

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD TESINA

“Selección de bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso (Melia azedarach) con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal”

Autor: Gerometta Aldana Evelyn

Docente Asesor: Bioq. (Dra) Cardozo Marina

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste

Tribunal evaluador: Ing. Agr. (Dra) Dolce, Natalia

Ing. Agr. (Dra) Yfran Elvira, Maria

Ing. Agr. (Dra) Luna, Claudia

Año 2016



Selección de bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso (*Melia azedarach*) con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal

Introducción

Las enfermedades causadas por fitoplasmas pueden resultar en importantes pérdidas económicas. Las particulares características de estos microorganismos y la poca información que existe sobre sus mecanismos de acción patógena dificultan el diseño de estrategias para un efectivo manejo de las fitoplasmosis. En la Argentina las principales especies leñosas en las que se ha detectado fitoplasmas son paraíso (*Melia azedarach*), y recientemente duraznero (*Prunus persica*) (Harrison *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2013). El declinamiento o amarillamiento del paraíso fue descrito por primera vez en la Argentina en 1983, asociado a la presencia de organismos tipo micoplasmas (MLOs) (Vázquez *et al.*, 1983). Trabajos posteriores demostraron la presencia de dos fitoplasmas diferentes (pertenecientes a los grupos 16SrIII-B y 16SrXIII-C) asociados a la misma enfermedad, solos o en infecciones mixtas (Harrison *et al.*, 2003; Galdeano *et al.*, 2004; Arneodo *et al.*, 2007).

Desde su detección, el declinamiento del paraíso ha resultado una limitante para la producción forestal de dicha especie (Rey *et al.*, 1986).

El control de estas enfermedades se dificulta por la distribución de estos patógenos limitada a células floemáticas. Las prácticas de control de las poblaciones de insectos vectores (Weintraub *et al.*, 2008; Baldessari *et al.*, 2010), uso de antibióticos (Kamińska y Śliwa, 2003; Aldaghi *et al.*, 2008), cultivo de meristemas y microestacas, combinados con termoterapia (Chalak *et al.*, 2005) y crioterapia (Wang *et al.*, 2009) han tenido resultados dispares.

Poco se conoce sobre otras alternativas como el control biológico ya sea a través de bacterias de vida libre o endofíticas. El término endofítico se aplica para los organismos cuyas infecciones son internas e inconspicuas y en las cuales el tejido infectado es al menos transientemente asintomático (Schulz y Boyle, 2006). Los microorganismos endofíticos colonizan los tejidos de las plantas formando asociaciones biotróficas intercelulares, la extensión de la colonización refleja la capacidad de la bacteria a adaptarse selectivamente a nichos ecológicos específicos.

Si bien las interacciones entre las bacterias endofíticas y las plantas hospedantes no están comprendidas en su totalidad, se han encontrado muchos aislamientos con efectos benéficos sobre sus hospedantes que pueden presentar un rol importante en la fisiología de la planta (Frioni, 1990).

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

En general el beneficio de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB: “plant growth promotion bacteria”), pueden ser un efecto directo o indirecto sobre la planta (Leaungvutiviroj *et al.*, 2010). Un mecanismo indirecto de PGPB es prevenir la presencia o disminuir el impacto de los microorganismos fitopatógenos (Glick, 1995). Los efectos directos pueden ser la fijación biológica de nitrógeno, movilización de nutrientes, producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), movilización de nutrientes, producción de sideróforos, reducción de niveles de etileno sintetizado por la planta en respuesta a estrés ambiental. El mecanismo se basa en la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar al 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, precursor del etileno) y utilizarlo como fuente de nitrógeno, por acción de la enzima ACC- desaminasa (Burd *et al.*, 1998).

NITRÓGENO

El nitrógeno constituye aproximadamente el 78% de los gases atmosféricos siendo éste el principal reservorio del elemento (Behar *et al.* 2005), es un elemento fundamental para el desarrollo de la vida, ya que forma parte de las macromoléculas (Paerl, 1998), de forma tal que la productividad de cualquier ecosistema está relacionada con la disponibilidad de este elemento (Ferrera *et al.* 1995). Se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal ya que es eliminado del suelo en cantidades superiores al resto de los nutrientes (Frioni, 1990), por lo que la productividad de los ecosistemas se relaciona con la disponibilidad de este elemento (Zhang *et al.* 2007). El nitrógeno es de suma importancia en la agricultura, debido a que incrementa los rendimientos de los cultivos y modifica la calidad y composición química de los vegetales (Frioni, 1990). De manera general los organismos requieren formas combinadas de nitrógeno para poder incorporarlo a su biomasa, el nitrógeno inorgánico se encuentra formando sales de amonio, nitrato y nitrito altamente hidrosolubles lo que facilita su pérdida por lixiviación (Chapin *et al.* 1992). La conversión en los diferentes estados de oxidación del nitrógeno es principalmente por procesos biológicos (Deslippe y Egger, 2006).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) o diazotrofia es un proceso importante en ecosistemas acuáticos y terrestres que no cuenten con fertilización química, siendo éste el principal aporte de nitrógeno para estos ambientes (Izquierdo *et al.* 2006). Una pequeña parte del N_2 puede ser fijada por procesos fisicoquímicos como en tormentas eléctricas pero la mayoría del nitrógeno se reduce de forma biológica (Postgate, 1982). La fijación del gas nitrógeno atmosférico se realiza por su reducción a amonio, siendo éste una molécula asimilable para los organismos (Deslippe y Egger, 2006). La FBN

es un proceso ampliamente distribuido entre bacterias y arqueas (Zhang *et al.*, 2007). El complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la FBN, consta de dos componentes: dinitrogenasa reductasa (con hierro como cofactor) y dinitrogenasa (con molibdeno y hierro como cofactores) (Henson *et al.*, 2004).

La FBN en el suelo es de gran importancia ecológica ya que provee de nitrógeno disponible a la planta y su vez la misma provee de exudados que pueden ser fuente de carbono para los microorganismo (Villadas *et al.* 2006).

El gen *nifH* codifica para la enzima nitrogenasa reductasa, homodímero que emplea hierro como cofactor (Zehr *et al.* 2003) este gen se ha usado como marcador para evaluar la diversidad de los organismos diazótrofos en diferentes ambientes, ya que es un gen altamente conservado entre los diferentes grupos de bacterias y también debido a que se cuenta con una gran base de datos de organismos diazótrofos descritos (Nusslein, 1999).

Ibarra Sánchez (2010) menciona que por su capacidad de fijar nitrógeno, las bacterias fijadoras de nitrógeno se consideran como candidatos para formular biofertilizantes, producidos en varios países del mundo. Estos biofertilizantes incluyen:

- 1) Las simbióticas como inoculantes, por ejemplo: *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* para trébol (*Trifolium spp.*), *Bradyrhizobium japonicum* para soja (*Glycine max*), *Sinorhizobium meliloti* para alfalfa (*Medicago sativa*), *Mesorhizobium loti* para *Lotus spp.*
- 2) Bacterias fijadoras de vida libre, como rizobacterias aisladas de suelo rizosférico (*Azospirillum*, *Klebsiella pneumoniae* etc.), o como endófitos aislados del tejido de las plantas (*Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Phytobacter* etc.).

Por otro lado, también se usan las bacterias que producen fitohormonas o solubilizan fosfatos y potasio como biofertilizante (Koh y Song, 2007; Vyas y Gulati,

2009). Ya se sabe que bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre además de aportar este elemento al ecosistema pueden participar en otros procesos contribuyendo así a la productividad del ecosistema.

