de forraje verde en las praderas de las regiones del sur de Chile. Entre éstas, la ballica inglesa, (*Lolium perenne* L.) es la especie más utilizada por su rápido establecimiento, alta productividad, valor forrajero y por su persistencia aún bajo un intenso pastoreo. Además, al disponer de suelos con buena fertilidad, primaveras templadas y abundantes precipitaciones, llega a constituirse en una de las especies dominantes de la pradera.

En la actualidad, para las explotaciones agropecuarias, es importante establecer un equilibrio entre la rentabilidad económica, la productividad y la sustentabilidad ambiental. Las praderas se constituyen en la base primaria de la alimentación para el ganado bovino y ovino, por lo tanto, se debe considerar el maximizar su producción y utilización.

Los sistemas agrícolas se relacionan con las actividades microbianas que ocurren en el suelo, y en particular en la rizósfera de las plantas. Entre ellas, se destaca la asociación leguminosa-*Rhizobium*, cuyo resultado es la formación de nódulos en las raíces, en los cuales, el nitrógeno atmosférico molecular es fijado a compuestos nitrogenados que las plantas utilizan para desarrollarse.

Otro caso, y no menos importante, es el proceso que realizan las bacterias que forman otras asociaciones con las raíces de gramíneas. En éstas, varios tipos de microorganismos, designados como rizobacterias, tienen la capacidad de fijar nitrógeno en forma libre, enriquecer con este compuesto la

rizósfera, y por lo tanto, ser aprovechado por las plantas. Dentro de las muchas especies existentes, se destaca *Pantoea agglomerans*.

Esta compleja flora de microorganismos, además de fijar nitrógeno, e incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, produce compuestos tales como vitaminas, hormonas y antibióticos que contribuyen a la salud vegetal y a la obtención de altos rendimientos. Asimismo, mejoran la estructura del suelo, sintetizan fitohormonas y promueven el incremento de pelos radicales, entre otros atributos.

La hipótesis que se plantea en esta investigación es la siguiente: bacterias seleccionadas del suelo y clasificadas como rizobacterias promueven el crecimiento vegetal de *Lolium perenne*.

El objetivo general de este trabajo, fue evaluar a 2 cepas de rizobacterias pertenecientes al género *P. agglomerans*, aisladas de la rizósfera de plantas de *L. perenne*, y establecer su capacidad de promover el crecimiento y aporte de nitrógeno a plantas de ballica.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- a) Evaluar el crecimiento vegetal de *L. perenne* cuando es inoculada con *P. agglomerans*.
- b) Determinar el peso seco de hojas y raíces y medición de área foliar de las plantas inoculadas.
- c) Establecer a través del método Kjeldahl la eficiencia de la incorporación de nitrógeno molecular a las plantas de ballica.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Ballica inglesa (*Lolium perenne* L.).

La ballica perenne es una especie nativa de las regiones templadas y con buena precipitación de Europa, Asia y Norte de África. Es por esto, que se adapta mejor en nuestro país, en la denominada zona mediterránea húmeda, que abarca desde Malleco a Chiloé. Es importante como forraje en sistemas ganaderos, debido a su alta palatabilidad y digestibilidad, elevado potencial de rendimiento, y rápido establecimiento, además de producir un gran número de macollos (HANNAWAY *et al.*, 1999 y RUIZ, 1988).

2.2 Fijación biológica de nitrógeno.

El nitrógeno (N) es un elemento que normalmente se encuentra deficiente en la producción agrícola, ya que el suelo, a través del proceso de mineralización de la materia orgánica, no es capaz de suministrar el total requerido por los cultivos para alcanzar altos rendimientos (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

La fijación biológica de N_2 depende de la capacidad de los microorganismos de convertir el N_2 atmosférico en formas asimilables para las plantas (NH_4^+) (BURDMAN *et al.*, 1997), para ser incorporado de esta forma a componentes nitrogenados de la célula. Este proceso, llamado fijación de nitrógeno, sólo se presenta en procariontes (STANIER *et al.*, 1996).

Este tipo de fijación (FBN), representa una de las vías más importantes de acceso de este elemento a los seres vivos. Este proceso requiere de un aporte considerable de ATP (Adenosín trifosfato), y además, exige una importante disponibilidad y consumo de oxígeno (BACA, 2001).

La habilidad para fijar nitrógeno está restringida a ciertas bacterias, las cuales son denominadas “diazótrofas”. El primer producto de la fijación por parte de estas bacterias, es el amoníaco (NH_3). Los diazótrofos más importantes son aquellos que fijan en asociación con una planta, ya que el nitrógeno captado en el proceso es proporcionado directamente a la rizósfera (POSTGATE, 1990).

Las cepas diazotróficas de vida libre se encuentran en muchas especies de los géneros bacterianos *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia* y *Citrobacter* (Postgate, 1982, citado por DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Según DOBBELAERE *et al.* (2003), la FBN juega un importante rol en los sistemas agrícolas por su beneficio ambiental. El proceso disminuye la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, los cuales representan una importante proporción de los costos de producción, además de contribuir al calentamiento global, y a la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales (MADIGAN *et al.*, 1997).

La contribución de nitrógeno a la nutrición de la planta, depende de diversos factores. Estos son, la cantidad de sustratos de carbono disponibles, ya sea en las raíces o en la rizósfera; la proporción de éste sustrato que es usado por los microorganismos; la eficiencia con que lo utilizan para fijar el N_2 y la disponibilidad de este N fijado para la planta (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

El sistema enzimático que fija el N_2 (denominado complejo nitrogenasa), se compone de dos proteínas designadas como *nitrogenasa* (o componente I, o ferromolibdoproteína) y *reductasa de la nitrogenasa* (o componente II, o ferroproteína). De acuerdo a la estructura de las enzimas, el sistema nitrogenasa es un sistema complejo, lo que se debe a que está codificada por

15 genes (genes *nif*), dispuestos en 7 operones contiguos (STANIER *et al.*, 1996).

La actividad de la nitrogenasa se ve incrementada con un pH cercano a la neutralidad, un nivel alto de humedad y baja tensión de oxígeno, abundante cantidad de compuestos carbonados y energéticos (ATP). Además, de una baja concentración de compuestos de nitrógeno, tales como amonio o nitratos (TORRALBA *et al.*, 1997).

2.3 Rizósfera.

La rizósfera es la zona de suelo que rodea a las raíces y que a su vez está influenciada por el sistema radicular. Se caracteriza por presentar una alta concentración de nutrientes en comparación con el resto del suelo, en respuesta a la presencia de compuestos liberados por las plantas (ROVIRA, 1973).

Esta zona es rica en nutrientes, debido a la acumulación de una variedad de compuestos orgánicos, tales como sustratos de carbono (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987), los cuales son liberados desde las raíces de las plantas por exudación y secreción (CROZIER *et al.*, 1988).

Según DÖBEREINER y PEDROSA (1987), el enriquecimiento de diazótrofos en la rizósfera se puede atribuir a sus ventajas competitivas en un ambiente rico en C y pobre en N, a la entrega por parte de la planta de vitaminas esenciales como biotina (Martin y Glatzle, 1982) y a la atracción quimiotáctica por exudados radiculares (Balandreau, 1986).

Weller y Thomashow (1994), citados por DOBBELAERE *et al.* (2003), señalan que debido a que estos compuestos orgánicos pueden ser usados como fuente de energía y de carbono por los microorganismos, el crecimiento

microbiano es particularmente intenso en la rizósfera. Es por esto, que el número de bacterias encontradas alrededor de las raíces de las plantas es mucho mayor que en el resto del suelo.

La mayor absorción de minerales por parte de las plantas, se debe al incremento del volumen del sistema radicular. Esto se ve reflejado por un aumento en el número de raíces, grosor y largo (BISWAS *et al.*, 2000).

2.4 Microorganismos fijadores de nitrógeno.

Un microorganismo fijador de nitrógeno es capaz de infectar, multiplicar, y retener su habilidad de fijar N_2 dentro de la raíz o en la rizósfera (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Según POSTGATE (1990), los microorganismos del suelo y las plantas en crecimiento asimilan el nitrógeno como nitratos, convirtiéndolo en proteínas, ácidos nucleicos, y componentes nitrogenados menores de la célula.

Aunque se considera que los sistemas simbióticos son la vía principal de entrada de nitrógeno al ecosistema, la fijación libre puede alcanzar cierta importancia en los suelos con niveles de materia orgánica que no supongan un factor limitante para el proceso reductor de nitrógeno (GILLER *et al.*, 1984).

Las relaciones entre ciertos microorganismos y sus hospederos pueden ser categorizadas dentro de dos niveles de complejidad: rizosférico y endofítico (VESSEY, 2003).

El término endofítico, hace referencia a la colonización al interior de las plantas por microorganismos que usualmente no causan un daño a sus hospederas y viven gran parte de su vida dentro de sus tejidos, sin provocar

ningún síntoma patogénico (BALDANI *et al.*, 1997). Algunos de ellos establecen relaciones activas con sus plantas hospederas y promueven beneficios para éstas (KLOEPPER y BEAUCHAMP, 1992).

2.4.1 Fijación asociativa de N. Existen ciertas interacciones específicas entre plantas y bacterias, las cuales pueden ser llamadas como “asociaciones”, de acuerdo a la relación existente entre ambos organismos (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

El primer diazótrofo asociativo fue reportado por Beijerinck en 1925 bajo el nombre de *Spirillum lipoferum* (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

Según Word *et al.* (2001), citados por VESSEY (2003), la inhabilidad de la planta hospedera para liberar suficiente carbono a la rizósfera es la principal limitante en el desarrollo de sistemas asociativos de fijación de nitrógeno.

Existen diversas bacterias anaerobias facultativas (la mayoría de ellas son *Bacillus* spp. y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*), microorganismos microaerófilos y aerobios. En muchos casos estas bacterias se encuentran en cantidades considerables. Por lo tanto, juegan un rol importante en la fijación asociativa de nitrógeno (Bally *et al.*, 1983; Van Berkum y Bohlool 1980, citados por DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Una de las especies que se encuentra comúnmente asociada con las raíces de las plantas es *Enterobacter agglomerans*, actualmente designada como *P. agglomerans*. (RENNIE, 1980).

Todas las plantas y ciertas bacterias reducen los nitratos a amoníaco por la vía de los nitritos. Este compuesto, es entonces incorporado a los biopolímeros nitrogenados. Este proceso es designado reducción de nitrato

asimilatoria, ya que el nitrógeno del nitrato es asimilado como proteína. Este es el principal proceso por el cual el nitrógeno es incorporado a la planta y a los animales (POSTGATE, 1990).

La cantidad de nitrógeno fijado por estos microorganismos es altamente variable y dependiente del genotipo de la planta y de las condiciones ambientales (BODDEY *et al.*, 1991).

2.5 Familia *Enterobacteriaceae*.

En la mayoría de las numerosas especies que conforman la familia *Enterobacteriaceae*, existe la presencia natural de plasmidios, a partir de los cuales ocurre la fijación de nitrógeno. En estas estructuras se encuentran los genes *Nif* (Nitrogen fixation, genes fijadores de nitrógeno). Su transmisión y expresión pueden explicar la dispersión de diazótrofos en varias de las especies correspondientes a esta familia (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Una propiedad bioquímica que distingue a algunas de las cepas de *Enterobacter* de otras bacterias entéricas, es la capacidad de fijar nitrógeno. Esta propiedad sólo se manifiesta en condiciones anaeróbicas de crecimiento, ya que la nitrogenasa de estas bacterias se desnaturaliza rápidamente por la presencia de oxígeno (STANIER *et al.*, 1996).

2.5.1 *Pantoea agglomerans*. Pertenece a un gran grupo de *Enterobacteriaceae*, y está emparentada con *Erwinia herbicola* (BEIJI *et al.*, 1988). La relación entre ambos géneros se determinó mediante hibridación de DNA/DNA, y por propiedades fenotípicas (SCHOEBITZ, 2005).

El género *Pantoea* fue primero establecido por GAVINI *et al.* (1989). A pesar de la distinción fenotípica, *E. herbicola*, *E. milletiae* y *E. agglomerans* fueron transferidos al género *Pantoea*, basándose en su alta homología con

respecto al DNA (GAVINI *et al.*, 1989).

La primera cepa de *P. agglomerans* (NO30) fue aislada por Omar *et al.* (1989) de la rizósfera de arroz, en Giza (Egipto). Este es el primer informe de *P. agglomerans* aislada como una bacteria diazótropa endófito (ELVIRA RECUENCO y VAN VURDEE, 2000).

En los años 90's, en Beijing (China), se aisló la cepa YS19, la cual pertenecía a una bacteria endófito diazótropa, de una planta de arroz (*Oryza sativa* cv. Yuefu). Esta cepa, se identificó como *P. agglomerans*, y demostró una alta actividad fijadora de nitrógeno en comparación a otras bacterias endófitas aisladas de esta misma planta (VERMA *et al.*, 2001).

Asimismo, se ha demostrado que *P. agglomerans* tiene capacidad para fijar N₂ en cultivos puros y en asociación con plantas de trigo (MERBACH *et al.*, 1998).

Del mismo modo, se han aislado otras cepas de *P. agglomerans* (las cuales no han sido todavía identificadas) de la rizósfera de plantas de arvejas (ELVIRA RECUENCO y VAN VURDEE, 2000) y cítricos (DE ARAUJO *et al.*, 2001).

ASIS y ADACHI (2004) han aislado otro diazótropo facultativo: *Pantoea agglomerans* cepa MY1, proveniente de superficies de tallos esterilizados de plantas de camote.

2.5.2 PGPR. El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacterias) define a las bacterias que habitan en la rizósfera de las plantas y que pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (DILEEP y DUBET, 1992).

Según Davison, (1988) y Kloepper *et al.*, (1989), citados por DOBBELAERE *et al.*, (2003), éstas son rizobacterias beneficiosas ya que estimulan el crecimiento de la planta.

Dentro del grupo de las PGPR se incluyen varios géneros bacterianos. Se destacan entre ellos: *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* (MERBACH *et al.*, 1998), *Serratia* (PRASAD *et al.*, 2001) y *Klebsiella* (RIGGS *et al.*, 2001).

Estas fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth (1989), para describir bacterias del suelo que colonizan las raíces de las plantas, luego de haber inoculado semillas con promotores del crecimiento (NELSON, 2004).

