



# Universidad Nacional del Nordeste

## Facultad de Ciencias Agrarias

### Trabajo Final de Graduación:

#### Modalidad Tesina

“Inoculación de Algarrobo (*Prosopis alba* Grisebach) con rizobios aislados a partir de plantas trampa de Caupí (*Vigna unguiculata*)”

Alumna: MALVAREZ, Romina Alejandra.

Directora: Ing. Agr. (Mgter) María Cándida IGLESIAS.

Tribunal:

Ing. Agr. (Dra.) Claudia Verónica LUNA.

Ing. Agr. Alfonzo D. LOVATO ECHEVERRÍA.

Bioq. (Dra.) Marina Cecilia CARDOZO.

Lugar: Cátedra de Microbiología Agrícola.

Año: 2017

Resolución: 8.856-CD

# ÍNDICE

PÁG.

CARÁTULA	1
ÍNDICE	2 - 3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	6 - 8
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10 - 15
RESULTADOS	16 - 18
DISCUSIONES	19
CONCLUSIÓN	20
TABLAS Y FIGURAS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21 - 31
<b>I.: ETAPA 1: PRELIMINAR</b>	20 - 21
• I.A. <u>Aislamiento desde un nódulo</u>	
• I.B. <u>Técnica de Tinción de Gram</u>	
<b>II.: ETAPA 2: MANTENIMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPIQUE DE RIZOBIOS</b>	21 - 26
• II.A. <u>Mantenimiento</u>	
• II.B. <u>Preparación de Material de Inoculación</u>	
<b>II.B.1. Repique en Medio sólido</b>	
<b>II.B.2. Multiplicación en Medio líquido</b>	
• II.C. <u>Caracterización de colonias y Análisis de frecuencias</u>	
• II.D.: <u>Resumen del análisis de frecuencias</u>	
<b>III.: ETAPA 3: PREPARACIÓN DEL ENSAYO</b>	26 - 29
• III.A. <u>Preparación del Material Vegetal</u>	
III.A.1. <u>Procedencia de las semillas</u>	
III.A.2. <u>Determinación del Poder Germinativo</u>	
• III.B. <u>Preparación del Material Inoculante</u>	

- **III.C. Preparación de Solución Nutritiva**
- **III.D. Preparado de bandejas forestales**
- III.D.1. Sustrato**
- **III.F. Diseño Experimental**

IV.: **ETAPA 4: ENSAYO** \_\_\_\_\_ 29 - 31

- **IV.A. Siembra y Establecimiento de las plantas**

- **IV.B. Actividades**

- **IV.C. Registro de datos y controles**

- **IV.D. Evaluación final**

**IV.D.1. Resultado del ensayo**

**IV.D.2. Determinación de nitritos y nitratos en el sustrato**

**IV.D.3. Análisis estadísticos**

RESULTADOS Y DISCUSIONES \_\_\_\_\_ 32 - 37

- 1) **Altura de planta** \_\_\_\_\_ 32
- 2) **Altura de tallo** \_\_\_\_\_ 33
- 3) a. **Nº Total de hojas** \_\_\_\_\_ 34
- 3) b. **Uniformidad entre tratamientos para Nro. de Hojas** \_\_\_\_\_ 35
- 4) **Nº de hojas caídas** \_\_\_\_\_ 35
- 5) **Peso seco** \_\_\_\_\_ 36
- 6) **Relación Atura/Peso seco** \_\_\_\_\_ 36
- 7) **Relaciones entre las distintas variables evaluadas** \_\_\_\_\_ 37

BIBLIOGRAFÍA \_\_\_\_\_ 37 - 38

ANEXOS \_\_\_\_\_ 41 - 52

## AGRADECIMIENTOS

A la Cátedra de Microbiología agrícola, que me formó académicamente a la par de los cursos y exámenes en la facultad desde hace cinco años. A las profesionales de la cátedra que me enseñaron y educaron con buena base para la investigación, y en especial a mi directora y referente: la Ingeniera agrónoma Ma. Cándida Iglesias, quien supo guiarme y ayudarme en cada paso previo, mediante y post de este trabajo. Gracias a ellas y a mis compañeros de "Micro" por el apoyo profesional, docente y principalmente el de confianza y gusto por trabajar allí.

A mi familia... a mi mamá, por darme las fuerzas necesarias para cada nueva meta propuesta; a papá, por indicarme el camino de la Ingeniería y no dudar de mis capacidades; a mis hermanas, por el apoyo incondicional desde el primer momento; a mi abuela, por el año más exigente en horas académicas, el de la convivencia y mimos que ayudaron a llevarlo adelante. A mi novio, por estar siempre acompañando, ayudando, enseñando y festejando cada nuevo logro. Gracias a ellos por estar a pesar de las distancias que exige esta carrera y por brindarme el mismo cariño que tanto les tengo.

Gracias a la universidad por darme la oportunidad de cursar libremente, por darme la posibilidad de elegir qué materias cursar y/o rendir según las presiones y exigencias de cada momento. Por brindarme al azar esos compañeros inolvidables y esos que hoy son grandes amigos con los que siento poder contar por el resto de esta etapa y el de la vida misma.

Por último, gracias a esos profesores fanáticos de la educación y apasionados por la agronomía, que dejaron una marca que pienso inculcar el día de mañana, cuando me toque brindar conocimientos a algún joven estudiante de esta hermosa carrera.