FÓSFORO

El fósforo es considerado el segundo nutriente esencial, luego del nitrógeno, para el óptimo crecimiento de las plantas. Es un elemento abundante en el suelo, pero en forma no disponible para las plantas, como fosfatos insolubles de aluminio, hierro o calcio. Entonces, aquellos microorganismos capaces de solubilizar el fósforo insoluble y volverlo disponible para las plantas (en las formas de fosfatos mono y di ácido) resultan importantes candidatos para el desarrollo de biofertilizantes, dado que la fertilización química con fósforo resulta costosa y no es completamente aprovechada por las plantas. Agregar un fosfato a un compuesto particular lo energiza facilitando varias reacciones químicas vitales para el metabolismo celular. Existen algunos trabajos que evidencian la importancia del fósforo en la fisiología de las plantas. Por ejemplo, Foyer y Spencer (1986), encontraron que la deficiencia de fósforo en la fertilización de cebada, espinaca y soja estuvo relacionada con una disminución significativa del fósforo inorgánico foliar, de la tasa fotosintética y de la proporción sacarosa/almidón en las hojas. En otro estudio, esta vez de campo, Raaimaker *et al.* (1995) encontraron respuestas similares a la escasez de fósforo. Los autores estudiaron un bosque lluvioso en Guyana, con suelos ácidos bajos en fósforo, para determinar si la disponibilidad de este elemento limita la fotosíntesis de los árboles en ese ecosistema, en mayor grado que el nitrógeno. Encontraron que el contenido de fósforo foliar tuvo mayor influencia sobre la capacidad fotosintética que el contenido de nitrógeno foliar. También determinaron que la capacidad fotosintética dependió más

del contenido de fósforo y nitrógeno que de la cantidad de luz. A nivel nutrimental, la importancia del fósforo para los seres vivos radica en los procesos que desempeñan las moléculas de los que forma parte. Particularmente, el metabolismo vegetal depende en gran medida de este elemento debido, en parte, a su papel en reacciones de transferencia de energía.

El crecimiento y desarrollo vegetal se ve limitado principalmente por nitrógeno y después por fósforo debido a la presencia de estos elementos en el suelo (Fernández *et al.*, 2005; Kochian *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999). La baja disponibilidad se debe a que algunas sales de fósforo son poco solubles bajo ciertas condiciones de pH y a que algunos elementos en el suelo pueden fijarlo, extrayéndolo así de la fracción soluble. Estas deficiencias en la disponibilidad de fósforo limitan la producción agrícola. La situación se agrava en sitios donde los fertilizantes convencionales están inaccesibles (Arcand y Schneider, 2006; Bashan, 1998; Bielecki, 1973; Cajuste, 1980; Fernández *et al.*, 2005; Kochian *et al.*, 2004; Rodríguez y Fraga, 1999). Los fenómenos de fijación y precipitación del fósforo son altamente dependientes del pH y del tipo de suelo, Cajuste (1980) afirma que incluso la temperatura afecta la disponibilidad de este elemento. En suelos ácidos el fósforo es fijado por óxidos libres e hidróxidos de aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos se precipita como sales de calcio (Rodríguez y Fraga, 1999). Aun así, la mayor parte de los suelos agrícolas contienen reservas grandes de este elemento, aunque en forma insoluble, y de ellas, una cantidad respetable es consecuencia de la aplicación regular de fertilizantes fosfatados (Rodríguez y Fraga, 1999). En las prácticas agrícolas extensivas manejan grandes cantidades de fertilizantes químicos convencionales que son costosos y tienen efectos adversos sobre los mantos acuíferos, cuerpos de agua

superficiales, ecosistemas locales e incluso regionales (Adesemoye *et al.*, 2009; Bashan, 1998). También hay información que indica que los fertilizantes convencionales tienen poca eficiencia de uso pues sólo una porción de los nutrientes aplicados son absorbidos por las plantas (Fernández *et al.*, 2005). Por citar un ejemplo, Cajuste (1980) menciona que sólo del 10 al 15 % del fósforo aplicado anualmente, es aprovechado por el cultivo, y Rodríguez y Fraga (1999) señalan que fertilizantes como el súper fosfato contienen calcio suficiente como para precipitar más de la mitad de su propio fósforo en forma de fosfato dicálcico o fosfato dicálcico dihidratado. Arzuaga *et al.* (2005), Madigan *et al.* (2006) y los autores antes citados observan que, dado que el metabolismo microbiano es capaz de liberar el fósforo atrapado en compuestos insolubles, resulta importante considerar el uso de microorganismos para aprovechar eficientemente este elemento.

En varios trabajos se han aislado y caracterizado bacterias solubilizadoras de fósforo provenientes de la rizósfera de diversas especies vegetales. Por ejemplo Fernández *et al.* (2005) estudiaron la habilidad, para solubilizar fosfatos, de diferentes grupos bacterianos y cepas de *Bradyrhizobium sp.* aisladas de suelos sojeros. Por su parte, Calvo-Vélez *et al.* (2008) evaluaron las poblaciones de microorganismos en rizósfera de papa en dos regiones alto andinas con características climáticas, edafológicas, manejo agrícola y de altitud diferentes. Concluyeron que las poblaciones microbianas en rizósfera pueden estar influenciadas por el pH, la altitud, la temperatura y el fósforo disponible. Observaron, por ejemplo, que la población de *Azotobacter spp.* se vio favorecida con la fertilización química de fósforo mientras que la de *Bacillus spp.* se vio afectada negativamente en suelos con dicha fertilización.

Los mecanismos que muchas bacterias emplean para solubilizar compuestos insolubles de fósforo son varios. El más estudiado ha sido la acidificación de la rizósfera mediante la secreción de ácidos orgánicos. La acidificación del medio permite la liberación de fosfato en condiciones alcalinas, mediante sustitución del H^+ por Ca^{2+} . Algunos de los principales ácidos orgánicos producidos por bacterias solubilizadoras son el ácido glucónico y el ácido 2-cetoglucónico, pero también se producen los ácidos láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malónico y succínico (Rodríguez y Fraga, 1999). La secreción de sustancias quelantes es otra manera en que las bacterias solubilizan el fósforo del sustrato. Hay que considerar que la capacidad para solubilizar fósforo no es excluyente de otros mecanismos de promoción de crecimiento. Una bacteria promotora de crecimiento puede serlo gracias a diferentes mecanismos por los que beneficia a su hospedero vegetal. Existen cepas que además de ser capaces de solubilizar fósforo, también producen fitohormonas, sideróforos y además, presentan antagonismo con uno o varios patógenos de plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

Objetivos

OBJETIVOS GENERALES

Seleccionar bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso con actividades *in vitro* relacionadas al estado nutricional de las plantas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Seleccionar bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso con capacidad de fijar nitrógeno y/o de solubilizar fósforo inorgánico.

Antecedentes

Existen numerosos trabajos que han examinado la habilidad promotora del crecimiento vegetal de diferentes especies bacterianas y fúngicas. Entre los géneros bacterianos podemos mencionar a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Erwinia* (Rodríguez y Fraga, 1999; Vassilev *et al.*, 2006).

Rariz Mollo *et al.* (2012) aislaron e identificaron cepas diazótrofes de las especies *Azospirillum lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus graminis* plantas de arroz sembradas en distintos suelos con y sin historia de cultivo en Uruguay.

Ibarra Sánchez (2010) logro identificar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre pertenecientes a los géneros: *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Tetrathlobacter* en sistemas agrohidrológicos de México. Por otro lado ha encontrado que los aislados obtenidos solubilizan fosfato y producen una gran cantidad de ácido indol acético (AIA).

Bergottini *et al.* (2014) aislaron doce cepas de yerba (*Ilex paraguariensis*) y evaluaron *in vitro* su potencial como PGPRs. Tres aislamientos, identificados como *Kosakonia radicincitans*, *Rhizobium pusense* y *Pseudomonas putida*, fueron seleccionados sobre la base de su Actividad de fijación de N₂ y la producción de sideróforos , y solubilización de fosfato.