Las PGPR promueven el crecimiento vegetal por una variedad de mecanismos. Entre estos beneficiosos procesos se encuentran, la fijación de nitrógeno atmosférico, el cual es transferido a la planta como NO_3^- , la solubilización de fósforo y la absorción de éste como H_2PO_4^- , y la absorción de K^+ y de microelementos (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

Según MARTINEZ *et al.* (1997), las bacterias rizosféricas son capaces de producir sustancias fisiológicamente activas como vitaminas, giberelinas, citoquininas y ácido-indol-acético en cantidades importantes, las cuales mediante su acción conjunta estimulan la germinación de las semillas, aceleran el desarrollo de las plantas e incrementan el rendimiento de los cultivos. Además, reducen los efectos perjudiciales de los patógenos (NELSON, 2004).

2.5.2.1 Ácido indol acético. Este compuesto (IAA), es la auxina más común y mejor caracterizada, y a la vez, fisiológicamente más activa en plantas. Es una fitohormona que estimula rápidamente el incremento de la elongación, división y diferenciación celular en plantas (CLELAND, 1990).

Según Glick *et al.* (1999), el IAA es una auxina de gran importancia ya que contribuye al “pool” endógeno de hormonas de la planta, imitando el efecto de la aplicación de AIA exógeno (SCHOEBITZ, 2005).

De esta forma, el AIA bacteriano estimula el desarrollo del sistema radical y el crecimiento de la planta hospedera. 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 producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona es fundamental en la respuesta a la inoculación. Bacterias que secretan bajos niveles de AIA (10^{-9} a 10^{-12} M) estimulan la elongación de raíces, mientras que bacterias súper productoras de auxinas promueven la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (GLICK *et al.*, 1999).

Patten y Glick (1996), señalan que la capacidad de sintetizar AIA está ampliamente distribuída entre las bacterias del suelo asociadas a plantas. Se ha estimado que el 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera pueden producir AIA (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

2.5.3 Colonización. Un aspecto importante de la colonización, es la habilidad de competir con microorganismos nativos presentes en el suelo y en la rizósfera de la planta en desarrollo. Estos también están buscando nutrientes y colonizando raíces de plantas en crecimiento (NELSON, 2004).

Según BASHAN (1994), el movimiento de las bacterias hacia las raíces es esencial para que ocurra colonización. Existen desplazamientos bacterianos desde raíces inoculadas (las cuales aún están exudando nutrientes) a raíces no

inoculadas. Esto se debe a distintos fenómenos. Uno de ellos es que la población de bacterias en las raíces, consume más nutrientes que los que éstas pueden entregar en un momento dado. Esto crea un gradiente microambiental de deficiencia de nutrientes, el cual estimula la migración hacia fuentes alternativas de nutrientes (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

La zona de elongación de la raíz y la zona de pelos radicales son los sitios principales para la actividad bacteriana en general. Por lo tanto, la automotilidad de las PGPR también puede ser considerada como un rasgo importante para colonizar la rizósfera (BASHAN, 1986).

Los eventos de colonización han sido estudiados en varias especies de gramíneas forrajeras. Cepas de *P. agglomerans* han sido aisladas de espacios intercelulares de raíces de trigo (RUPPEL *et al.*, 1992).

La habilidad de *Pantoea* spp. para colonizar vigorosamente raíces de arroz y para exhibir una promoción del crecimiento vegetal a través de la fijación de N₂, producción de fitohormonas y solubilización de fosfatos, etc. (VERMA *et al.* 2001) puede ser potencialmente útil para plantas de esta especie.

La colonización de la superficie de las raíces por las PGPR no es uniforme. En relaciones endofíticas, las PGPR residen en los espacios apoplásticos -dentro de la planta hospedera- (ANDREWS y HARRIS, 2000), aunque existe evidencia de endófitos que ocupan espacios intracelulares (McCULLY, 2001).

2.5.3.1 Quimiotaxis. Las bacterias tienen una atracción general hacia atrayentes químicos no específicos encontrados en exudados de raíces por los cuales muchas rizobacterias migran (BASHAN, 1994).

La quimiotaxis, se define como una fuerte atracción entre ciertas bacterias y 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).

El desplazamiento de las bacterias es un proceso activo y una consecuencia es que la quimiotaxis bacteriana está influenciada por el balance entre los exudados atrayentes y repelentes de las raíces (BASHAN, 1994).

A medida que el microorganismo capta concentraciones elevadas de la sustancia quimiotáctica, éste se desplaza hacia el gradiente de concentración de dicha sustancia (MADIGAN *et al.*, 1997).

2.6 Biofertilizantes.

Los biofertilizantes son sustancias que contienen microorganismos vivos, los cuales al ser aplicados a semillas, superficies de plantas, o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento mediante el incremento del suministro o la disponibilidad de los nutrientes primarios para la planta huésped (VESSEY, 2003).

El hombre con el desarrollo tecnológico aplicó métodos microbiológicos para estudiar estos microorganismos y utilizarlos posteriormente bajo el nombre genérico de biofertilizantes en las prácticas agrícolas contemporáneas (COMPAGNONI, 1997).

No todas las PGPR son constituyentes de biofertilizantes. Muchas PGPR estimulan el crecimiento de las plantas mediante el control de los organismos patógenos (WHIPPS, 2001; ZEHNDER *et al.*, 2001).

2.6.1 Encapsulación. La encapsulación es un procedimiento que limita células dentro de un espacio dado. Además, controla la migración o difusión de sustancias (HUEBNER y BUCCHOLZ, 1999). Este procedimiento permite trabajar con una alta concentración de células y dar a dichas células condiciones microambientales favorables (SHULER y KARGI, 2002).

Según CIAMPI *et al.* (1997), la encapsulación es una forma de inmovilización celular. En la agricultura se han empleado biocápsulas de alginato para el atrapamiento de células bacterianas en el control biológico de agentes fitopatógenos.

HUEBNER *et al.* (1999), en estudios realizados sobre la eficiencia de la fijación de N₂ y la susceptibilidad a bacteriófagos de *Azotobacter chroococcum* libre y encapsulado con alginato, en condiciones controladas (*in vitro*) y bajo condiciones de campo (*in vivo*), demostró que en condiciones *in vitro*, las células encapsuladas exhibieron mayor actividad del sistema nitrogenasa que en la forma libre. El sistema de encapsulación ofreció una mayor protección a las bacterias contra sus fagos. Bajo condiciones de campo, la inoculación de plantas de maíz (*Zea mays*, cv Giza-2) con células encapsuladas, incrementó marcadamente la población de *Azotobacter chroococcum* en la rizósfera, así como incrementó significativamente el porcentaje de nitrógeno y el peso seco de las plantas en comparación con los tratamientos inoculados con células libres. En estos últimos, los bacteriófagos tuvieron un marcado efecto depresivo sobre la población de *Azotobacter* en la rizósfera, reduciendo significativamente el porcentaje de nitrógeno y el peso seco de las plantas, en comparación con plantas inoculadas con células libres en ausencia de fagos.

3. MATERIALES Y METODO

3.1 Realización y ubicación del ensayo.

El ensayo se realizó en un invernadero perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja. Todos los laboratorios mencionados en este trabajo, forman parte de la Facultad e Instituto de la U.A.Ch nombrados anteriormente.

El espacio de trabajo en el invernadero fue aproximadamente de 25 m², y se utilizó desde el 10 de Agosto de 2005, día en que se realizó la fertilización de las macetas, hasta el 11 de Enero del 2006, en que se realizó el segundo corte y final para la evaluación de las plantas de ballica.

Varios tipos de materiales y elementos fueron utilizados, tales como semillas de *L. perenne*, cultivar Nui, obtenidas en COOPRINSEM; y microorganismos fijadores de nitrógeno, previamente identificados como *P. agglomerans*. El sustrato para las macetas correspondió a un suelo trumao esterilizado, el cual fue obtenido desde el predio Vista Alegre, ubicado en la salida norte de Valdivia, propiedad de la Universidad Austral de Chile. El material biológico y de laboratorio usado fue: placas de Petri, asas de siembra, matraces Erlenmeyer, balanza electrónica, agar papa dextrosa (APD), microorganismos liofilizados (*P. agglomerans*), mecheros, cámaras de cultivo, autoclaves, agitador orbital, centrífuga, espectrofotómetro, entre otros.

Otros materiales fueron necesarios para llevar a acabo la segunda etapa, al evaluar el efecto de las cepas C1 y C2 de *P. agglomerans*, inoculadas en macetas sembradas con *L. perenne*, la cual fue realizada en el invernadero.

Para esto se utilizaron como maceteros, bolsas de plástico negro con capacidad de 6 Kg de suelo húmedo, balanza y palas para llenado de las bolsas, sacos harineros, bomba de espalda para el riego y hornos para el secado de muestras.

El ensayo se realizó en 2 etapas: La primera, que implicó bioencapsular las 2 cepas de *P. agglomerans* a evaluar en este trabajo. La segunda se relacionó con la evaluación del efecto de estas cepas bajo condiciones de invernadero sobre plantas de ballica inglesa.

3.2 Bioencapsulación de las cepas.

Esta metodología se aplicó a cepas que pertenecen al género *Pantoea* spp. Consta de varias etapas: obtención de muestras, aislamiento de bacterias, identificación de cepas ideales, coagulación y formación de cápsulas, constitución del homogeneizado, resuspensión en medio fresco y concentración celular. Algunos de estos experimentos se describen a continuación, puesto que en esta tesis se partió de cepas ya identificadas.

3.2.1 Fuente de las cepas. Ambas cepas se obtuvieron a partir de cepario liofilizado del laboratorio de Fitopatología del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal (IPSV).

Dichas cepas (C1 y C2), fueron reconstituidas (Anexo 1) y posteriormente se observaron en ellas colonias aisladas y pureza. Estas constituyeron la base de los cultivos encapsulados (Figura 1).



FIGURA 1. Cepas liofilizadas reconstituidas agregando a cada frasco 1m de caldo peptona (Anexo 1).

Una vez reconstituidas se realizaron diversas pruebas, tales como tinciones Gram (Figura 2) y pruebas de la oxidasa (Anexo 3). Mediante éstas fue posible identificar y comprobar que las colonias de ambas cepas correspondían a cultivos puros de *P. agglomerans*. Luego fueron aisladas y sembradas en placas de Petri con medios de cultivo en base a APD (Anexo 2).

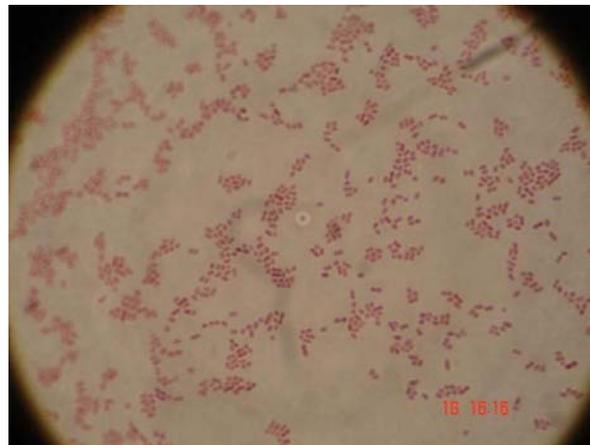


FIGURA 2. Cepa 1 comprobada de *Pantoea agglomerans*, luego de realizar tinción Gram. Se aprecian bacterias Gram (-)

3.2.2 Bioatrapamiento de las cepas. En el presente trabajo de investigación se utilizó como sistema de bioatrapamiento de las cepas C1 y C2 de *P. agglomerans* la metodología descrita por SCHOEBITZ (2005).

Este proceso también es conocido como encapsulación de las cepas. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioinsumos del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, comprendiendo diversos pasos, los cuales serán detallados a continuación.

3.2.2.1 Encapsulación de las cepas. Se preparó un medio adecuado para *P. agglomerans* en base a caldo papa dextrosa (CPD, Anexo 4). Este caldo fue la base para encapsular y se ha denominado como “homogeneizado”, el cual se detalla en el Anexo 5.

3.2.2.2 Método para inocular bacterias en caldo. A partir de la placa con las bacterias puras, se extrajo con el asa de siembra cierta cantidad de células, las cuales fueron diluídas en 10 ml de agua estéril (en un tubo de ensayo pequeño), hasta lograr una densidad óptica de 1.0, a 600 nm (1×10^8 UFC/ml). Esto se midió en un espectrofotómetro Sequoia Turner. Al obtener dicha densidad, se inoculó 1 ml de esta suspensión, en un matraz con 500 ml de CPD. Éste se dejó en un agitador Orbital Lab Line a 100 rpm a 25° C durante 48 horas, con el objetivo de multiplicar las colonias bacterianas.

3.2.2.3 Concentración celular. Se realizó mediante centrifugación en el laboratorio del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Austral de Chile (centrífuga Beckman J2-HS, Germany) durante 10 minutos a 6000 rpm y a 4°C. Los pasos a seguir para la centrifugación se detallan en el Anexo 6. En la Figura 3 se observan los tubos Falcon conteniendo la suspensión de bacterias antes de ser llevadas a la centrífuga. Luego, en el Laboratorio de Fitopatología, se eliminó el sobrenadante y se

reunieron todas las bacterias (los pellets) en un solo tubo tipo Falcon (Figura 4). Posteriormente, con la pipeta automática, se pipeteó cierta cantidad de bacterias, se depositaron en un tubo Falcon y se aforó con agua estéril. Se realizó la mezcla y se aplicaron 2 ml en un tubo de ensayo chico, el cual se observó en el espectrofotómetro, midiéndose hasta dar como resultado 1 nm. Una vez logrado esto, se aplicaron 10 ml de esta suspensión de bacterias en los 500 ml de homogeneizado. Se agitó en el agitador por unos minutos.



FIGURA 3. Suspensión de bacterias antes de centrifugar.



FIGURA 4. Pellet de bacterias obtenido luego de centrifugar.

Se preparó gluconato de Ca 0.1M para polimerizar las cápsulas, de acuerdo al Anexo 7. El ácido glucónico permite que se forme la cápsula, ya que actúa como factor coagulante.

Con una jeringa se extrajeron bacterias del medio homogeneizado y se depositaron gota por gota en un vaso de precipitado con gluconato de Ca 0.1M en el agitador (Figura 5). Cada gota es una cápsula. De esta forma se finalizó con la encapsulación, la cual es demostrada posteriormente en la Figura 8.



FIGURA 5. Encapsulación de bacterias con jeringa.

3.2.2.4 Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC). Una vez obtenidas las cápsulas, se procedió a realizar el recuento, para lo cual fue necesario utilizar un Stomacher (Stomacher® 80 Laboratory Systems) que se encuentra disponible en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL).