Kumar *et al.* (2012) han caracterizado bacterias de los suelos del Himalaya y evaluado su efecto sobre el crecimiento y la absorción de fósforo por la mostaza

(*Brassica juncea*) bajo condiciones de invernadero. Aislaron 65 bacterias identificadas como *Acromobacter sp.*, *Tetrathiobacter sp.* y *Bacillus sp.* las cuales mostraron capacidad de crecer a amplia gama de pH, temperatura y concentraciones de sal, así como diversas actividades PGPR, tales como: la solubilización de fósforo inorgánico , producción de ácido indol acético y de sideróforos. Además *Tetrathiobacter sp.* PB-03 y *Bacillus sp.* PB-13 mostraron 50 y 70% de inhibición del fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, respectivamente.

Sang *et.al.* (2013) aislaron 576 bacterias endofíticas de las hojas, tallos y raíces de 10 cultivares de arroz en Corea e identificaron 12 de ellas como bacterias diazotróficas utilizando un conjunto de cebadores específicos del gen *nifH*. A través de análisis de secuencias de 16S rDNA, genes *nifH* fueron confirmados en las dos especies de *Penibacillus*, tres especies de *Microbacterium*, tres especies de *Bacillus*, y cuatro especies de *Klebsiella* .

Angulo *et al.* (2014) Lograron aislar bacterias rizosféricas y endófitas a partir de rizósfera y tejidos de raíz de árboles de *Eucalyptus nitens* en Concepción, Chile, con el objetivo de evaluar su capacidad de promover el crecimiento en plántulas de la misma especie en condiciones de invernadero. Los aislamientos que incrementaron el crecimiento de las plántulas fueron identificados y caracterizados por su capacidad de producir ácido indol acético (AIA), solubilizar fosfato y expresar la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Los 105 aislamientos obtenidos fueron morfológicamente diferentes y solo 15 promovieron significativamente el crecimiento de plántulas de *E. nitens*. Las rizobacterias pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*. Los aislados identificados como *A. phenanthrenivorans* 21 y *B. cereus* 113 incrementaron la emergencia de *E. nitens* a

los 12 días en un valor promedio de 3,15 veces con relación al control. *R. aquatilis* aislamiento 78 presentó la mayor producción de AIA ($97,5 \pm 2,87$ µg/ml) en presencia de triptófano y el mayor índice de solubilización de fósforo (2,4). *B. amyloliquefaciens* aislamiento 60 fue positivo para la actividad ACC desaminasa. Los resultados obtenidos indican el potencial de las rizobacterias estudiadas como promotoras de emergencia y crecimiento de plántulas de *E. nitens* y su posible uso como inoculantes, ya que presentan más de un mecanismo de acción asociado a la promoción del crecimiento.

Materiales y Métodos

Se determinó actividades *in vitro* relacionadas estado nutricional de las plantas en bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso.

Previamente el grupo de trabajo realizó la identificación de 194 aislamientos de bacterias endofíticas aisladas de árboles de paraíso (*Melia azedarach*). Los mismos fueron seleccionados de un total 406 aislamientos provenientes de muestras de raíces, ramas y hojas jóvenes de árboles sanos e infectados por fitoplasma, tomadas en los meses de enero y febrero del año 2013, y agosto y septiembre del año 2014. Las mismas se encuentran conservados en stock glicerol a -80°C.

Las actividades promotoras del crecimiento vegetal de determinaron en aislamientos seleccionados, pertenecientes a distintos géneros y especies relacionados con actividad PGPB.

Se determinó la capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo inorgánico en 37 aislamientos.

ACTIVACIÓN DE LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS

A fin de contar con aislamientos en condiciones óptimas de crecimiento, previo a determinar las actividades promotoras del crecimiento vegetal, se procedió a su purificación y activación por pasajes sucesivos (al menos tres) en medio TSA (Trypteina de Soja Agar), un medio rico en la mayoría de los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano.

FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La capacidad de fijar nitrógeno se evaluó por:

- a) crecimiento en medio NFb (Nitrogen Free broth) libre de nitrógeno (Dobereiner *et al.* 1995)
- b) presencia del gen *nifH*, el cual codifica una de las subunidades de la enzima nitrogenasa, a través de su amplificación por PCR empleando diferentes pares de cebadores degenerados.

A-Crecimiento en medio libre de nitrógeno

- Repique en medio NFb con extracto de levadura

Los aislamientos puros y activos en TSA, se repicaron en medio NFb con extracto de levadura en bajas concentraciones (0,005%), y se incubaron a 28°C durante un período máximo de 21 días, para lograr su adaptación a un medio mínimo

- Repique en medios NFb y NFb con sulfato de amonio

Una vez que los aislamientos fueron capaces de crecer en NFb con extracto de levadura, fueron repicados en NFb y NFb con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, este último fue empleado como control positivo. Se incubó a 28°C durante 21 días, revisando cada tres días la presencia de crecimiento (Fig. 3).

B-Presencia del gen *nifH*

Aquellos aislamientos capaces de crecer en medio NFb libre de nitrógeno fueron seleccionados para determinar la presencia del gen *nifH*. Se trabajó con 28 aislamientos.

- Extracción de ADN

Procedimiento: se tomaron muestras del cultivo bacteriano y se lo colocó en 200 µL de una solución de cloruro de calcio 1M, se lo centrifugo a 14.000 rpm durante 3 minutos, descartando el sobrenadante. Al pellet formado en el fondo del tubo eppendorf se le agregó 200 µL de agua ultra pura estéril, se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos descartando el sobrenadante. Finalmente, se agregó 150 µL de resina Chelex® 100 de Bio-Rad (material quelante empleado para purificar compuestos a través de intercambio iónico) se homogeneizó en vortex e incubó a 58°C durante 10 minutos. Luego, tras agitar en vortex, se volvieron incubar a 99°C durante 8 minutos. Las resinas obtenidas se conservaron a -20°C.

- Reacciones en cadena de la polimerasa para amplificar el gen *nifH*

La amplificación del gen *nifH*, se realizó empleando tres técnicas PCR diferentes:

- a) PCR utilizando los cebadores degenerados PolF/PolR (Poly *et al.*, 2001)

Los cebadores seleccionados PolF y PolR (5'TGCGAYCCSAARGCBGACTC3') y (5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA3'), respectivamente, fueron utilizados para amplificar una región de 360 pares de bases. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 15 µl. Las concentración de cada cebador fue de 0,5 mM, Las concentraciones de otros reactivos fueron: nucleótidos, 200 mM; Taq polimerasa (Invitrogen) 2 U de; MgCl₂, 0.45 µl. Las condiciones de PCR consistieron en: 5 minutos a 95 °C seguidos de 30 ciclos a 94 °C (1 min), 1 min para la etapa de

recocido y 72°C (2 min), con un 5 min extensión a 72°C para el último ciclo.

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra uno-thermoblock Thermal Cycler Pcr.

b) PCR utilizando los cebadores degenerados ZF/ZR según Zehr y Mac Reynolds.

En este caso se procedió de la misma manera que lo descrito por Poly *et al.*, 2001, utilizando otro par de cebadores, cebador directo Zf (TGYGAYCCNAARGCNGA) y el cebador inverso Zr (ADNGCCATCATYTCNCC).

c) PCR anidada empleando otros cebadores degenerados según Yeager *et al.* (2004).

La amplificación por PCR de fragmentos de genes de ADN se ha realizado mediante un protocolo anidado y cebadores degenerados diseñados para amplificar los genes *anfH* (codifica la subunidad de la dinitrogenasa reductasa alternativas que sólo contienen hierro en el sitio activo), *vnfH* (codifica la subunidad de la dinitrogenasa reductasa alternativas que contiene hierro y vanadio en el sitio activo), y *nifH* (codifica la subunidad de la dinitrogenasa reductasa con un sitio activo que contiene hierro y molibdeno) secuencias que se encuentran en la gran mayoría de los diazótrofos conocido.

El cebador directo 19F (5-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG) y el cebador inverso *nifH*3 (5-ATRTTRTTNGCNGCRTA) fueron utilizado en la primera reacción de amplificación, que contenía 40 pmol de cada cebador, 2,5 mM de MgCl₂, 10 µg de albúmina de suero bovino, 200 µM de cada uno de los nucleótidos, 2,5 U de Taq polimerasa Invitrogen, 2 µl de buffer Invitrogen 10 X y 1 a 2 µl de ADN de la

muestra en un volumen final de reacción de 20 µl. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Biometra uno-thermoblock Thermal Cycler Pcr ADN. Los parámetros para el ciclo de reacción fueron los siguientes: 95 ° C durante 5 min, seguido por 20 ciclos de 48 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 1 min, y 94 ° C durante 45 s, con una extensión final de 72 ° C durante 10 minutos antes de mantener a 17° C cuando se terminó la reacción.

Para la segunda PCR, se realizaron ligeras variaciones: utilizamos el cebador directo *nifH*11 (5-GAYCCNAARGCNGACTC) y el cebador inverso *nifH*22 (5-ADWGCCATCATYTTCRCC). Estos cebadores (40 pmol cada uno) fueron incluidos en una mezcla de reacción de 20 µl idéntica a la descrita anteriormente, excepto que contenía 2,0 mM de MgCl₂, y 1 µl de una dilución 1:10 de la primera mezcla de PCR que sirvió como la plantilla. La segunda PCR se realizó como se describió anteriormente, excepto que la temperatura de hibridación fue 55 ° C y los ciclos se repitieron 32 veces.

Los productos de las amplificaciones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1,4% y teñido con bromuro de etidio (Fig. 4).

2. SOLUBILIZACION DE FÓSFORO INORGÁNICO:

La selección de aislamientos con potencial actividad solubilizadora de fósforo se realizó mediante el método descrito por Nautiyal (1999).

Al igual que para las determinaciones de la actividad diazotrófica, se trabajó con aislamientos en condiciones óptimas de crecimiento.

- **Screening**

Primeramente se realizó un screening en placa en medio sólido NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth médium). Se inocularon 20

aislamientos por placa e incubaron a 28 °C durante 21 días. El screening fue considerado positivo cuando se observó la aparición de un halo claro alrededor de la colonia (Fig. 5).

- **Determinación semicuantitativa**

Aquellos aislamientos que resultaron positivos en el screening previo fueron repicados en el mismo medio sembrando en este caso cuatro aislamientos por placa. Se incubó a 28° durante 21 días y se calculó el índice de solubilización (IS) = diámetro del halo (mm)/diámetro de la colonia (mm), realizándose las mediciones cada tres días (Fig. 6). La capacidad de solubilización se categorizó en tres niveles: bajo (IS < 2), intermedio (IS entre 2 y 4) o alto (IS > 4). El ensayo se realizó por triplicado. Como control positivo se usó la cepa solubilizadora de fósforo *Pseudomonas* RHP3 (Mehta y Nautiyal, 2001).

Los aislamientos que presentaron IS mayor o igual a 1,4 fueron seleccionados para la determinación cuantitativa.

- **Determinación cuantitativa**

La determinación cuantitativa se realizó en frascos Peni de 50 ml de capacidad con 10 ml de caldo NBRIP. El inóculo se ajustó a una D.O._{600 nm} igual a 0,1 sembrando 200 uL del mismo en los 10 mL de caldo. Se incubó con agitación a 180 rpm a 28 °C durante 7 días (Fig. 7).

Periódicamente se midió el pH y la concentración de fosforo inorgánico en el sobrenadante del cultivo usando el método de Murphy y Riley (1962) (Fig. 8). El caldo NBRIP sin inocular se empleó como control negativo. La cepa solubilizadora de fósforo *Pseudomonas* RHP3 (Mehta and Nautiyal, 2001) se usó como control positivo. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Resultados y discusiones.

NITRÓGENO

De los 37 aislamientos analizados, 26 fueron capaces de crecer en medio NFb libre de nitrógeno.

Dentro del orden *Bacilliales*:

Bacillus arsenicus; cepa M27,

Bacillus licheniformis; cepa M46,

Bacillus megaterium; cepas M1, M3 y M58.

Bacillus pumilus; cepa A101,

Paenibacillus alvei; cepa M33

Paenibacillus ginsengagri; cepa A56,

Paenibacillus glycanilyticus, cepas A142 y M66.

En *Burkholderiales* se encuentran:

Burkholderia ambifaria; cepa M57

Burkholderia cepacia; cepa M55

Burkholderia diffusa, cepa M38

Dentro de *Enterobacteriales*:

Kosakonia cloacae, cepas A112, A114, A121 y A122,

Pantoea agglomerans, cepa A109

Serratia marcescens cepa M69.

Finalmente en *Pseudomonadales* las cepas con dicha capacidad fueron:

Pseudomonas monteilii, cepas M30, A60, A64, y A116

Pseudomonas putida, cepas A67, A137y 2A10.

De los aislamientos que lograron crecer en medio NFb libre de nitrógeno, en 23 casos se logró amplificar el gen *nifH* mediante la realización de diferentes PCRs (Tabla 1).

Con el uso de los cebadores PolF/PolR (Poly *et al.*, 2001) logramos amplificar el gen *nifH* en tres aislamientos, uno perteneciente al orden *Enterobacteriales*, *Serratia marcescens*, y dos al orden *Pseudomonadales*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas montieili*. Utilizando los cebadores degenerados ZF/ZR según Zehr y Mac Reynolds, se amplificó dicho gen en cuatro casos: un aislamiento perteneciente al orden *Bacillales*, *Bacillus megaterium*, otro al orden *Enterobacteriales*, *Pantoea agglomerans* y dos al orden *Pseudomonadales*, ambas *Pseudomonas montieili*. Finalmente gracias a la utilización de una PCR anidada empleando otros cebadores degenerados según Yeager *et al.* (2004) obtuvimos la amplificación del gen en dieciséis aislamientos, de los cuales ocho pertenecen al orden *Bacillales*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus arsenicus*, *Bacillus lechiformis*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus ginsengagri*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus glycanilyticus*; tres pertenecen al orden *Burkholderiales*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia ambifaria* y *Burkholderia sp.* ; cuatro aislamientos se encuentran dentro del orden *Enterobacteriales*, *Kosakonia cloacae*, y tres *Kosakonia cowanii*, y un aislamiento del orden *Pseudomonadales*, *Pseudomonas putida*.

FÓSFORO

La liberación de las formas insolubles y fijas de fósforo es un aspecto importante de aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo (Rodríguez y Fraga 1999). El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como inoculantes conjuntamente a una mayor disponibilidad de fósforo, aumenta el rendimiento de los cultivos (Mehta y Nautiyal, 2001). Bacterias que pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* son reportados para solubilizar los compuestos de fosfato insolubles y ayudar en el crecimiento de plantas (Frey – Klett *et al* 2005). A partir del primer screening, de 37 aislamientos, 20 fueron capaces de solubilizar fosfato mediante la formación de zonas claras en placas de agar NBRIP (Fig.5); de los cuales 10 presentaron un índice de solubilización bajo (<2), 5 medio ($2 < IS < 4$) y otras 5 alto (>4).

Como se puede observar en la Tabla 2, dentro de los aislamientos con un índice de solubilización bajo encontramos:

En el orden *Bacillales*

Paenibacillus latus; cepa M17

Paenibacillus latus; cepa M18

Paenibacillus alvei; cepa M33

En *Enterobacteriales*

Kosakonia cowanii; cepas A132, A136, 2A7y 2A8

Enterobacter cloacae; cepa A124

En *Pseudomonasales*

Pseudomonas putida; cepas A137y 2A10

Con actividad solubilizadora media:

En *Enterobacteriales*

Kosakonia cowanii, cepas A121, A114 y A122

Serratia marcescens cepa M69

En *Pseudomonadales*

Pseudomonas montieili, cepa A116

En cuanto a los aislamientos con una actividad alta, estos se encuentran distribuidos de la siguiente manera:

En *Bacillales*

Bacillus pumilus cepa A101

En *Burkholderiales*

Burkholderia diffusa cepa M38

Burkholderia cepacia cepa M55

En *Enterobacteriales*

Pantoea agglomerans cepa A109

En *Pseudomonadales*

Pseudomonas montieili cepa M30

La mayoría de los aislamientos de *Enterobacteriales* se encuentran en las categorías de solubilizadoras con un IS alto y medio; y por otra parte los pertenecientes a *Burkholderiales* se encuentra en las categorías de IS bajo y medio (Fig.1).