Posteriormente, se sembró en placas de Petri y luego de permanecer en la cámara de cultivo a 28°C durante 24 horas, se contaron las colonias presentes.

Este recuento se realizó para conocer el número de UFC por cápsula, de acuerdo al Anexo 8.

3.3 Variables en *L. perenne*.

Para realizar la evaluación de las cepas C1 y C2, se combinaron cápsulas de *P. agglomerans* y semillas de ballica inglesa especialmente distribuidas en macetas. Se obtuvo el suelo, el cual fue esterilizado previamente y distribuido en las macetas con el fin de tener un volumen limitado de sustrato que mantenga aislada a la rizósfera y que actúe como soporte para el crecimiento de las plantas de ballica. Se utilizaron 80 macetas de plástico negro. Se realizó la enmienda junto con la fertilización según los tratamientos correspondientes, los cuales serán mencionados posteriormente. Se retiró una capa de 2 cm de suelo y se agregaron 15 cápsulas por maceta, luego se cubrió con los 2 cm de suelo retirado y se aplicó riego con agua destilada estéril.

Una vez emergidas las plántulas, se realizaron dos cortes al estado de tercera hoja totalmente expandida, y cuarta hoja emergida. Para evaluar el efecto de las cepas, se tomaron en cuenta las variables detalladas en el capítulo 3.3.7.

3.3.1 Constitución del ensayo en macetas. Para comenzar con el ensayo en el invernadero y llevarlo a cabo, fue necesario recolectar suelo. El sustrato utilizado correspondió a un suelo trumao del predio Vista Alegre, perteneciente a la Universidad Austral de Chile. Se recolectó en sacos harineros para luego esterilizar en autoclave (Deutsch y Neumann, Berlin 10) del Laboratorio de Fitopatología por 3 horas, a 121° C, 1 atm.

Se realizó un análisis de fertilidad de suelo previo a hacer la esterilización en el autoclave y otro al suelo esterilizado.

Dichos resultados se observan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Análisis químico del suelo usado como sustrato antes y después del proceso de esterilización (1atm/30 min).

	Antes	Después
pH en agua (1:2,5)	5,4	5,4
pH CaCl ₂ 0,01 M	4,9	4,9
Materia Orgánica (%)	12,3	12,7
N-Mineral (mg/kg)	193,2	141,4
P Olsen (mg/kg)	10,6	18,4
K intercambiable (mg/kg)	117	106
Sodio Intercambiable (mg/kg)	0,12	0,05
Calcio intercambiable (mg/kg)	3,91	3,5
Magnesio Inter. (cmol/kg)	0, 81	0.71
Suma de bases	5,14	4,53
Aluminio Inter.(cmol+/kg)	0,23	0,23
CICE (cmol+/kg)	5,37	4,76
Saturación de Al (%)	4,3	4,8

FUENTE: LABORATORIO DE NUTRICIÓN Y SUELOS FORESTALES. FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES (2005).

El suelo se esterilizó con el objetivo de eliminar todo microorganismo viviente, para lograr determinar de forma aislada los efectos producidos por las cepas C1 y C2 de *P. agglomerans*.

El suelo, una vez esterilizado, se distribuyó en las 80 macetas correspondientes al ensayo, las cuales se llenaron con 6 kg de suelo húmedo. Esto se realizó en el invernadero.

3.3.2 Pruebas de germinación. Las semillas de *L. perenne* L. Cultivar NUI fueron sometidas a pruebas de germinación, el día 12 de Agosto de 2005. Éstas fueron adquiridas en COOPRINSEM, importadas de NZ, sin hongo

endófito. Se revisó el porcentaje de germinación 14 días después y dieron como resultado un 25% de germinación, lo cual difícilmente se puede explicar cual es la razón de este inesperado y bajo resultado, por lo tanto, se realizó un cálculo de corrección para determinar la dosis de siembra (Anexo 9), lo que finalmente dió como resultado una dosis de 0,4 g por maceta que corresponden a 190 semillas aproximadamente.

3.3.3 Enmienda y fertilización del sustrato. Junto con realizar la fertilización mineral, se efectuó una enmienda calcárea con una dosis equivalente a 2 t/ ha de CaCO_3 , con el propósito de incrementar el pH del suelo usado en el ensayo.

La aplicación de la primera dosis de fertilización se realizó el día 10 de Agosto de 2005 (16 días antes de la siembra). Para determinar la dosis de fertilización (Anexo 10), además del análisis de suelo, fue necesario determinar el peso seco del suelo contenido en las macetas, lo cual correspondió a 4 kg. La obtención de cálculo de peso seco, se detalla en el Anexo 11.

Peso suelo seco /ha:

$$10000\text{m}^2 \times 0.2\text{m} \times 700 \text{ kg/m}^3 (\text{Dap}) = 1400000 \text{ kg/ha}$$

La fertilización recomendada, se detalla en el Anexo 10, con sus respectivos cálculos para cada fertilizante.

Las dosis equivalentes utilizadas para ser aplicadas al suelo a usar en las macetas fueron las siguientes:

- 150 kg N/ha (1/2 siembra; 1/2 inicio macolla) (Salitre sódico)
- 300 kg P_2O_5 /ha (Superfosfato triple)
- 200 kg K_2O /ha (Muriato de potasio)
- 2000 kg Cal/ha (Magnecal)
- 200 kg Azufre/ha (Fertiyeso)

De acuerdo a la dosis calculada por macetero para cada fertilizante, y con respecto al peso seco de suelo, se obtuvo que para el elemento nitrógeno, se deben utilizar 2,68 g de salitre sódico por macetero. Este elemento se parcializó, aplicando la mitad de la dosis a la siembra y la otra mitad luego del primer corte.

Como fuente fosforada se utilizó superfosfato triple en una dosis de 1,86 g por macetero. El elemento K, se proporcionó a la planta como muriato de potasio en una dosis de 0,95 g por macetero y el azufre se aplicó como yeso agrícola 0,857 g por macetero. Además, al realizar la enmienda con cal y magnesio, fueron incorporados 5,71 g por macetero de CaCO_3 , aproximadamente 4 % de Mg y 2,5 % de S.

Para el tratamiento correspondiente a una fertilización de 50%, se utilizó la mitad de las dosis calculadas. La segunda dosis de fertilización nitrogenada se aplicó el día 11 de Noviembre de 2005.

3.3.4 Siembra en invernadero. Una vez llenas las macetas con el suelo esterilizado, se sembraron 15 cápsulas de *P. agglomerans* por maceta el día 11 de Agosto de 2005. Esta dosis se determinó de acuerdo al recuento de UFC por cápsula.

Posteriormente (2 semanas después, 26-08-2005), fueron sembradas las semillas de *L. perenne* en una dosis de 25 kg/ha, siendo regadas cada una de las macetas con 100 ml de agua destilada. La dosis de siembra por maceta se determinó, como ya se indicó, luego de realizar un análisis de germinación de semillas.

Una vez emergidas las plántulas, se realizó un raleo dejando 38 de éstas por maceta (Anexo 9).



FIGURA 6. Plantas de ballica antes del primer corte.

3.3.5 Riego de las plantas de *L. perenne*. El riego se realizó día por medio, aplicando agua destilada estéril en un volumen total cercano a los 7L con bomba de espalda a la totalidad de las macetas. Esta cantidad se aumentó a partir del mes de octubre a 15L y a partir de noviembre a 30L, debido a un aumento en las temperaturas.

3.3.6 Cortes. Se realizaron dos cortes durante el ensayo, los cuales fueron, al estado de tercera hoja totalmente expandida y cuarta hoja emergida. En el primero (7-8 de Noviembre, 2005), se midió área foliar y materia seca de la parte aérea. En el segundo corte y final (29-12-2005 al 11-01-2006), se lavaron las raíces de cada una de las plantas de cada maceta, para luego determinar su

peso fresco y seco (después de haber permanecido en el horno Memmert por 48 horas, a 60⁰C). Se contaron y pesaron los macollos, se midió nuevamente área foliar y se pesó materia verde y seca de la parte aérea.



FIGURA 7. 1er corte de plantas de ballica (7-8 Noviembre 2005).

3.3.7 Evaluación del estudio. Esta etapa del ensayo se llevó a cabo en el invernadero. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, medición de área foliar, peso fresco y seco de parte aérea y radicular, número y peso de macollos, evaluación del contenido de nitrógeno en hojas y raíces, mediante el método Kjeldhal.

Cada maceta se rotó 3 veces a la semana dentro del mismo bloque. De ésta forma todas ellas recibieron la misma cantidad de luz y sombra, para que exista un mínimo de variaciones debido a ambos factores, y la diferencia medida entre las macetas se deba principalmente a los tratamientos.

3.3.7.1 Altura de planta. Antes del primer corte, se midió la altura de planta de cada una de las macetas con un pie de metro digital (Mitutoyo), en milímetros. Ésta medición se realizó 2 semanas después de la siembra, el día 9 de Septiembre de 2005.

3.3.7.2 Área foliar. Se midió con un “medidor de área foliar”, o “areafoliarímetro” (LI-COR (LI 3100); LI-COR, Lincoln, Nebraska), correspondiente al Laboratorio de Semillas del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Esto consiste en poner cada lámina en forma independiente de tal manera que no se sobreponga con las otras láminas y no existan interferencias en el resultado. Se realizó inmediatamente después del corte para evitar alterar los resultados debido a la deshidratación de la lámina.

3.3.7.3 Peso fresco y peso seco. Se realizaron 2 cortes a cada una de las macetas. El corte de la parte foliar se realizó a una altura de 4 cm desde el suelo de la maceta, para luego pesar materia verde en una balanza digital de precisión, y posteriormente se llevaron al horno de secado (Memmert) correspondiente al laboratorio de forrajeras del Instituto de Producción Animal, de la U.A.Ch. Permanecieron por 48 horas a una temperatura de 60⁰C. Luego se pesó materia seca en la misma balanza mencionada anteriormente.

En el caso de las raíces, al segundo corte, se realizó el mismo procedimiento en cuanto a la determinación del peso. Para esto, se extrajeron todas las plantas de la maceta y posteriormente se lavaron las raíces, para lo cual fue necesario hacerlo con cuidado para evitar la pérdida de raicillas.

3.3.7.4 Peso y número de macollos. Al segundo corte y final, se contaron y pesaron los macollos una vez extraída la planta entera de la maceta.

3.3.7.5 Evaluación de contenido de nitrógeno. Se midió también el contenido de nitrógeno de hojas y raíces. En el caso de las hojas, fue medido para el 1er y 2do corte. Para las raíces, al 2do corte. Esto se realizó mediante el método Kjeldhal, en el Laboratorio de Nutrición y Suelos Forestales, Facultad de Ciencias Forestales, U.A.Ch.

El método Kjeldhal consiste en hacer una calcinación de las muestras a 500°C durante 7 horas, y posteriormente extracción con HCl 10% para macro y microelementos. Finalmente, se realizó la extracción Kjeldahl para determinar contenido de nitrógeno total.

3.3.8 Diseño experimental. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial de los tratamientos. Constó de 16 tratamientos y 5 bloques cada uno, con un total de 80 macetas.

CUADRO 2. Diseño experimental utilizado en el ensayo.

	0% NPK	50% NPK	100% NPK	P+K (S/N)
C1	5	5	5	5
C2	5	5	5	5
C1 + C2	5	5	5	5
Testigo (S/inóculo)	5	5	5	5

Tratamientos:

1. *Pantoea agglomerans* Cepa 1, sin fertilización.
2. *Pantoea agglomerans* Cepa 2, sin fertilización.
3. *Pantoea agglomerans* Cepa 1 + Cepa 2, sin fertilización.
4. Sin inóculo, sin fertilización.
5. *Pantoea agglomerans* Cepa 1, fertilización media.

6. *Pantoea agglomerans* Cepa 2, fertilización media.
7. *Pantoea agglomerans* Cepa 1 + Cepa 2, fertilización media.
8. Sin inóculo, fertilización media.
9. *Pantoea agglomerans* Cepa 1, fertilización completa.
10. *Pantoea agglomerans* Cepa 2, fertilización completa.
11. *Pantoea agglomerans* Cepa 1 + Cepa 2, fertilización completa.
12. Sin inóculo, fertilización completa.
13. *Pantoea agglomerans* Cepa 1, P+K (sin/N)
14. *Pantoea agglomerans* Cepa 2, P+K (sin/N)
15. *Pantoea agglomerans* Cepa 1 + Cepa 2, P+K (sin/N)
16. Sin inóculo*, P+K (sin/N)

*Sin inóculo se designará como tratamiento “Sin Bact.” (sin bacteria).

Las dosis de fertilización correspondientes a los tratamientos fueron las siguientes: 100% P+K (sin/N), esto es, la totalidad de fósforo y potasio, excluyendo el nitrógeno; 50% NPK (la mitad de la fertilización); 100% NPK (dosis completa) y 0% NPK. Éste cálculo está basado de acuerdo a las dosis mencionadas en el capítulo **3.3.3**.

Cada una de estas dosis de fertilización fue combinada con las cepas, ya sea con: cepa 1, cepa 2, cepa 1 + cepa 2, y sin cepa.

Los tratamientos testigos correspondieron a aquellos que no tuvieron inóculo ni fertilización.

El análisis estadístico se realizó mediante la utilización del programa SAS. Se probó la normalidad de los datos aplicando la prueba de “Kolmogorov-Smirnov”. Para probar la normalidad se utilizó el paquete estadístico “Resultados STATISTICA 6.0 (2001)”.

Se comprobó la homogeneidad de varianzas, y se realizó ANDEVA. Cuando hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos se aplicó el test de Tukey.

Las variables independientes corresponden a la fertilidad, cepas y bloques.

Las variables dependientes corresponden a todos los parámetros medidos, ya que dependen de la interacción fertilización x cepa; bloque x fertilización; cepa x bloque.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

En este ensayo, se probó la capacidad de *P. agglomerans* (Cepa 1 y Cepa 2) para promover el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno atmosférico y la biosíntesis de indoles.

A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos en este trabajo, los cuales se relacionan con la evaluación realizada con las plantas de ballica en dos oportunidades (1er y 2do corte), con el objetivo de establecer la eficiencia de las cepas C1 y C2 (*P. agglomerans*), sobre variables medidas en plantas de *L. perenne*.

Asimismo, en esta sección, se informa y discute sobre la fabricación y obtención de biocápsulas, como también los resultados de sus aplicaciones.