De acuerdo con la actividad de solubilización durante el crecimiento bacteriano, las bacterias solubilizadoras de fósforo, puede clasificarse como:

- * Temprana solubilizantes, que muestran actividad solubilizadora significativa durante las primeras horas de cultivo y máxima dentro de las primeras 72 hs de crecimiento.

- * Solubilizantes intermedias, que muestran su máxima actividad entre las 72 y 96 hs de cultivo.

- * Solubilizantes tardías, que muestra una baja actividad durante las primeras 72 hs, alcanzando la máxima actividad entre el quinto y el séptimo día.

Al evaluar cuantitativamente la actividad solubilizadora de P. Dos cepas mostraron actividad solubilizadora por encima de $4000 \mu\text{gP.mL}^{-1}$, (*Burkholderia cepacia* M55 y *Kosakonia cowanii* A132). Superior a la de la cepa de referencia RHP3; a su vez se comportan como tempranas solubilizantes. Doce cepas se ubicaron en el rango de los $1000 \mu\text{gP.mL}^{-1}$, similar a RHP3. Seis cepas fueron menos activas, con la actividad máxima entre 800 y $700 \mu\text{gP.mL}^{-1}$ (Fig. 2).

Todas las bacterias solubilizadoras de fósforo disminuyeron el pH del medio. Los valores de pH más bajos se obtuvieron durante la fase de crecimiento, donde se desarrolló la solubilización del fósforo. La alcalinización del medio se produjo junto con la disminución de P soluble en el sobrenadante (Tabla 3).

La estimulación del sistema radicular, la capacidad de solubilizar P inorgánico, y el aumento en el contenido de N en hoja podría ser una característica importante para mejorar el crecimiento de plantas en suelos con disponibilidad limitada de P. La deficiencia en nitrógeno y fósforo durante el crecimiento de la planta restringe el desarrollo del área foliar y en consecuencia la reducción de la tasa de fotosíntesis

(Reich *et al.* 2009). Condiciones deficientes en fósforo pueden afectar a varios procesos en el vegetal (Rao y Terry 1995; Plaxton 1998; Campbell y Sage 2006), incluyendo la partición de N (Warren *et al.* 2005), y por lo tanto, existe un efecto interactivo entre N y disponibilidad de P (Whitehead *et al.*, 2005). Collavino *et al.* (2010) demuestran el efecto beneficioso de inoculación bacteriana sobre la tasa de fotosíntesis de las plantas creciendo en presencia de formas insolubles P, que podría ser explicada en parte por una mejor relación N/P en hoja y una mejora en la conductancia estomática.

Por otro lado Angulo *et al.* (2014) demostraron que bacterias rizosféricas y endófitas de *Eucalyptus nitens* estimulan la emergencia y el crecimiento de plántulas de esta especie en condiciones de invernadero. Los incrementos de biomasa encontrados en dicho trabajo fueron en promedio de 89 % y 98 % para la parte aérea y las raíces, respectivamente. Puente *et al.* (2010) registraron incrementos de 86 % y 54 % en las variables mencionadas, respectivamente, al tratar plántulas de *Eucalyptus globulus* con *Azospirillum brasilense*, mientras que Mohamad *et al.* (1998) obtuvieron un incremento de la biomasa del 44 % en plántulas de *Eucalyptus calmadulensis* inoculadas con *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium*. Estos resultados permiten predecir el potencial de estas bacterias para ser utilizadas como estimuladores de crecimiento de *E. nitens* en vivero y, de esta manera, favorecer la posterior supervivencia tras su establecimiento en el terreno.

Por nuestra parte, en este trabajo hemos encontrado que el 70% de las cepas estudiadas son capaces de crecer en medio libre de nitrógeno, en el 82% de las mismas se logró amplificar el gen *nifH*. Los órdenes que presentaron mayor frecuencia

de representantes con actividad fijadora de nitrógeno fueron *Pseudomonadales* (7 de 8 aislamientos) y *Burkholderiales* (3 de 3 aislamientos).

El 54% de los aislamientos presentaron actividad solubilizadora de fosfato. Las mayores frecuencias de aislamientos capaces de solubilizar fósforo inorgánico se observaron en los órdenes *Enterobacteriales* (10 de 11 aislamientos) y *Burkholderiales* (2 de 3 aislamientos) mientras que *Bacillales* presentó la frecuencia más baja (4 de 14 aislamientos).

Se ha hallado que las bacterias pueden presentar más de un mecanismo de acción asociado a la promoción del crecimiento en plantas (Angulo *et. al.* 2014), en nuestro caso el 35% de las cepas evidenciaron ambas propiedades, destacándose en ambos casos el orden *Burkholderiales*, el cual presentó frecuencias altas en ambas determinaciones.

Conclusiones

La población endofítica de paraíso presenta componentes con buena eficiencia en las actividades de solubilización de P o fijación de nitrógeno, las cuales pueden tener un alto potencial PGPR.

Tablas

Tabla 1: Resultados de las diferentes PCRs realizadas a cada uno de los aislamientos estudiados. (+) Positivo, (-) Negativo, (ND) No Determinado.

Aislamiento	Orden	Género	Especie	Poly	Zher	Yeager
A44	Bacillales	Bacillus	amyloliquefaciens,	-	-	+
A56	Bacillales	Paenibacillus	ginsengagri	-	-	+
A101	Bacillales	Bacillus	pumilus	-	-	+
M3	Bacillales	Bacillus	megaterium,	-	+	ND
M27	Bacillales	Bacillus	arsenicus	-	-	+
M33	Bacillales	Paenibacillus	alvei	-	-	+
M46	Bacillales	Bacillus	licheniformis	-	-	+
M58	Bacillales	Bacillus	megaterium	-	-	+
M66	Bacillales	Paenibacillus	glycanilyticus	-	-	+
M38	Burkholderiales	Burkholderia	sp	-	-	+
M55	Burkholderiales	Burkholderia	cepacia,	-	-	+
M57	Burkholderiales	Burkholderia	ambifaria	-	-	+
A60	Enterobacteriales	Pantoea	agglomerans	-	+	ND
A112	Enterobacteriales	Kosakonia	cloacae	-	-	+
A114	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	-	-	+
A121	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	-	-	+
A122	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	-	-	+
M69	Enterobacteriales	Serratia	marcescens	+	-	ND
A67	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida	-	-	+
A109	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii,	-	+	ND
A116	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii,	+	-	ND
A137	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida,	+	-	ND
M30	Pseudomonadales	Pseudomonas,	monteilii,	-	+	ND

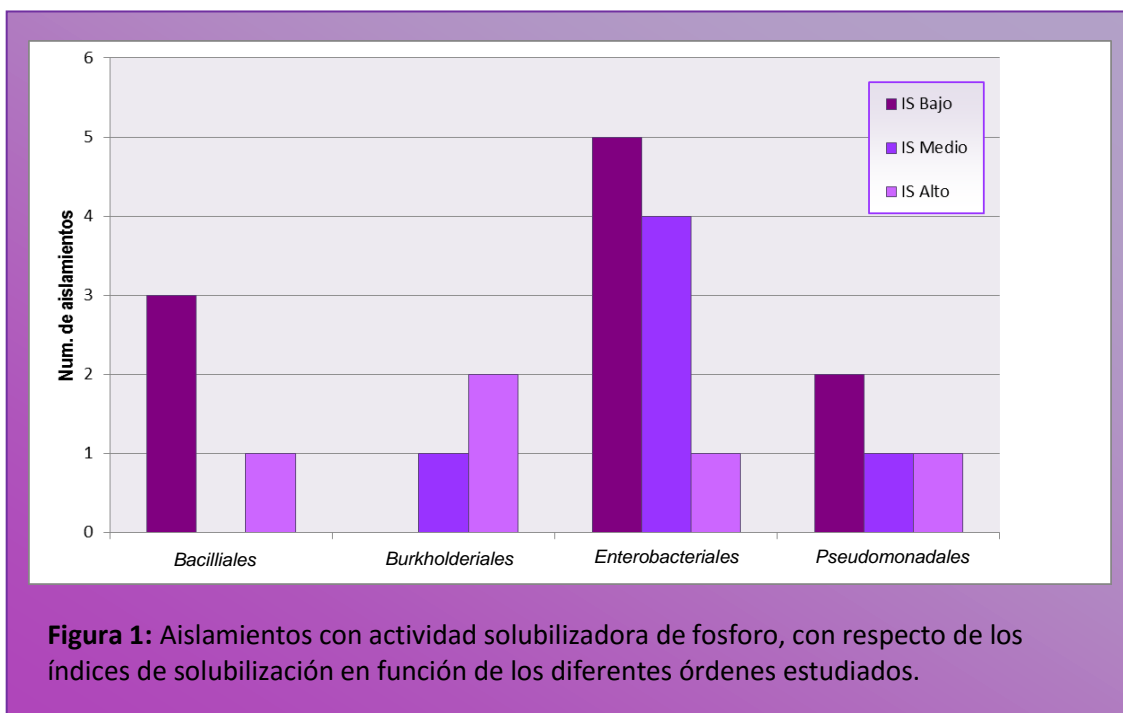
Tabla 2: Índices de solubilización de los diferentes aislamientos estudiados, agrupados por orden, género y especie

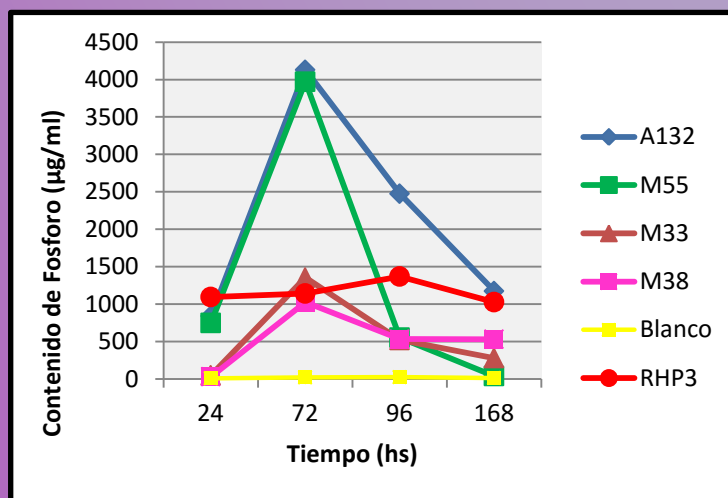
Aislamiento	Orden	Género	Especie	IS
A101	Bacillales	Bacillus	pumilus	4.00
M17	Bacillales	Paenibacillus	lautus	1.27
M18	Bacillales	Paenibacillus	lautus	1.19
M33	Bacillales	Paenibacillus	alvei	1.48
M38	Burkholderiales	Burkholderia	diffusa	8.67
M55	Burkholderiales	Burkholderia	cepacia	16.67
A136	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	1.92
2A7	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	1.47
2A8	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	1.61
A109	Enterobacteriales	Pantoea	agglomerans	4.00
A114	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	3.00
A121	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	3.00
A 122	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	2.67
A124	Enterobacteriales	Enterobacter	cloacae	1.43
A132	Enterobacteriales	Kosakonia, Enterobacter	cowanii	1.95
M69	Enterobacteriales	Serratia	marcescens	2.13
2A10	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida	1.75
A116	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii	2.67
A137	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida	1.59
M30	Pseudomonadales	Pseudomonas,	monteilii	8.33

Tabla 3: Medidas de pH de los diferentes aislamientos en medio NBRIP líquido a las 24, 72, 96 y 168 horas de cultivo.

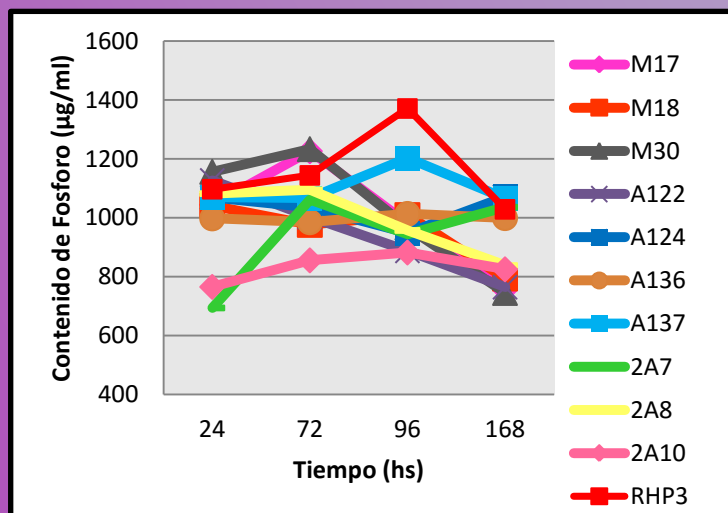
Aislamiento	Orden	Género	Especie	Medidas de pH			
				24hs	72hs	96hs	168hs
M17	Bacillales	Paenibacillus	lautus	4.18	5.05	5.34	5.25
M18	Bacillales	Paenibacillus	lautus	4.11	4.75	5.27	5.23
M33	Bacillales	Paenibacillus	alvei	5.22	5.15	5.46	5.22
A101	Bacillales	Bacillus	pumilus	4.59	4.42	4.47	4.52
M38	Burkholderiales	Burkholderia	diffusa	5.57	5.34	4.91	5.22
M55	Burkholderiales	Burkholderia	cepacia	4.81	4.69	5.72	6.55
M69	Enterobacteriales	Serratia	marcescens	4.35	4.11	4.46	4.81
A109	Enterobacteriales	Pantoea	agglomerans	4.79	4.45	4.41	4.67
A114	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.74	4.56	4.64	4.51
A121	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.46	4.47	4.44	4.24
A122	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.15	4.98	5.01	5.33
A124	Enterobacteriales	Enterobacter	cloacae	4.15	5.07	5.07	5.48
A132	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	3.99	4.53	5.23	5.59
A136	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.21	5.18	5.45	5.40
2A7	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.40	5.42	5.46	5.80
2A8	Enterobacteriales	Kosakonia	cowanii	4.20	5.00	5.38	5.35
M30	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii	3.93	4.80	5.47	5.82
A60	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii	3.96	3.93	4.07	4.36
A116	Pseudomonadales	Pseudomonas	monteilii	4.24	4.35	4.51	4.38
A137	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida	4.23	5.15	5.34	5.38
2A10	Pseudomonadales	Pseudomonas	putida	4.11	4.17	4.48	4.76

Figuras

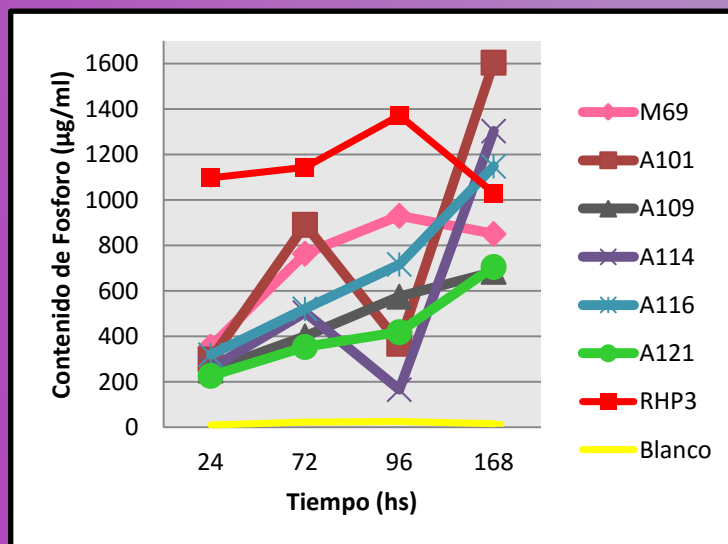




A



B



C

Figura 2: Actividad solubilizadora de fosfatos de **A-** solubilizantes tempranas, **B-** solubilizantes intermedias y **C-** solubilizantes tardías, en relación al crecimiento bacteriano durante las 24, 72, 96, 168 horas de cultivo, en medio NBRIP a 28°C.