4.1 Biocápsulas.

Utilizando la metodología descrita fue posible constituir un producto bioencapsulado para ser aplicado a esta investigación. Este producto constituye un medio de transporte de microorganismos desde el laboratorio a situaciones productivas. En la Figura 8 se ilustran los resultados obtenidos en el proceso de bioencapsulación.



FIGURA 8. Biocápsulas conteniendo a las cepas C1 y C2.

Tal como lo demuestra la Figura 8, en función de los materiales y metodología aplicados, fue posible elaborar biocápsulas. Estas microesferas de alginato sirvieron para alcanzar los objetivos, los cuales, estaban orientados a incluir las cepas C1 y C2 de *P. agglomerans* en matrices gelificadas. El proceso aplicado demostró ser eficiente para establecer los ensayos en macetas (Figura 9).



FIGURA 9. Cápsulas sembradas en las macetas.

Para las siguientes variables, los resultados se presentan mediante cuadros. En el Anexo 13 se muestran gráficos de barras para cada una de éstas.

4.2 Primera evaluación.

Correspondió al primer corte, y se realizó entre el 7 y 8/11/05. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada variable medida.

4.2.1 Peso seco aéreo. El Cuadro 3 presenta los resultados obtenidos a partir del peso seco aéreo de las muestras, medido en gramos. Para ésta variable, no existió interacción entre las cepas y el tipo de fertilización.

CUADRO 3. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Peso seco aéreo al 1er corte (g) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	MS 1 (g)
Sin Bact.	4,997 a
C1	4,699 a
C2	5,320 a
C1+C2	5,065 a

ns $P > 0.05$

En el Cuadro 3 se demuestra que en esta etapa del ensayo no existió interacción entre la inoculación de cepas y el nivel de fertilización, por lo cual actúan en forma independiente con respecto al desarrollo de las plantas.

Con un nivel de confianza del 5%, no se encontraron diferencias significativas en el peso seco aéreo al 1er corte, con respecto a la actividad promotora del crecimiento vegetal de cada una de las cepas evaluadas.

Según CIAMPI (2005), resultados preliminares de un ensayo de campo llevado a cabo en la Estación Experimental Santa Rosa de la U.A.Ch, realizado con PGPR, indican que una determinada cepa puede tener un efecto negativo sobre un cultivar mientras que puede ser positivo sobre otro.

A la vez, esto concuerda con lo señalado por POSTGATE (1982), el cual afirmó que dentro de una misma especie de diazótrofos, existen cepas que fijan N_2 y otras que no lo hacen, independientemente del origen que éstas tengan.

Según el análisis estadístico, para las variables “peso seco aéreo al 1er corte”, “área foliar al 1er corte”, “peso de macollos”, “extracción de nitrógeno al 1er corte”, “extracción de nitrógeno al 2do corte” y “extracción de nitrógeno total”, no existe interacción entre cepas y fertilización.

4.2.2 Area foliar. Para esta variable, los resultados fueron representados en cm^2 , los cuales fueron obtenidos mediante un “areafoliarímetro”. No existió interacción entre las cepas y el tipo de fertilización.

No se presentan diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento Sin Bact. tiene mayor área foliar que aquel tratamiento inoculado con C1. Es posible respaldar estos resultados de acuerdo a los ensayos realizados por SCHOEBITZ (2005), el cual señala que para ciertas cepas de *Pantoea agglomerans*, los efectos sobre aumentos en el peso fresco de raíces y vástagos de *L. perenne* son iguales o incluso menores con respecto al tratamiento control.

De igual manera ocurre en éste caso, con la única diferencia de referirse a la variable área foliar, pero de acuerdo a lo expuesto anteriormente, es posible que éste tipo de eventos se dé al someter bacterias promotoras del crecimiento vegetal a distintos ensayos.

CUADRO 4. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Área foliar al 1er corte (cm²) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	AF 1 (cm²)
Sin Bact.	298,29 a
C1	242,63 a
C2	310,69 a
C1+C2	297,53 a

ns $P > 0.05$

4.2.3 Altura de planta. Esta variable fue medida a los 45 días después de la siembra. A continuación, se presentan los resultados en el Cuadro 5.

CUADRO 5. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre Altura de plantas (mm) de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Altura (mm)	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Cepas				
Sin Bact.	113,39 f	140,90 abcde	139,35 bcde	155,7 abcd
C1	154,27 abcd	152,28 abcd	149,02 abcde	157,73 a
C2	150,46 abcde	156,43 ab	138,64 bcde	138,53 cde
C1+C2	155,76 abc	153,88 abcd	137,89 de	132,97 e

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

En este caso, hubo interacción entre ambos factores (fertilización y cepas).

En el tratamiento sin fertilización, existen diferencias significativas entre Sin Bact. y los tres tratamientos inoculados. Para éstos últimos, se observa

claramente un aporte de nitrógeno por parte de las cepas, contribuyendo al crecimiento de las plantas.

La altura alcanzada por la totalidad de los tratamientos fue siempre superior a los 11 cm.

Según lo mostrado en el Cuadro 5, en aquellos tratamientos con la totalidad de la dosis de fertilización (100% NPK) y con la mitad de ésta (50% NPK), no existieron diferencias significativas entre los distintos inóculos y los distintos niveles de fertilización. En el único caso en que existió diferencia significativa fue entre C2 50% NPK (156, 43 mm) y C1+C2 100% NPK (137, 89 mm).

Con la mitad de la dosis de fertilización (50% NPK) existe una diferencia significativa con respecto a P+K (sin/N) en aquellas plantas inoculadas con C2, y con C1+C2. En ambos casos está a favor de aquel tratamiento con la mitad de la dosis, ya que las plantas presentan mayor altura.

Para aquel tratamiento sin fertilización, inoculado con C1+C2, se observa que éste obtuvo valores mayores en comparación a C1+C2 100% NPK y a C1+C2 P+K (S/N) diferenciándose significativamente.

No existió diferencia significativa entre C1 0% NPK y aquellos tratamientos con distintos niveles de fertilización. Lo mismo ocurre con C2 0% NPK.

En el tratamiento P+K (S/N), C1 tiene diferencia significativa con C2 y con C1+C2. No así con "Sin Bact. P+K (sin/N)", el cual presenta valores estadísticamente iguales. En este mismo nivel de fertilización, no se encontraron diferencias significativas entre Sin Bact., C1, y C2.

Ensayos realizados previamente, revelan que distintas cepas de una misma especie producen efectos diferentes. PATRIQUIN *et al.* (1987), reportaron una elevada asimilación de P y K por parte de plantas inoculadas con la cepa Sp245 de *A. brasilense*, mientras que la cepa Sp7 redujo la incorporación de P y K. Lo mismo puede estar ocurriendo en este caso con las cepas de *Pantoea agglomerans*, para las cuales no existe suficiente información. Es por esto que es posible homologar esta situación con la de *Azospirillum brasilense*, ya que ambas son diazótrofes de vida libre.

La disponibilidad de nitrógeno fijado para la planta es variable y depende del desempeño de las diferentes especies de diazótrofes y cepas en asociación con diferentes especies de plantas y, por lo tanto, no pueden ser generalizadas (DÖBEREINER y PEDROSA, 1987).

Los resultados obtenidos en esta medición, revelan que la altura de planta no obtuvo diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos, ya que en aquellos inoculados, sin fertilización, no se presentaron diferencias significativas en comparación a todos los otros niveles de fertilización e inoculaciones.

4.3 Segunda evaluación.

Ésta correspondió al segundo corte, el cual fue realizado entre los días 29-12-05 al 11-01-06. A continuación se presentan los resultados obtenidos de acuerdo a las siguientes variables medidas.

4.3.1 Peso seco aéreo. Los resultados expuestos en el Cuadro 6, corresponden a la materia seca foliar obtenida en el segundo corte.

Para ésta variable, en comparación al primer corte, se presentó interacción entre cepas y nivel de fertilización.

CUADRO 6. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre Peso seco aéreo al 2do corte (g) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

MS2 (g) Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	5,99 g	8,06 cdefg	10,23 abc	9,926 abcd
C1	7,87 defg	7,54 efg	9,58 abcde	11,628 a
C2	6,24 fg	9,32 bcde	9,060 bcdef	9,570 abcde
C1+C2	6,91 fg	10,63 ab	10,236 abc	8,244 cdef

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

En el tratamiento sin fertilización, no hubo diferencias significativas entre las macetas Sin Bact. y los distintos niveles de inóculo. Tampoco existió diferencia significativa entre estos últimos.

Existió un aporte de nitrógeno por parte de C1 P+K (11,628 g) en comparación a C1 50% NPK (7,54 g), obteniendo diferencias significativas con éste. Asimismo, C1 P+K obtuvo diferencias significativas con C1+C2 P+K (8,244), con una producción de un 30% más aprox. a favor de C1 P+K.

Para un nivel de fertilización media (50% NPK), C1+C2 obtuvo mayor peso seco aéreo presentando diferencias significativas con C1 y Sin Bact.

C1+C2 50% NPK, con un peso seco aéreo de 10,63 g, presentó diferencias significativas con aquel tratamiento con la misma inoculación, pero sin nitrógeno, vale decir, C1+C2 P+K (8,244 g).

Con un nivel completo de fertilización (100% NPK), no existió diferencia significativa entre aquellos tratamientos con inóculo y sin éste.

Según estudios realizados por DÖBEREINER y PEDROSA (1987), interacciones con nitratos pueden afectar en forma selectiva la asociación entre

las raíces de determinadas especies de plantas y ciertas cepas de poblaciones de variados microorganismos de la rizósfera. De acuerdo a esta afirmación, es posible que en el tratamiento con 100% fertilización las cepas inhiban su capacidad fijadora de N, debido a la presencia de éste elemento en forma mineral, ya que el tratamiento Sin Bact. 100% NPK presenta el mismo valor en comparación a aquellos tratamientos inoculados (Cuadro 6).

Según SCHOEBITZ (2005), investigaciones han demostrado que las cepas C1 y C2 de *P. agglomerans* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico hasta formas asimilables por las plantas, y de sintetizar AIA.

Esto lo afirman ELVIRA RECUENCO y VAN VURDEE (2000), los cuales tras realizar un estudio llevado a cabo en Egipto, con plantas de arroz, señalan que *P. agglomerans* es capaz de fijar N₂ y hacerlo disponible para la planta hospedera y es capaz de colonizar las raíces de éstas inoculadas.

De acuerdo a lo descrito por VERMA *et al.* (2001), la habilidad de *Pantoea* spp. para colonizar vigorosamente la rizósfera de plantas de arroz, y por exhibir un efecto promotor de crecimiento vegetal gracias a su facultad para fijar nitrógeno, producir fitohormonas y solubilizar fosfatos, etc, pueden ser potencialmente útiles para plantas de esta especie.

P. agglomerans ha demostrado ser capaz de fijar N₂ tanto viviendo en asociación con plantas de trigo y arroz como en cultivos puros de esta bacteria realizados en laboratorio (MERBACH *et al.*, 1998).

De acuerdo a estos autores, se comprueba que efectivamente ésta enterobacteria es capaz de fijar N y entregárselo a plantas de trigo y arroz, sin embargo, de acuerdo a los escasos estudios e investigaciones relacionados a *P. agglomerans* en cultivos de *L. perenne*, no es posible afirmar lo mismo ya que

los resultados indican lo contrario al no existir diferencias con los tratamientos control.

Para ésta variable no existen diferencias significativas entre los distintos niveles de fertilización e inóculos. Esto indica que aquellos tratamientos con 50% NPK y P+K S/N, al ser capaces de obtener los mismos valores que el 100% de la fertilización, sería posible disminuir la fertilización nitrogenada, o incluso fertilizar sólo con fósforo y potasio. Por otra parte, los tratamientos sin bacteria, también son estadísticamente iguales que aquellos inoculados. Por lo tanto esto indica que aunque este demostrado que *P. agglomerans* es capaz de fijar N atmosférico, y de sintetizar AIA, ésta no es capaz de entregárselo a la planta.

4.3.2 Área Foliar. A diferencia de área foliar al 1er corte, en este caso, existe interacción entre el nivel de fertilización y de las cepas inoculadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Cuadro 7, se observa que en aquel tratamiento sin fertilización, existen diferencias significativas entre Sin Bact. (555, 882) y C1 (787, 914).

Con la mitad de la dosis recomendada, C2 y C1+C2 tienen valores significativamente mayores en comparación a Sin Bact. y C1.

En el tratamiento 100% fertilización, C1+C2 se diferencia significativamente de los otros tratamientos, obteniendo el mayor valor.

Para un nivel intermedio de fertilización (50% NPK), C2 presentó un valor de 1079,578 cm², en comparación a C2 100% NPK, el cual obtuvo un valor de 883,792 cm², presentando diferencias estadísticas entre estos tratamientos.

OKON y LABANDERA-GONZALEZ (1994), realizaron una acabada revisión durante 20 años (1974-1994) de las experiencias realizadas con respecto a las inoculaciones 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 son inconsistentes.

CUADRO 7. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Área foliar al 2do corte (cm²) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

AF2 (cm ²) Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	555,882 g	764,906 def	916,654 bcd	928,168 bcd
C1	787,914 def	779,934 def	922,542 bcd	944,938 abcd
C2	691,172 efg	1079,578 ab	883,792 cde	995,096 abc
C1+C2	601,3 fg	925,354 bcd	1126,892 a	767,94 def

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

El conjunto de efectos del N sobre variables morfogénicas y estructurales, determinan una fuerte incidencia sobre el desarrollo del IAF. Cultivos crecidos en condiciones naturales de este mineral, generalmente alcanzan menor expansión foliar y crecimiento aéreo, en comparación con cultivos no limitados (COLABELLI *et al.*, 1998).

Si bien hasta ahora no se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos inoculados y no inoculados, y entre los distintos niveles de fertilización, existen investigaciones que indican que para ciertas especies y cultivares, *Pantoea agglomerans* es capaz de colonizar la rizósfera y establecer

una relación benéfica con la planta, contribuyendo a su crecimiento y desarrollo (SCHOEBITZ, 2005).

De acuerdo a lo señalado anteriormente, es probable que *P. agglomerans* no sea compatible con *Lolium perenne*, o con el cultivar NUI. Es por esto que sería interesante continuar la investigación con otras especies y/o otros cultivares.

4.3.3 Peso seco radical. A continuación, en el Cuadro 8, se presentan los resultados obtenidos para la variable “peso seco radical”.