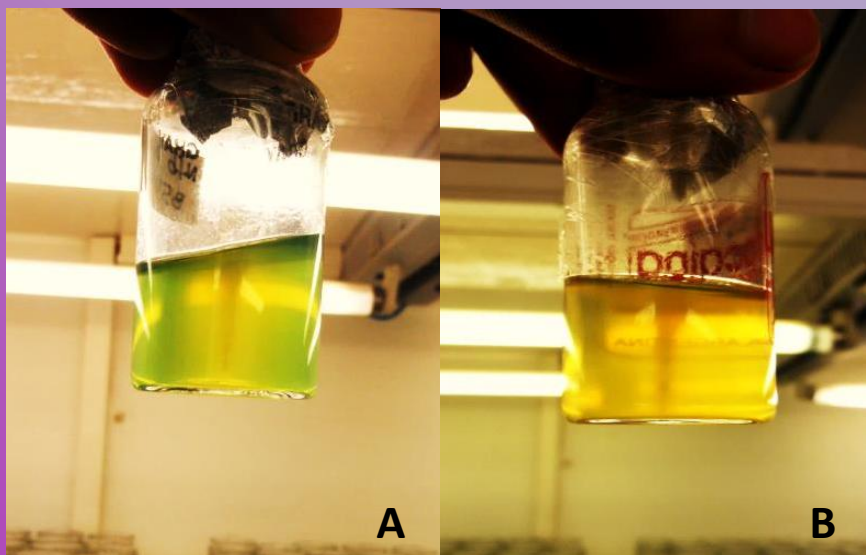


Figura 3: Ensayo de crecimiento de los distintos aislamientos en **A-** Medio NFb libre de nitrógeno y **B-** Medio NFb con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

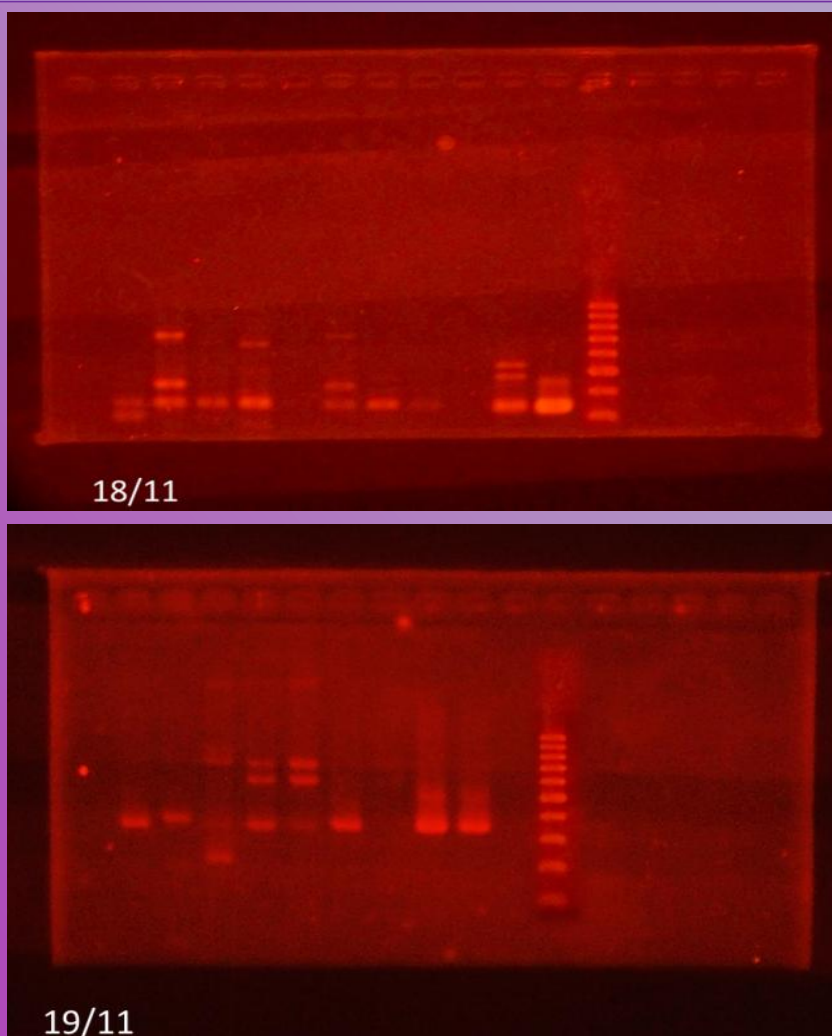


Figura 4: Productos de la amplificación del gen *nifH* mediante una PCR anidada empleando cebadores degenerados según Yeager *et al.* (2004), sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,4%.



Figura 5: Primer screening. Formación de zonas claras en placas de NBRIP por los aislamientos capaces de solubilizar fosfatos.

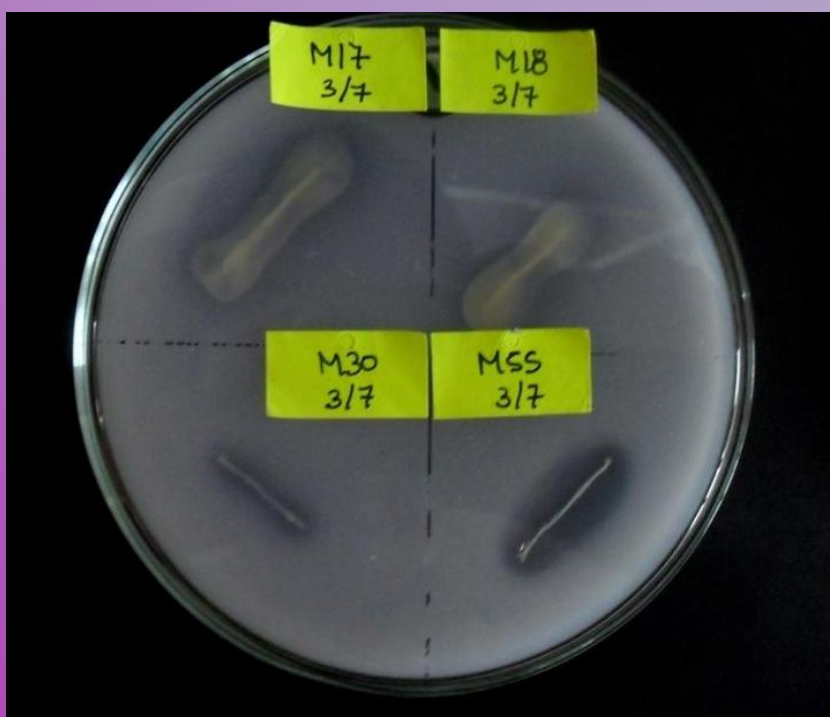


Figura 6: Determinación de los Índices de solubilización (IS) de los diferentes aislamientos analizados.



Figura 7: Determinación cuantitativa en frascos Peni de 50 ml de capacidad con 10 ml de caldo NBRIP. El inóculo se ajustó a una D.O.600 nm igual a 0,1 sembrando 200 ul del mismo en los 10 ml de caldo.