CUADRO 8. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el peso seco radical de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

MS Raíces Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	11,172 fg	13,214 def	18,61 ab	20,476 a
C1	10,542 fg	10,538 fg	12,392 ef	20,774 a
C2	10,642 fg	13,374 def	14,77 cde	16,784 bc
C1+C2	9,138 g	15,710 cd	17,402 bc	12,936 def

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

Sin fertilización, no existen diferencias significativas entre Sin Bact. y aquellos tratamientos inoculados. Todos se comportan de la misma manera.

Al aumentar los niveles de fertilización nitrogenada, C1 se mantiene en niveles estables. No así, con aportes de fósforo y potasio, sin nitrógeno, caso en el cual ésta cepa obtiene la mayor producción, con 20,774 g de MS de raíces, existiendo diferencias significativas con C1 50% y 100% NPK.

Se observa que uno de los mayores desarrollos se obtiene al no existir inoculación de PGPR, ya que Sin Bact. 100% NPK se iguala estadísticamente a

Sin Bact. P+K y C1 P+K, obteniendo estos 3 tratamientos los valores más altos de todos.

El efecto promotor de crecimiento y desarrollo tanto de C1 como de C2 se ve deprimido cuando la fertilidad del suelo es la óptima para la planta (100% NPK), sobretodo con niveles adecuados de N. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por UMALI-GARCÍA *et al.* (1980), los cuales señalan que los efectos de la inoculación en la morfología de los pelos radicales y en la morfogénesis de raíces laterales son suprimidos por los nitratos.

En el Cuadro 8, se observan importantes diferencias entre el tratamiento sin nitrógeno, y aquellos con la mitad de la dosis, y dosis completa. Claramente se observa una contribución de nitrógeno por parte de C1 y C2 en este tratamiento (P+K(sin/N)). Por lo tanto, existe influencia microbiana en la acumulación de materia seca radical en las plantas de ballica inglesa.

C1 P+K obtuvo un mayor peso seco radical presentando diferencias significativas con C1, C2 y C1+C2 100% NPK. A su vez, es mayor también que todos los tratamientos con 50% NPK, presentando diferencias significativas.

Según BENGOCHEA (2006), inoculando los cultivos de trigo con *P.agglomerans* C1 ó C2 y reduciendo al mismo tiempo los niveles de fertilización nitrogenada, se consiguen sistemas radicales más extensos y más capaces de extraer los nutrientes disponibles en el suelo.

Este mismo autor, sostiene que estas cepas también han demostrado inducir incrementos en el peso seco radical de plántulas de trigo inoculadas, los cuales son estadísticamente significativos en comparación con aquellas plántulas carentes de cualquier tipo de inóculo bacteriano.

La promoción del crecimiento vegetal por parte de microorganismos diazótrofos tiene éxito entre el 60 y el 70% de las ocasiones (OKON y LABANDERA-GONZALES, 1994).

OKON (1985), cita experimentos en que segmentos de raíces de plantas inoculadas con microorganismos de vida libre exhiben entre un 30 y un 50% más de absorción de NO_3^- , P_2O_5 , y K^+ en comparación a segmentos de raíces de plantas no inoculadas.

El crecimiento vegetal está dado en parte por el ácido indol acético, hormona vegetal capaz de inducir hiperplasia en los tejidos radicales, lo cual significa que tiene la capacidad de estimular la división celular dando como resultado un número mayor de células vegetales. Por otra parte, el AIA también provoca hipertrofia en las células (aumento de tamaño). La combinación de ambos efectos es responsable del aumento en el desarrollo radical que las rizobacterias productoras de este compuesto provocan en las plántulas inoculadas (LINDOW, 1998).

No existen diferencias estadísticas significativas para esta variable. Es importante considerar, que de acuerdo a los estudios realizados en trigo y arroz por diversos autores, se han encontrado diferencias significativas para distintas variables. Es posible que *P.agglomerans* no sea compatible *L. perenne*, ya que de acuerdo a DÖBEREINER (1970), el genotipo vegetal tiene efecto sobre el éxito de la asociación planta-bacteria, así como en el proceso de colonización radicular.

Resultados obtenidos por BASHAN (1986), mostraron que la respuesta a la inoculación varía en función de la relación cepa - cultivar.

Esto lo afirman MILLET *et al.* (1985), el cual señala que con respecto a la colonización radical por las bacterias debe tenerse en cuenta el factor “compatibilidad planta-bacteria”, pues parece existir cierta especificidad entre las plantas hospedantes y las bacterias de la especie *P. agglomerans* .

JIMÉNEZ *et al.* 2001, sostienen que entre las bacterias que tienen una relación benéfica con la planta, se pueden distinguir tres grandes grupos: a) PGPR, b) microorganismos fijadores de nitrógeno c) hongos micorrízicos. De acuerdo a lo señalado por este autor, es posible que *P. agglomerans* en conjunto con *L. perenne* solo se comporte como microorganismo fijador de nitrógeno, y no como PGPR para este cultivar.

Ensayos realizados por otros investigadores, demuestran que de acuerdo al tipo de cepa de determinadas PGPR y a las distintas variables medidas, existen resultados que nos entregan muchas interrogantes. Sin embargo, éstos son respaldados por resultados obtenidos por GAETANO (2004), el cual evaluó la materia seca en plantas de arroz en tres periodos de tiempo (10, 20 y 30 días) sin encontrar un patrón de comportamiento definido, sino resultados erráticos en los tres periodos de tiempo y además sin obtener diferencias significativas, en relación a diferencias en el aumento de la materia seca de los tratamientos control y las plantas inoculadas con *A. brasilense* FT 326. Este autor a su vez, encontró la misma situación en raíces de *L. perenne* al no haber diferencias en peso seco entre las cepas PGPR inoculadas y el tratamiento control.

4.3.4 Número y peso de macollos. Ambas variables se presentarán y discutirán en el mismo punto. En los Cuadros 9 y 10, se exponen el número y peso de macollos por maceta respectivamente, y sus diferencias de acuerdo al nivel de fertilidad del suelo, y al inóculo empleado.

En primer lugar, se presentarán los resultados correspondientes a número de macollos.

El número de macollos, aumenta al inocular el sustrato con PGPR en tratamientos con fertilización completa, o sólo P y K.

En el tratamiento sin fertilización, aquellos inoculados no tuvieron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el tratamiento Sin Bact., presenta diferencias significativas con C1, C2 y C1+C2, siendo estadísticamente inferior a éstos. Por lo tanto, existió una mayor densidad de macollos al existir inóculo de cepas. La coinoculación de cepas en este mismo tratamiento, es diferente en forma significativa a los tratamientos con fertilización. Esta coinoculación se ve favorecida al aportar nutrientes.

En aquel tratamiento con la mitad de la dosis, y a su vez, con la totalidad de ésta, en cuanto a C2, existen diferencias significativas entre estos dos niveles de nutrientes. Se obtuvo un mayor número de macollos con un 100% de la dosis.

Cuando la fertilización es completa, el mayor porcentaje de macollos se obtuvo en macetas inoculadas, existiendo diferencias significativas con aquellas sin inocular.

En el tratamiento sin nitrógeno, existen diferencias significativas entre Sin Bact. P+K, C2 P+K y C1+C2 P+K. Estos dos últimos obtuvieron valores significativamente mayores que aquel sin inóculo, siendo en este caso (P+K), donde se obtiene el mayor número de macollos con C1+C2, el cual tiene diferencias significativas con respecto a las otras inoculaciones de este mismo nivel de fertilización.

Los valores mas altos se encuentran en C1+C2 50% NPK, C1+C2 y C2 100% NPK, y C1+C2 P+K (S/N).

CUADRO 9. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Número de macollos de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

N Mac. Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	153,6 h	268,8 def	206,4 gh	227,2 fg
C1	276,8 cdef	289,6 cde	305,6 bcd	259,2 defg
C2	224,0 fg	260,8 defg	369,6 a	296,0 cd
C1+C2	230,4 efg	337,6 abc	361,6 ab	366,4 ab

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

Sin duda que la variable “número de macollos” es de gran importancia. Si bien todas las variables evaluadas están ligadas entre sí, y cada una de ellas tiene un rol en la determinación de productividad de la pradera, los macollos merecen gran cuidado al momento de pastorear.

De aquí la importancia de tener un suelo rico en nutrientes, sobre todo nitrógeno, elemento en cuestión en este ensayo y, muy importante para obtener vigorosos y numerosos macollos, los cuales permiten un rápido rebrote después del pastoreo.

Según WHIPPS (2001), la bibliografía concerniente al efecto estimulante del nitrógeno sobre la aparición de macollos de gramíneas forrajeras es concordante.

En general la nutrición nitrogenada favorece la producción de nuevos macollos, y más vigorosos. Sin embargo, la importancia de la respuesta es fuertemente controlada por los factores asociados a la cubierta vegetal

(densidad de macollos, genotipo, índice de área foliar, etc.) y al ambiente (temperatura, agua, radiación, etc.) (COLABELLI et al., 1998).

En ensayos realizados en cultivos de trigo, resultó que la interacción fitohormonal de *Pseudomonas sp* y *Rhizobium sp* incrementó el número de macollos fértiles, número de espigas, materia seca y rendimiento de grano (MERBACH et al., 1998).

Hasta el momento ha sido posible determinar el efecto promotor de crecimiento vegetal por parte de estos diazótrofos, aunque para algunas variables y tratamientos el análisis estadístico indique que las diferencias no son significativas, al llevar los valores a hectáreas, no es conveniente ignorar el porcentaje de aumento de MS en aquellos tratamientos inoculados. Como se demuestra en el Cuadro 9, y comparando con los cuadros correspondientes a las demás variables medidas, éste es el único caso en que la coinoculación (C1+C2) presenta valores por sobre las demás inoculaciones en el tratamiento sin fertilización nitrogenada (P+K).

Para esta variable, al presentarse diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos inoculados y sin inocular, es posible determinar que existió un aporte de N por parte de *P. agglomerans*, lo que se tradujo en una mayor producción de macollos.

Siguiendo con la variable “Macollos”, a continuación (Cuadro 10) se presentarán los resultados obtenidos para el peso de éstos.

No existen diferencias significativas entre éstos resultados. Incluso para el tratamiento testigo, se presentan valores estadísticamente iguales a aquellos con inóculo.

CUADRO 10. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Peso de macollos de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	P. Mac.
Sin Bact.	10.48 a
C1	9.04 a
C2	9.64 a
C1+C2	11.06 a

ns $P > 0.05$

Para esta variable, no existió interacción entre cepas y nivel de fertilización.

P. agglomerans, microorganismo de vida libre, ha demostrado contribuir de cierta forma al pool de nitrógeno del suelo. Si bien la simbiosis es el mecanismo principal de entrada de nitrógeno a las plantas, la fijación libre o asociativa, puede llegar a ser importante en los suelos con niveles de materia orgánica que no supongan un factor limitante para el proceso reductor de nitrógeno.

Esto lo afirma PEREZ *et al.* (1989), señalando que aunque los fijadores libres, excepto las cianobacterias (Paul, 1978), apenas se consideran en los estudios sobre fijación de nitrógeno (McGill *et al.*, 1981), es indudable que contribuyen a las entradas de nitrógeno en el sistema y por ello no conviene ignorar este tipo de fijación.

Esto es de gran importancia al momento de establecer qué tipo de fertilización e inoculación se recomienda emplear, de acuerdo a los resultados de este ensayo.

4.4 Resultados totales.

A continuación se presentan los resultados del 1er corte sumados a los del 2do. De esta manera se obtiene más claramente el aporte de nitrógeno de las cepas a las plantas de ballica.

4.4.1 Peso seco aéreo total. En el Cuadro 11, se exponen los resultados obtenidos correspondientes a la suma del primer y segundo corte.

Se observa que para el tratamiento sin fertilización, aquellas plantas inoculadas no presentaron diferencias significativas en comparación al testigo. Lo mismo se puede decir del tratamiento con dosis completa (100% NPK).

Los más bajos rendimientos se obtuvieron en los tratamientos sin fertilización ya sea con o sin inóculo, y en el tratamiento 50% NPK, inoculado con C1.

Con niveles medios de fertilización, se observa una diferencia significativa con respecto al tratamiento Sin Bact. y a C1+C2. Esta última combinación presenta valores bastante mayores, con una diferencia de aproximadamente 6 gramos. También se encuentran diferencias significativas entre C1 con C2 y con C1+C2. En ambos casos, estas cepas (C2 50% NPK y C1+C2 50% NPK) contribuyeron significativamente en comparación a C1 50% NPK).

Según OKON *et al.* (1977), y DÖBEREINER y PEDROSA (1987), la actividad fijadora de N_2 en microorganismos diazótrofos queda a cargo de la enzima nitrogenasa, compuesto cuya actividad fijadora de N atmosférico se ve inhibida por la abundancia de nitrógeno en el suelo.

Por el contrario, la actividad de esta enzima se ve favorecida por un pH cercano a la neutralidad, elevada humedad y baja tensión de oxígeno, o por una baja concentración de compuestos nitrogenados tales como el amonio y el nitrato (TORRALBA *et al.*, 1997).

En el tratamiento con P+K, existió diferencia significativa entre C2 P+K y C1+C2 P+K, obteniendo esta última el menor valor.

CUADRO 11. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el peso seco aéreo total (g) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

MS Tot (Aéreo) Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	18,629 e	23,889 cd	30,030 ab	29,507 ab
C1	18,707 e	20,727 de	31,709 a	29,331 ab
C2	17,766 e	27,445 abc	28,501 abc	30,466 a
C1+C2	21,959 de	29,563 ab	31,560 a	25,462 bcd

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

OKON (1985), señala que los efectos de la inoculación 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.

DÖBEREINER y PEDROSA (1987), señalan que aunque muchos ensayos han demostrado un incremento en la asimilación de nitrógeno por parte de plantas inoculadas con ciertos diazótrofos, solo existen unos pocos datos que entregan pruebas inequívocas que el N fijado fue directa (o indirectamente) transferido a la planta y translocado a las hojas.

Los resultados obtenidos pueden estar determinados en parte por los exudados radiculares de *L. perenne*. Estos compuestos químicos secretados en el suelo por las raíces de las plantas, pueden cumplir importantes roles como atrayentes y repelentes químicos en la rizosfera. Aunque la exudación de las raíces representa un costo significativo a la planta, los mecanismos y los procesos regulatorios que controlan la secreción radical sólo recientemente han comenzado a ser examinados (McCULLY, 2001).

4.4.2 Área foliar total. El área foliar total (área foliar del primer corte sumado al área foliar del segundo corte), se presenta en el Cuadro 12.

Para 0% NPK no existen diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

El tratamiento sin fertilización, en comparación al tratamiento con el 100% de la dosis y a P+K (S/N), presenta diferencias significativas con menores índices de área foliar (Cuadro 12).

Al aplicar la mitad de la dosis de fertilización, las macetas inoculadas con C2 obtienen un amplio desarrollo de área foliar, más bien, presentan una diferencia significativa con respecto a aquellos inoculados con las otras cepas, o sin inóculo, a igual nivel de fertilización (50% NPK).

Al ser completa la fertilización, se obtienen diferencias significativas al inocular con C1+C2 en comparación a las otras inoculaciones, obteniendo así mismo diferencias significativas con los otros niveles de fertilización. Sin embargo, no tiene diferencias significativas con el tratamiento sin inocular 100% NPK.

De acuerdo a lo expuesto en el Cuadro 12, en el tratamiento P+K (S/N), son todos estadísticamente iguales, no presentan diferencias significativas.

Según RODELAS (2001), dentro del grupo de los fijadores de vida libre el género *Azotobacter* presenta la capacidad de fijar N_2 atmosférico cuando en el suelo existen suficientes cantidades de materia orgánica, ya que en suelos poco fértiles con escaso contenido de ésta, no se obtiene efecto agronómico positivo.

En cuanto a la combinación de biofertilizantes y fertilización mineral, ROQUE *et al.* (1994), sostienen que en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta*), al analizar la respuesta a la fertilización nitrogenada y su combinación con biofertilizantes en el clon CMC-40, demostraron que los mejores resultados se obtuvieron con la combinación biofertilizante-fertilización mineral, destacándose *Azotobacter* como biofertilizante.

CUADRO 12. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre el Área foliar total (cm²) de plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

AF Tot. Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K (S/N)
Sin Bact.	673,786 g	990,83 def	1340,39 abc	1353,764 abc
C1	921, 336 efg	999,3712 def	1231,9512 bcd	1253,198 bcd
C2	809, 044 fg	1501,294 ab	1251,082 bcd	1330,98 abc
C1+C2	728,75 fg	1211,518 cd	1545,394 a	1125,95 cde

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

4.5 Efecto de la inoculación de *P. agglomerans* sobre el nitrógeno presente en plantas de ballica inglesa.

En este capítulo, se describen y discuten los resultados obtenidos para las variables “extracción de nitrógeno”, las cuales indican la cantidad de este macroelemento fijado y almacenado en los órganos aéreos y radicales.

Estos resultados están referidos para cada uno de los cortes realizados a ballica inglesa cultivar Nui y para ambos sumados.

4.5.1 Extracción de nitrógeno a nivel foliar al 1er corte. Para ésta variable, no se presenten diferencias significativas entre los tratamientos.

Los tres tratamientos inoculados con *P. agglomerans*, no arrojan diferencias significativas entre ellos, ni con el testigo. Estos son idénticos entre sí estadísticamente. No existe un efecto significativo de *P.agglomerans* en la acumulación de N en tejidos para esta etapa del cultivo (Cuadro 13).

CUADRO 13. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno foliar (g) al 1er corte en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	Ex. N 1 (g)
Sin Bact.	0.13262 a
C1	0.12214 a
C2	0.13821 a
C1+C2	0.13063 a

ns $P > 0.05$

4.5.2 Extracción de nitrógeno a nivel foliar al 2do corte. Los resultados se presentan en el Cuadro 14, no presentando diferencias significativas entre los tratamientos.

En ésta etapa del ensayo no se evidencia contribución a la extracción de nitrógeno por parte de *P. agglomerans*, por lo que no mostraría un efecto sobre la acumulación de N en los tejidos.

CUADRO 14. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno foliar (g) al 2do corte en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	Ex N 2 (g)
Sin Bact.	0.27858 a
C1	0.28133 a
C2	0.24169 a
C1+C2	0.29589 a

ns $P > 0.05$

La discusión correspondiente a este punto, es homologable con aquella para extracción de nitrógeno al 1er corte, ya que ocurre la misma respuesta.

4.5.3 Extracción total de nitrógeno a nivel foliar. Comparando los resultados en conjunto, referido a la extracción de nitrógeno total a nivel foliar, es posible concluir que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 15).

CUADRO 15. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno foliar total (g) en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

Cepas	Ex N total hojas (g)
Sin Bact.	0.4112 a
C1	0.4034 a
C2	0.3799 a
C1+C2	0.4265 a

ns $P > 0.05$

Al analizar los resultados referidos a la extracción de nitrógeno total de ambos cortes, (Cuadro 15) se puede establecer que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Para la variable extracción de nitrógeno, las plantas inoculadas con *P. agglomerans* se comportaron de la misma forma que los tratamientos testigo que no fueron inoculados inicialmente.

No se evidencian diferencias significativas entre los otros tratamientos y los testigos.

4.5.4 Extracción de nitrógeno a nivel radicular. En el Cuadro 16 se presentan los resultados referidos a la extracción de nitrógeno en la raíz alcanzado por las plantas de ballica inglesa, existiendo interacción entre cepas y tipo de fertilización en este caso.

Al observar los tratamientos inoculados, no existen diferencias significativas entre ellos ni con los testigos. Son todos estadísticamente iguales (Cuadro 16).

El tratamiento sin inocular 100% NPK, presentó diferencias significativas con 0% Sin Bact., 0% C2, 0% C1+C2, C1+C2 P+K (sin/N) y, con C1 50% y 100% NPK.

CUADRO 16. Efecto de *Pantoea agglomerans* sobre la Extracción de nitrógeno a nivel radicular (g) en plantas de *Lolium perenne* crecidas en macetas.

N Raíz (g) Cepas	Fertilización			
	0%	50%	100%	P+K
Sin Bact.	0.12485 b	0.18994 ab	0.26286 a	0.19957 ab
C1	0.17325 ab	0.14388 b	0.15133 b	0.18625 ab
C2	0.13815 b	0.16992 ab	0.19168 ab	0.17477 ab
C1+C2	0.13113 b	0.22479 ab	0.21993 ab	0.14258 b

Los valores con distinta letra presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

En general, la extracción de este elemento es menor en la raíz que en la parte aérea de la planta, lo que concuerda con los resultados obtenidos por RINCÓN *et al.*, 2000.

Según DÖBEREINER y PEDROSA (1987), la cuantificación de la fijación asociativa de N_2 en gramíneas es más complicada que en leguminosas. Mientras que leguminosas bien noduladas crecidas en arena o vermiculita estéril, libre de N, pueden fijar todo el N que necesitan para un óptimo crecimiento, las gramíneas no pueden hacerlo.

Esto puede explicar la causa de la disparidad en cuanto a los resultados de cada variable.

Debido a la creciente necesidad de enfocarse a una mayor productividad, reduciendo los costos y la contaminación ambiental, es de especial interés una continuación en estudios e investigación con respecto a la aplicación de biofertilizantes, ya sea con otro tipo de PGPR o en otros cultivos, ya que de acuerdo a diversos ensayos, éstos han demostrado contribuir al crecimiento vegetal de alguna u otra manera.

Si bien en esta tesis no se demostró un efecto promotor de crecimiento vegetal por parte de *Pantoea agglomerans* inoculada a plantas de *Lolium perenne*, está demostrado mediante previas investigaciones realizadas por BENGOCHEA (2005), que las cepas C1 y C2 de este microorganismo son capaces de fijar nitrógeno a formas asimilables por la planta, y de sintetizar AIA, por lo cual es de gran importancia continuar realizando ensayos con estas cepas, por ejemplo, en cultivos de trigo var. Otto, para los cuales sí se han presentado respuestas benéficas.

5. CONCLUSIONES

Pantoea agglomerans (C1 y C2) no demostró complejidades al ser bioatrapada en matrices de alginato. Estas biocapsulas resultaron ser un medio eficaz para la manipulación de los microorganismos.

Las cepas C1 y C2 bioatrapadas, presentaron un comportamiento benéfico al ser inoculadas en plantas de *Lolium perenne* var. Nui en cuanto al número de macollos de las plantas, ya que al evaluar el efecto promotor de crecimiento existieron incrementos en el número de éstos.

En contraste, para el primer corte, las variables Peso seco aéreo, Área foliar y Altura de planta, no fueron estimuladas por ninguna de las inoculaciones con estos microorganismos.

Asimismo, los resultados indican que las cepas estudiadas no tuvieron un efecto significativo en el segundo corte para las variables Peso seco aéreo, Área foliar, Peso seco radical y Peso de macollos. Para los resultados totales ocurrió la misma respuesta.

No existieron incrementos en la extracción de nitrógeno para aquellas plantas inoculadas, ya sea a nivel foliar y radicular, obteniendo valores sin diferenciarse significativamente del tratamiento control.

Sin embargo, en diversos ensayos, estas bacterias han demostrado su capacidad de promoción de crecimiento vegetal, por lo que sería interesante continuar investigando ya sea con *P. agglomerans* y otros cultivos, o también, con otras especies de microorganismos PGPR.

6. RESUMEN

Se estudió el efecto de dos cepas de *Pantoea agglomerans* (C1 y C2) fijadoras de nitrógeno sobre un cultivo de ballica inglesa, en un invernadero perteneciente a la Universidad Austral de Chile.

La hipótesis planteada en esta investigación fue la siguiente: bacterias seleccionadas del suelo y clasificadas como rizobacterias promueven el crecimiento vegetal de gramíneas, en este caso, de *Lolium perenne*, cultivar Nui. El objetivo general, evaluar 2 cepas de estas bacterias pertenecientes al género *P. agglomerans*, aisladas de la rizósfera de plantas de ballica inglesa, y establecer su capacidad de promover el crecimiento y aporte de nitrógeno a plantas de ballica.

Cepas de *P. agglomerans*, se aislaron y multiplicaron en laboratorio, para luego ser encapsuladas en matrices de alginato, lo que permitió su inoculación al sustrato junto a *L. perenne*. El ensayo constó de tratamientos en los cuales se aplicó diferentes dosis de fertilizante mineral, y distintos tipos de inoculación con estas mismas cepas en macetas. Se realizaron dos cortes para determinar el efecto de promoción del crecimiento vegetal, efectuando análisis de extracción de nitrógeno, medición de producción de materia seca, área foliar, número y peso de macollos y altura de planta. Esto se hizo en la parte aérea en ambos cortes y en la raíz para el segundo corte.

No existieron incrementos de biomasa a nivel foliar ni radicular en cuanto a materia seca. No se presentaron diferencias significativas con los testigos para las variables Peso seco aéreo, Área foliar, Altura de planta, Peso seco radical y Peso de macollos, tanto para el primer como para el segundo corte.

En cuanto al número de macollos se presentaron diferencias significativas en comparación al testigo.

La extracción de nitrógeno no fue estimulada por ninguna de las inoculaciones con estos microorganismos.

SUMMARY

The effect of two nitrogen-fixing strains of *Pantoea agglomerans* (C1 and C2), was studied on a crop of ryegrass in a greenhouse at the Universidad Austral de Chile.

The hypothesis in this research was: bacteria selected for the soil and classified as rizobacteria promotes vegetal growth in grass, in this case *Lolium perenne*. The overall objective is evaluate 2 strains of these bacteria, belonging to the genus *P. agglomerans*, isolated from the rhizosphere of ryegrass plants and, establishe their ability to promote growth and nitrogen contribution to the plant.

Strains of *P. agglomerans* were isolated and multiplied in the laboratory and then encapsulated in alginate spheres, which allowed this to be inoculated to the substrate with *L. perenne*. The test consisted of treatments where different doses of mineral fertilizers were applied and various types of inoculation with the same strains in pots. Two cuts were made to determine the effect of plant growth promotion, making analysis of nitrogen extraction, measuring dry matter production, leaf area, number and weight of tillers and plant height. This was done on the leaves in both cuts and on root for the second cut.

There were no increases in biomass of leaf or root on dry matter. There were no significant differences with witnesses for variables Dry leaf weight, leaf area, plant height, radical weight and dry weight of bunches, both for the first and the second cut.

In terms of the number of bunches there were significant differences

compared to the witness.

The removal of nitrogen was not sparked by any of the inoculations with these microorganisms.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDRE, G. y I. B. ZHULIN. 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* 183: 4681-4686
- ANDREWS, J. H. y HARRIS, R. F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 145–180.
- 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.
- BALDANI J. I., CARUSO L., BALDANI V. L. D., GOI S. R. y DÖBEREINER J. 1997. Recent advance in BNF with non-legume plant. *Soil Biol. Biochem.* 29, 911–922.
- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.
- BASHAN, J. y G. HOLGUIN 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology.* 60: 2120-2131.
- BEIJI A., MERGAERT J., GAVINI F., IZARD D., KERSTERS K., LECLERC H. y DELEY J. 1988. Subjective synonym of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 77–88.

- BENGOECHEA, M. 2006. Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal de *Pantoea agglomerans* y *Azospirillum brasilense* encapsuladas sobre trigo (*Triticum aestivum* L.) var. Otto. Tesis Lic. en Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. 138 p.
- BISWAS, J. C., LADHA, J. K., y DAZZO, F. B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 1644–1650.
- BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., REIS, V., y DÖBEREINER, J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137: 111–117.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J. y OKON, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*P. vulgaris* L.). *Soil Biology Biochemistry* 29: 923-929.
- CIAMPI, L. BERNAL, G., OYARZÚN, J., SCHÖBITZ, R. y FUENTES, R. 1997. Atrapamiento de células bacterianas en matrices de alginato para el control biológico de agentes fitopatógenos. *Acta Microbiológica de Chile.* 7: 28-30.
- CLELAND, R.E. 1990. Auxin and cell elongation. **In:** *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, pp. 132–148, Davies, P.J., Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- COLABELLI, M., AGNUSDEI, M., MAZZANTI, A., y LABREVEUX, M. 1998. El proceso de crecimiento y desarrollo de gramíneas forrajeras como base

para el manejo de la defoliación.
<http://www.produccionbovina.com/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/01-proceso_crecimiento.htm> (18 Oct. 2007).

COMPAGNONI, A. 1997. La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Cambiando le regole Europee per l' agricultura biologica. L'informatore agrario_53(31):60-61 Coscaturca, Antonia. <<http://mixteco.utm.mx/temas-docs/ensay3t13R.pdf>> (03 Ago. 2005).