Figura 8: Determinación cuantitativa de fosfatos en medio líquido según Murphy y Riley (1962)

Bibliografía

- Adesemoye, A., Torbert, H. y Kloepper, J. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58:921-929.
- Aldaghi, M, Massart, S, Druart, P, Bertaccini, A, Jijakli, MH, Lepoivre, P. 2008. Preliminary evaluation of antimicrobial activity of some chemicals on in vitro apple shoots infected by 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 73: 335-341.
- Angulo VC, Sanfuentesa EA., Rodríguez F, Sossa KE. 2014. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev Argent Microbiol.* 46(4):338-347.
- Arcand, M. y Schneider, K. 2006. Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais de Academia Brasileira de Ciencias.* 78:791-807.
- Arneodo, J. D; Marini, D. C.; Galdeano, E.; Meneguzzi, N.; Bacci Jr, M.; Domecq, C.; Nome, S. F.; y Conci, L. 2007. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting China-tree in Argentina. *Journal of Phytopathology* 155: 70-75.
- Arzuaga, S., Fernandez Lopez, C., Dalurzo, H., y Vazquez, S. 2005. Fosforo total, fosforo organico y fosfatasa acida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas.*
- Baldessari M, Trona F, Angeli G, Ioriatti C. 2010. Effectiveness of five insecticides for the control of adults and young stages of *Cacopsylla melanoneura* (Förster) (Hemiptera: Psyllidae) in a semi-field trial. *Pest Management Science* 66: 308-312.
- Banger MC, Thomashow LS. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol Plant-Microbe Interaction* 9: 83-90.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances.* 16:729-770.
- Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol Ecol* 14:2637-2643.
- Bergottini VM, Otegui MB, Sosa DA, Zapata PD, Mulot M, Rebold M, Zopfi J, Wiss F, Benrey, Pilar Junier. 2015. Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St.Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biol Fertil Soils.* 51:749-755.

- Bielecki, R. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:225-252.
- Blumer C, Haas D. 2000. Mechanism, regulation and ecological role of bacterial *cyanide biosynthesis*. *Arch Microbiol* 173: 170-177.
- Cajuste, L. 1980. Química de suelos con enfoque Agrícola. Ed. Por C.D. *Postgraduados. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos*.
- Calvo-Velez, P., Reymundo-Meneses, L. y Zuñiga-Davila, D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 7(1,2): 141-148.
- Chalak L, Elbitar A, Rizk R, Choueiri E , Salar P y Bové J M 2005. Attempts to eliminate Candidatus Phytoplasma phoenicium from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy. *European Journal of Plant Pathology* 112:85-89.
- Chapin FS, Jefferies RL, Reynolds JF, Shaver GR, Svoboda J. 1992. Arctic plant physiological ecology: a challenge for the future. In: Chapin FS, Jefferies RL, Reynolds JF, Shaver GR. (Eds.) *Arctic Ecosystems in a Changing Climate: An Ecophysiological Perspective*. Academic Press, San Diego pp 3-8.
- Deslippe RJ, Egger NK. 2006. Molecular diversity of nifH genes from bacteria associated with high arctic Dwarf Shrubs. *Microbial Ecol* 51:516-525.
- Dobereiner J., Urquiaga S, Boddey RM. 1995. Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. *Fertilizer Research* 42: 339-346.
- Fernandez, L., Zalba, P., Gomez, M. y Sagardoy, A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *CI. Suelo (Argentina)*. 23(1):31-37.
- Ferrera CR, Pérez MJ. 1995. Agromicrobiología útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Estado de México
- Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol* 96: 928-936.
- Galdeano E, Torres LE, Meneguzzi N, Guzmán F, Gómez GG, Docampo DM, Conci L 2004. Molecular characterization of 16S ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasmas affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. *Journal of Phytopathology* 152:174-181.
- Glick B, Penrose DM, Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* 190: 63-68.

- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117
- Harrison NA, Boa E y Carpio ML. 2003. Characterization of phytoplasmas detected in Chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. *Plant Pathology* 52:147-157.
- Ibarra Sanchez CL. 2010. Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Tesis de Maestría en Ciencias. México.
- Izquierdo JA, Nusslein K. 2006. Distribution of extensive nifH gene diversity across physical soil microenvironments. *Microb Ecol* 51:441-452.
- Kamińska M, Śliwa H. 2003. Effect of Antibiotics on the Symptoms of Stunting Disease of *Magnolia liliiflora* Plants. *J. Phytopathology* 151: 59–63.
- Kochian, L., Hoekenga, O. y Piñeros, M. 2004. How do crop plants tolerate acid soils?: Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:459-93.
- Koh RH, Song HG. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J Microbiol Biotechnol* 17:1805-1810.
- Kumar V, Singh P, Jorquera MA., Sangwan P, Kumar P, Verma AK, Agrawal S. 2013. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J Microbiol Biotechnol.* 29:1361–1369.
- Lambert B, Joos H. 1989. Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends Biotechnol* 7: 215-219.
- Leangvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1098-1101
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung H, Yang J, Sundaram S, Tongmin SA. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 315-324.
- Madigan, M., John, M. y Jack, P. 2006. *Biología de los Microorganismos*. 10º ed. Pearson Prentice Hall. Mexico.
- Mehta S, Nautiyal CS (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr Microbiol* 43:51–56

- Mohammad G, Prasad R. Influence of microbial fertilizers on biomass accumulation in poly-potted *Eucalyptus calmadulensis*. J Trop For. 1998; 4:74-7.
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal Chim Acta 27:31–36
- Nautiyal C (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett 170:265–270 O'Sullivan DJ, O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews 56: 662-676.
- Nusslein K, Tiedje JM. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. Appl Environ Microbiol 65: 3622-3626.
- Poly f, Ranjard I, Nazaret s, Gourbière f, Jocteur Monrozier L., 2001. Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties. Applied and environmental microbiology. 67:2255-2262.
- Puente ML, García JE, Pathauer P, Peticari A. Inoculation with *Azospirillum brasilense* is a useful tool in *Eucalyptus globulus* management. Amer-Eurasian J Agri Environm Sci. 2010; 8:124-30.
- Raaimaker, D., Boot, R., Dijkstra, P., Pot, S. y Pons, T. 1995. Photosynthetic rates in relation to leaf phosphorus in pioneer versus climax tropical rainforest trees. En: Oecologia. 102:120-125.
- Rariz Mollo G, Ferrando L, Fernandez Scavino A. 2012. Isolation of nitrogen-fixing endophytic bacteria in rice plants grown in different soils. Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM. La Plata, Argentina.
- Rey LA. 1986. Posible enfermedad causa problemas en forestaciones de Paraíso (*Melia azedarach* L.) en la zona del Alto Paraná Misionero (Rep. Argentina). Comunicación. Escuela Agrotécnica Eldorado. Universidad Nacional de Misiones.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17:319-339.
- Sang Hye Jia, Mayank Anand Gururanib, Se-Chul Chuna. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological Research. 169: 83– 98.
- Schulz B, Boyle C. 2006. What are endophytes? In: Microbial root endophytes. B Schulz, C Boyle, TN Sieber (eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 1-13.
- Vázquez A, Ducasse DA, Nome SF y Muñoz JO 1983. Declinamiento del paraíso (*Melia azedarach* L.), síntomas y estudios etiológicos de esta nueva enfermedad. R.I.A. INTA XVIII: 309-320.

- Villadas PJ, López FM, Saad RH, Toro N. 2006. Rhizosphere-bacterial community in *Eperua falcata* (Caesalpiniaceae) a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana Rainforest. *Microbial Ecol* 53:317-327.
- Vyas P, Gulati A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol* 9:174.
- Wang QC, Panis B, Engelmann F, Lambardi M, Valkonen JPT. 2009. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154: 351-363.
- Weintraub PG, Pivonia S, Gera A. 2008. Physical control of leafhoppers. *J Econ Entomol* 101: 1337-1340.
- Yeager CM., Kornosky JL., Housman DC., Grote EE., Belnap J., and Kuske CR. (2004). Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. *Appl Environ Microbiol* 70: 973–983.
- Zhang L, Hurek T., Reinhold H. 2007. A nifH-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-Fixing microorganisms. *Microbial ecol* 53: 456-470.
- Zehr J, Jenkins BD, Short, SM, Steward, GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5:539-554.