CROZIER, A., ARRUDA, P., JASMIN, J.M., MONTEIRO, A.M., y SANDBERG, G. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2833–2837.

DE ARAUJO W.L., MACCHERONI W.J., AGUILAR-VILDOSO C. I., BARROSO P.A., SARIDAKIS H. O. y AZEVEDO J. L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. Can. J. Microbiol. 47, 229–236.

DILEEP, B.C. y H. C. DUBET. 1992. Seed bacterization with a fluorescens *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. Soil Biology and Biochemistry. 24 (6):539-542.

DÖBEREINER, J. y F. PEDROSA. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers. Estados Unidos. 155 p.

DÖBEREINER, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rizosphere of *Paspalum notatum* Flügge.

Zentbl. Bakt. Parasitke. 124:224-230.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. y OKÓN, Y. 2003. Plant-Growth Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 107-149.

ELVIRA-RECUENCO M. y VAN VUURDE J. W. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 46, 1036–1041.

GAETANO, A. 2004. Efectos de la inoculación con *A. brasilense* sobre plantas de arroz (*Oryza sativa*). Tesis Lic. Agr.. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 33 p.

GAVINI F., MERGAERT J., BEIJI A., MIELCARECK C., IZARD D., KERSTERS K. y DE LEY J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. 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.

HANNAWAY, D., FRANSEN, S., CROPPER, J., TEEL, M., CHANEY, M., GRIGGS, T., HALSE, R., HART, J., CHEEKE, P., HANSEN, D., KLINGER, R., y LANE, W. 1999. Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) <<http://eesc.orst.edu/agcomwebfile/edmat/html/pnw/pnw503/intro.html>> (02 Ago. 2005).

- HUEBNER, H., y BUCCHOLZ, R. 1999. Bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. John Wiley & Sons. 1786-1798.
- JIMÉNEZ, R., VIRGEN, G., TABARES, S. Y OLALDE V., 2001 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva vol. 20 México, pp: 395-400
- KLOEPPER J. W. y BEAUCHAMP C. J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Can. J. Microbil. 38, 1219–1232.
- LINDOW, S. E. y BRANDL, M. 1998. Contribution of Indole-3-Acetic Acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. Department of Plant and Microbial Biology, University of California, 1998. 220p.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. 1997. Brock. Biología de los microorganismos. Prentice Hall Iberia, México. 986p.
- MARTINEZ, R., DIBUT, B., CASANOVA, I. y ORTEGA, M. 1997. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococum* sobre el cultivo del tomate en suelo Ferralítico Rojo. Efecto sobre los semilleros. Agrotecnia de Cuba 27(1):23-26.
- McCULLY M. E. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. Aust. J. Plant Physiol. 28, 983–990.
- MERBACH, W., RUPPEL, S. y J. SCHULZE. 1998. Dinitrogen Fixation of Microbe-Plant Associations as Affected by Nitrate and Ammonium Sypply. Isotopes in Environmental and Health Studies. 34: 67-73.

- MILLET, E., AVIVI, Y., y FELDMAN, M. 1985. Effects of rhizospheric bacteria on wheat yield under field conditions. *Plant Soil*. 86:347-355.
- NELSON, L. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>> (23 Jul. 2005).
- OKON, Y. 1985. *Azospirillum* as a potencial inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.* 3: 223-228.
- OKON, Y., HOUCHINS, J. P., ALBRECHT, S.L., y BURRIS, R.H. 1977. Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *J. Gen. Microbiol.* 98:87-93.
- OKON, Y. y LABANDERA-GONZALEZ, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 26, no. 12, pp. 1591-1601.
- PATRIQUIN, D. G., y DÖBEREINER, J. 1987. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the rizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24:734-742.
- PATTEN, Ch. y GLICK, B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indolacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8):3795-3801.
- PÉREZ, M., GUTIÉRREZ, F., GONZÁLEZ, J., y BERMÚDEZ DE CASTRO, F. 1989. Entradas biológicas de nitrógeno en un bosque ribereño. *Análisis*

del ARA. < <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a03/CI000536.pdf>> (10 Oct 2007).

- POSTGATE, J. R. 1982. The fundamentals of Nitrogen Fixation. Cambridge University, Cambridge, England. 252 p.
- POSTGATE, J. 1990. New Studies in biology. Nitrogen fixation. Londres, Inglaterra. Edward Arnold. 69 p.
- PRASAD, G., EVAN, K., NATARAJAN, M., PALLAVOLU, M., REINHOLD - HUREK, B. y J. LADHA. 2001. Endophytic Colonization of Rice by a Diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. J. Bacterial. 183:2634-2645.
- RENNIE, R.J. 1980. Dinitrogen-fixing bacteria: computer assisted identification of soil isolates. Can. J. Microbiol. 26: 1275-1283.
- 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.
- RINCÓN, J. J., CLAVERO, T., RAZZ, R., PIETROSEMOLI, S., MENDEZ-CASTRO, F. y NOGUERA, N., 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación biológica de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) of Wit). Rev. Fac. Agron., N°17, p: 342-357.
- RODELAS, M.B. 2001. Interacción *Rhizobium-Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en Vicia faba.

<<http://www.monografias.com/trabajos12/fibi/fibi.shtml#azo>> (15 Julio 2005).

ROQUE, A., MARRERO, V., GUZMAN, J., CASTILLO, A., y BUENO, A. 1994. Respuesta de la yuca (*Manihot esculenta*) a la fertilización nitrogenada y combinación con biofertilizantes. <<http://www.monografias.com/trabajos12/fibi/fibi.shtml#azo>> (4 Abril 2005).

ROVIRA, A. 1973. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of micro-organisms in the rhizosphere. Pestic. Sci., 4: 361-366.

RUIZ, I. 1988. Praderas para Chile. INIA, Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile. 634 p.

RUPPEL, S., HECHT-BUCHOLZ, C., REMUS, R., ORTMANN, U. 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.

SCHOEBITZ, M. 2005. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis Lic. en Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. 56 p.

SHULER, M., y KARGI, F. 2002. Bioprocess Engineering basic concepts 2nd edition. Prentice Hall. 553 p.

- SOTO-URZÚA, L. y BACA, B. 2001. Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43: 37-49. <<http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2001/mi011f.pdf>> (03 Sept. 2005).
- STANIER, R.; INGRAHAM, J.; WHEELIS, M. y PAINTER, P. 1996. *Microbiología*, Segunda edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 749 p.
- TORRALBA, A. y PEREZ, S. 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. 21 pp. <<http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/introduccion.html>> (17 Dic. 2005).
- UMALI-GARCIA, M., HUBBELL, D. H., GASKINS, H., y DAZZO, F. B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
- VERMA S. C., LADHA J. K. y TRIPATHI A. K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. *J. Biotechnol.* 91, 127–141.
- VESSEY, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- WHIPPS, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511.

ZEHNDER, G.W., MURPHY J. F., SIKORA E. J. y KLOEPPER J. W. 2001.
Application to rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*
107, 39–50.

ANEXOS

ANEXO 1. Reconstitución de cepas. Se agregó 1 ml de caldo peptona a cada tubo liofilizado conteniendo cada cepa. Luego se introdujeron a una cámara de cultivo (Memmert) a 28° C. Al cabo de 24h fueron sembradas en placas con agar papa dextrosa

ANEXO 2. Preparación de agar papa dextrosa (APD): Para preparar 1 litro de APD se necesitan 39 gramos de dextrosa. Se mezcla con agua destilada en el matraz Erlenmeyer y se coloca 25 minutos en el agitador, con calor (10° C; 7 revoluciones). Luego se autoclava el matraz (autoclave chico) por 15 minutos a 1 atm.

Finalmente se llenan las placas petri con APD y luego se guardan en el refrigerador.

ANEXO 3.

Tinción de Gram:

- Suspensión de la bacteria en una gota de agua, se fija en calor.
- Una vez seco se tiñe con cristal violeta por 10 segundos
- Se lava la muestra
- Se agrega lugol por 10 segundos
- Lavar nuevamente
- Agregar alcohol acetona 2 a 3 segundos
- Lavar
- Agregar safranina por 10 segundos
- Lavar
- Secar la muestra con un papel absorbente

- Observar al microscopio con el objetivo 100x con aceite de inmersión

Prueba de la oxidasa:

Esta prueba se realiza para comprobar que las cepas corresponden a la familia *Enterobacteriaceae*. En un portaobjeto se pone papel filtro, unas gotitas de reactivo (oxidasa) Kovac, y luego se pone una cantidad de bacteria de la placa. Si la bacteria queda del mismo color (no se tiñe) es negativa. Si se tiñe es positiva, debido a que presenta la enzima oxidasa.

ANEXO 4. El caldo papa dextrosa (CPD) consiste principalmente en hervir 200 g de papas sin cáscara, en 1 litro de agua. Posteriormente se filtran por gasa y se afora a 1 litro con agua destilada, en una probeta. Luego se agregan 10 a 20 gramos de glucosa o dextrosa, se vacía en matraz Erlenmeyer, y se autoclava por 15 minutos, a 1 atm de presión.

ANEXO 5. Homogeneizado: (Alginato: Para atrapar las bacterias)

Para 1 litro:

Caldo papa fresco

Alginato al 2%

Almidón soluble 1%

Pectina 1%

Betaína 1%

Celite Diactiv 17-C 1% (Tierra de diatomeas, higroscópica, mantiene la humedad)

Molibdeno (pizca)

(Alginato + Pectina)

- Se agrega alginato junto con la pectina al caldo papa dextrosa. Se agita y calienta. Enfriar. Luego se agrega almidón soluble, betaína y Celite diactiv. Agitar nuevamente. Enfriar. Agregar bacterias.

No se autoclava porque si no el alginato se depolimeriza por el calor.

ANEXO 6. Centrifugación: Consiste en centrifugar la suspensión de bacterias contenida en el caldo papa, por 10 minutos, a 6000 rpm a 4°C. Se centrifuga para separar el sobrenadante del pellet de bacterias. De esta forma se obtiene el pellet y un alto inóculo de bacterias para el proceso de encapsulación.

ANEXO 7. Acido glucónico: Se prepararán 800 ml de ácido glucónico (800 ml de agua estéril + 17.2 gramos de ácido glucónico).

El ácido glucónico viene en una concentración 1 molar:

$0.8L \times 0.1\text{mol/L}$ (concentración a la cual se quiere llegar) $\times 215.2 \text{ g/mol} = 17.2 \text{ g}$

Por lo tanto: Se mezclaron 800 ml de agua estéril mas 17.2 gramos de ácido glucónico en un matraz de 1 litro. Se agitó por dos días para lograr que se disuelva bien.

ANEXO 8. Recuento unidades formadoras de colonia (UFC): En una bolsa especial para el Stomacher® 80 Laboratory Systems, se pusieron 10 cápsulas con 5 ml de agua estéril. El “Stomacher” las muele por 30 minutos aproximadamente, y se considera que esta solución tiene una concentración de 1×10^{-1} .

Una vez molidas las cápsulas, se extrajo con la pipeta automática 1 ml del sobrenadante, el cual se depositó en tubos de ensayo con 9 ml de agua estéril, hasta lograr una concentración de 1×10^{-10} . El principio de funcionamiento de este aparato está basado en la combinación de dos fuerzas mecánicas: aplastamiento y agitación de la muestra.

Luego, una vez hechas las diluciones en los tubos de ensayo, se extrajeron de cada tubo 0.1 ml (100 microlitros) y se sembraron en la placa correspondiente (placas de APD). Una vez sembradas las placas se esparció la gota de dilución y se llevó a la cámara de cultivo, a 28°C, para observar al día siguiente las UFC. Se pretende obtener de 30-300 UFC/0.1 ml.

Una vez obtenidas las colonias en la placa Petri, éstas se contaron en el “contador de colonias”, el cual consiste en una lupa grande, en donde se deposita la placa bajo ella, ésta se divide en 2 o 4 partes con un lápiz marcador, dependiendo de la cantidad de unidades formadoras de colonias. De esta forma se van contando las colonias por cuadrante, y se estima la cantidad de ellas que existe por placa.

Cálculo recuento UFC: Se obtuvieron en promedio 7.8×10^7 UFC/ml x 5 ml = 390.000.000

$$\begin{aligned} \text{Por lo tanto, } & 39 \times 10^7 \text{ UFC en 5 ml} \\ & = 39 \times 10^7 \text{ UFC/5 ml} \div 10 \text{ (10 cápsulas)} \\ & = 39 \times 10^6 \text{ UFC/cápsula} \\ & = 3.9 \times 10^7 \text{ UFC/cápsula: En esta forma se presentan los} \end{aligned}$$

resultados.

ANEXO 9. Cálculo dosis de semillas.

% germinación de semillas:

- 25% semillas germinadas
- 12 plántulas anormales
- 69% semillas muertas

$$10.000 \text{ m}^2 \quad \text{—} \quad 25 \text{ kg semillas}$$

$$0,031415 \text{ m}^2 \quad \text{—} \quad x$$

$$x = 0,000079 \text{ kg semilla}$$

= 0,08 gramos semilla

Corrección:

0,08 g — 25%

x — 100%

x = 0,32 g

De acuerdo a los resultados, se aproximó y se sembró 0,4 gramos de semilla por maceta. Una vez emergidas las plántulas, se realizó un raleo y se dejaron 38 plantas por maceta.

En 0,4 gramos de semilla hay 190 semillas aproximadamente, por lo tanto, por cada maceta, se sembró este número de semillas.

ANEXO 10. Cálculo de dosis de fertilización.

Nitrógeno (Nitrato de sodio)

150 kg. N/ha --- 16% N = 938 kg/ha

938 kg/ha — 1.400.000 kg

X — 4 kg

X = 2,68 g por macetero.

Fósforo (Superfosfato triple)

300 kg. P₂O₅/ha --- 46% P = 652 kg/ha

652 kg/ha — 1.400.000 kg

X — 4 kg

X = 1,86 g por macetero.

Potasio (Muriato de K)

200 kg. K_2O/ha --- 60% K = 333,3 kg/ha

333,3 kg/ha — 1.400.000 kg

X — 4 kg

X = 0,95 g por macetero.

Azufre (Fertiyeso)

300 kg/ha — 1.400.000 kg

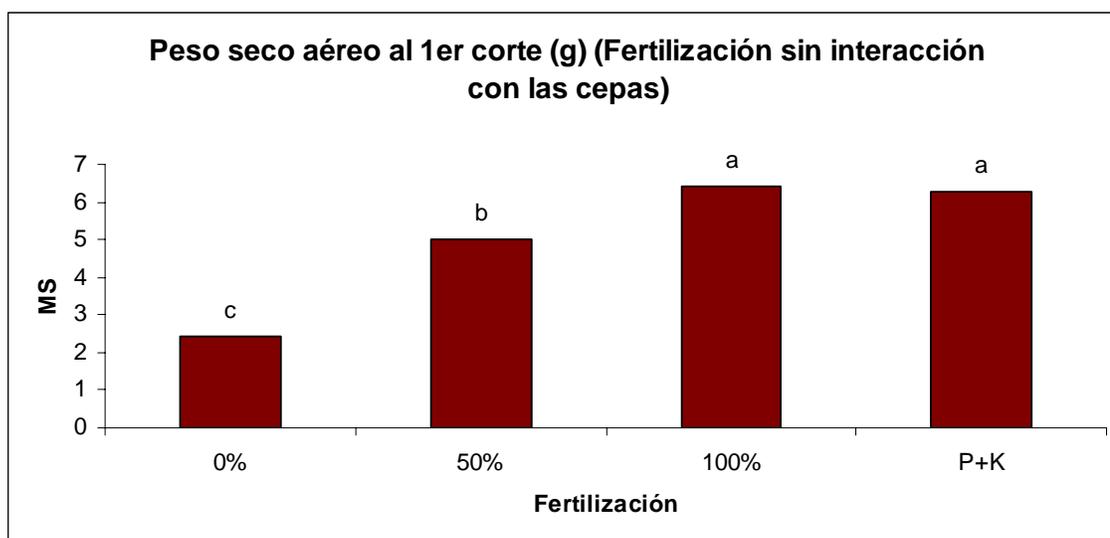
X — 4 kg

X = 0,857 g por macetero.

ANEXO 11. Cálculo peso seco del suelo. El suelo de cada maceta (6 kg de suelo húmedo), se puso en repisas sobre papel de diario, en una pieza con una temperatura de 27°C, correspondiente al Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos de la U.A.Ch.

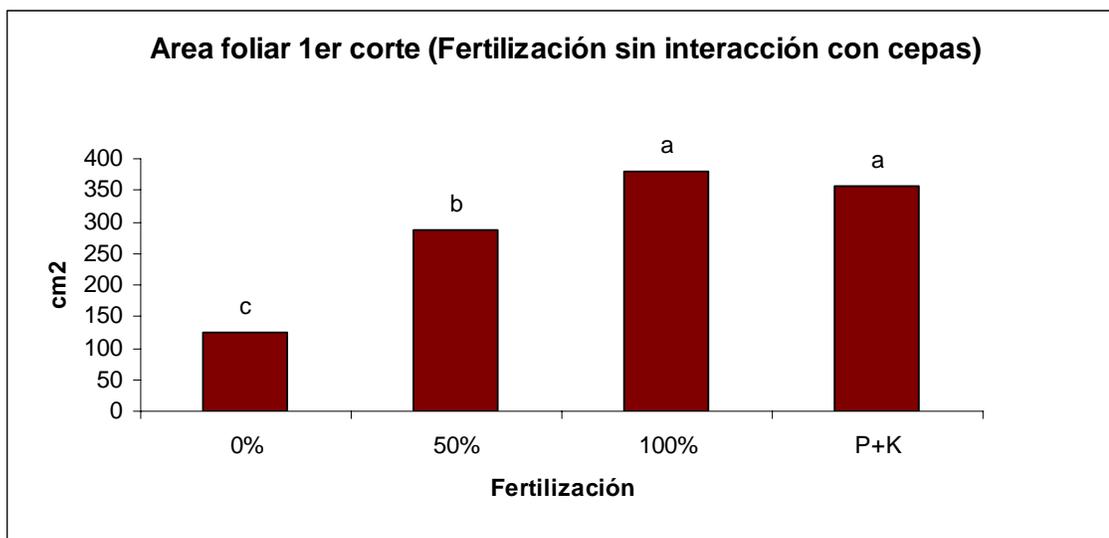
Permaneció en esta pieza por 4 días, y al pesarlo, se obtuvo 4 kg de suelo seco.

ANEXO 12. Figuras y Cuadros “Fertilización” para: Peso seco aéreo al 1er corte, Área foliar 1er corte, Peso de macollos, Extracción de nitrógeno aéreo 1er corte, Extracción de nitrógeno aéreo 2do corte, Extracción de nitrógeno aéreo total.



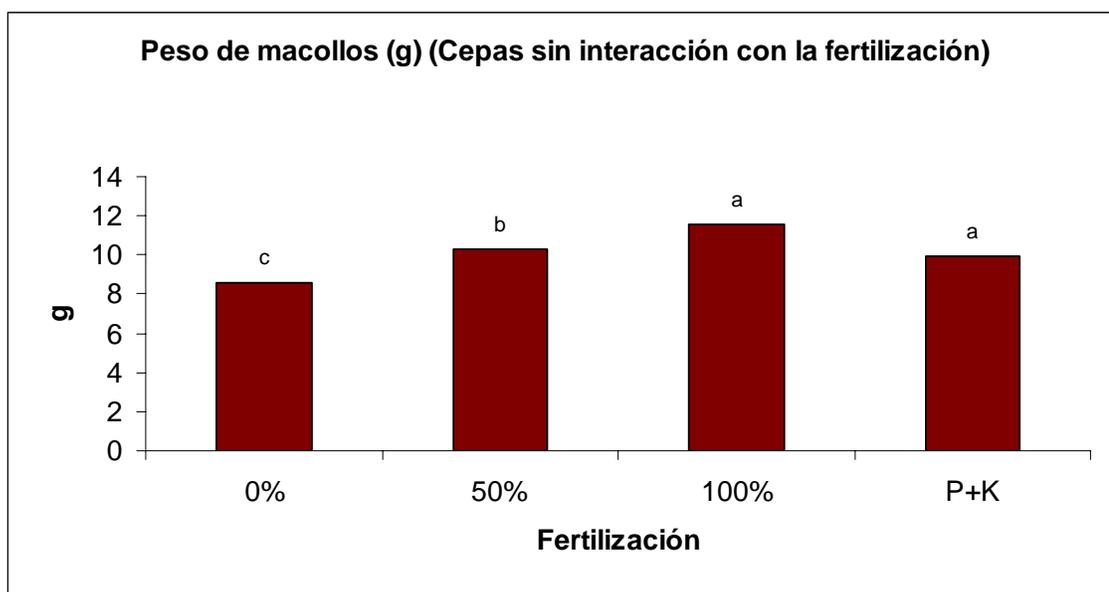
Fert.	MS 1
0%	2,415 c
50%	4,991 b
100%	6,419 a
P+K (S/N)	6,258 a

*** $P < 0.001$



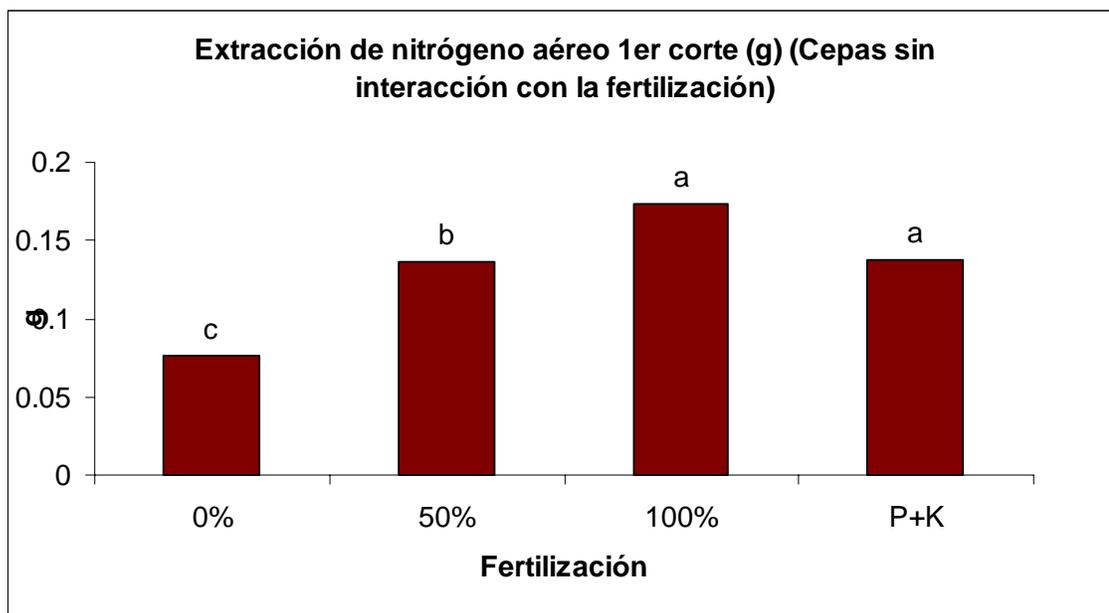
Fert.	AF1
0%	124.16 c
50%	288.31 b
100%	379.73 a
P+K (S/N)	356.94 a

*** $P < 0.001$



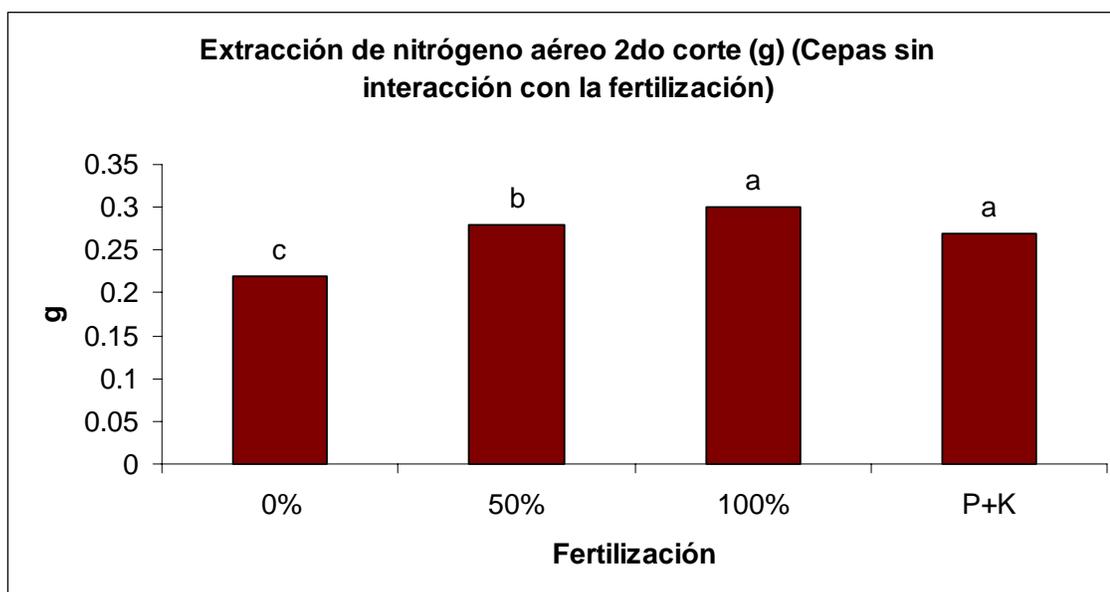
Fert.	Peso Mac.
0%	8.6 c
50%	10.3 b
100%	11.6 a
P+K (S/N)	9.98 a

*** $P < 0.001$



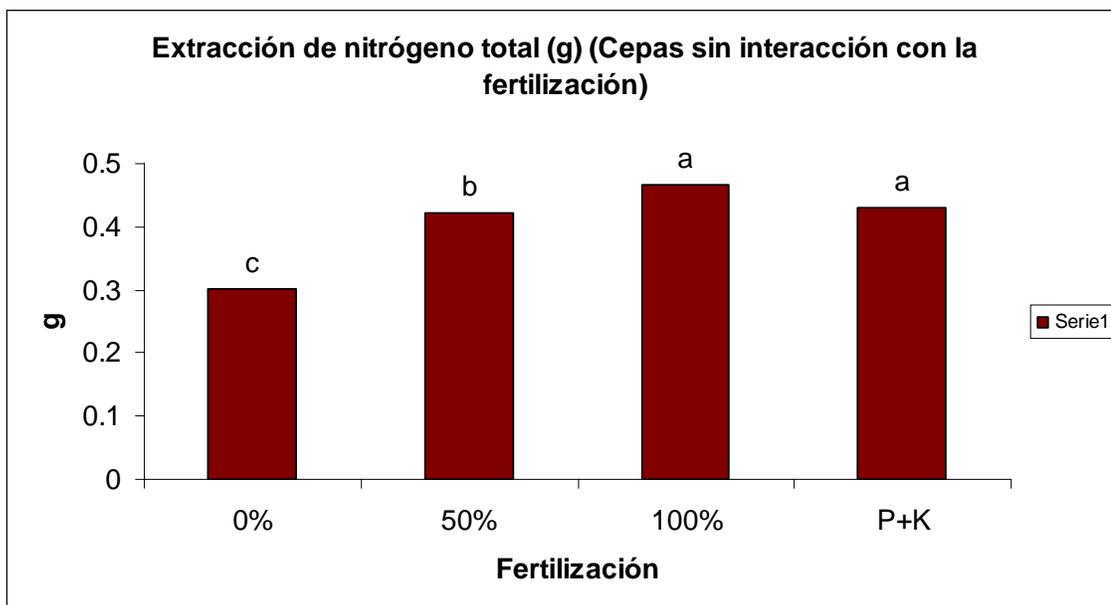
Fert.	Extrac N1
0%	0.07592 c
50%	0.13696 b
100%	0.17318 a
P+K (S/N)	0.13753 a

*** $P < 0.001$



Fert.	Extrac N2
0%	0.22 c
50%	0.28 b
100%	0.3 a
P+K (S/N)	0.27 a

*** $P < 0.001$



Fert.	Extrac N tot.
0%	0.3023 c
50%	0.422 b
100%	0.4657 a
P+K (S/N)	0.43085 a

*** $P < 0.001$

ANEXO 13. Peso seco aéreo obtenido al primer corte, Área foliar al primer corte, Altura de planta, Peso seco aéreo obtenido al segundo corte, Área foliar al segundo corte, Peso seco radical, Número de macollos, Peso de macollos, Peso seco aéreo total, Área foliar total, Extracción de nitrógeno aéreo al primer corte, Extracción de nitrógeno aéreo al segundo corte, Extracción de nitrógeno total, Extracción de nitrógeno en tejido radicular.