## RESUMEN

Los algarrobos poseen capacidad para asociarse con bacterias del género *Rhizobium*, teniendo estos un rango de plantas huéspedes que puede diferir de uno a otro; particularmente los rizobios aislados de *Vigna unguiculata*, que son capaces de nodular a todas las legumbres. El objetivo del trabajo fue determinar el nivel de infección en plantas de Algarrobo blanco, al inocularlas con aislamientos provenientes de plantas de Caupí. Se obtuvieron 13 aislamientos en medio EMA a partir de nódulos de *Vigna unguiculata* utilizadas como planta trampa; los mismos fueron caracterizados mediante tinción de Gram y otros caracteres. Para el ensayo de Algarrobo blanco, se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con 3 repeticiones, se aplicaron 13 tratamientos correspondientes a cada uno de los aislamientos y un testigo sin inocular. Se realizaron dos inoculaciones previo crecimiento de los aislamientos en medio líquido, a la siembra y a los 20 días después. Se registraron datos de Altura de tallo, Nº de hojas desarrolladas, Nº de hojas caídas semanalmente, Altura final y Presencia de nódulos. El análisis estadístico utilizado fue ANAVA y comparación de medias por Duncan al nivel de significación del 0,05. Desde los 60 y hasta los 115 días después de la siembra no hubo presencia de nódulos. Sin embargo, a los aislamientos se los destaca como microorganismos PGPR, pues un porcentaje de ellos mostró un potencial de crecimiento y desarrollo en planta como también en crecimiento rápido en medios de cultivo sólido y líquido. Esto, indicaría su uso futuro como material PGPR.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El género *Prosopis* como leguminosas tienen la capacidad de fijar nitrógeno del aire en simbiosis con bacterias. Pueden aportar de 100 a 400 kg.ha<sup>-1</sup>.año<sup>-1</sup> de nitrógeno, cantidad que puede cubrir las necesidades de un cultivo o pastura (Ringuelet, 2005). En particular, los algarrobos, poseen la capacidad de asociarse con bacterias del género *Rhizobium*. Gracias a ellas, hay grandes aportes de nitrógeno, de allí que se usan a las plantas de algarrobo como restauradoras de suelos degradados (Coyne, 1999 y Carpeta et al., 2006). Hoy se cita a los géneros *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Ensifer* como capaces de infectar a especies del género *Prosopis* (Bellone et al., 2006).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno son bacterias y cianobacterias, de vida libre en el suelo, eventualmente asociados a una planta, o viviendo en simbiosis con ella. Se ha reconocido que las subfamilias Papilionáceas, Mimosáceas y Cesalpináceas poseen la propiedad de aprovechar el nitrógeno mediante la fijación biológica. Las Papilionáceas son las que presentan mayor número de especies formadoras de nódulos entre un 80 – 90%, las Mimosáceas un 25% y las Cesalpináceas sólo unas pocas. Entre las tres subfamilias agrupan 12.000 especies con capacidad fijadora de nitrógeno (Paredes, 2013).

Algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otras y hay muchos problemas con este acercamiento, incluso el hecho de que existen cerca de 18.000 especies de legumbres e incontables tipos de rizobios. La “especificidad del anfitrión” de las bacterias y plantas prácticamente ha desaparecido, y un ejemplo es el caso particular de los rizobios aislados de *Vigna (V.) unguiculata*, en que la mayoría es capaz de nodular a todas las legumbres (Cuadrado et al., 2009).

Los rizobios son microorganismos capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en las raíces de las plantas de la familia Leguminosae (y en sólo otra no leguminosa, *Parasponia*). Algunos rizobios también son capaces de inducir nódulos en el tallo (*Sesbania*, *Aeschynomene*). Los rizobios se encuentran dentro del orden Eubacteriales y la familia Rhizobiaceae. Son bacilos de 0,5 a 0,9 nm de ancho y 1,2 a 3,0 nm de longitud, son bacterias Gram negativas y no esporulan. Son móviles debido a flagelos perítricos o a un flagelo polar o subpolar (Paredes, 2013). También son anaerobias facultativas y quimioheterótrofas. Subsisten en el suelo como heterótrofas saprófitas cuando no están infectando a su huésped. Dependiendo de la estación, el historial del cultivo y las prácticas agrícolas, pueden haber entre 1.10<sup>6</sup> rizobios por gramo de suelo (Coyne, 1999; Frioni 1999; Bellone y Carrizo de Bellone, 2006).

En sentido amplio, se divide a los rizobios en dos grandes grupos: *Rhizobium*: cepas de crecimiento rápido (tiempo de generación: de 2 a 4 horas), con varios flagelos, acidificantes en diferentes medios. Estos rizobios generan nodulación en leguminosas de zonas templadas; y *Bradyrhizobium*: cepas de crecimiento lento (tiempo de generación mayor a 6 horas), con un solo flagelo, alcalinizante de diversos medios. A esta clasificación se le agregó el género *Azorhizobium*, cepa capaz de formar nódulos en tallos y raíces. Fijan y asimilan nitrógeno atmosférico en cultivos puros (Paredes, 2013). Sin embargo este autor, considera que son bacterias de crecimiento rápido cuando desarrollan colonias de 1 a 5 mm de tamaño en un periodo de tiempo de 3 a 5 días a una temperatura de 25º a 28ºC. en un medio de agar con extracto de levadura y manitol, y de crecimiento lento cuando para el periodo de tiempo indicado, la colonia, no supera un milímetro de tamaño.

Estudios revelan que leguminosas arbóreas son infectadas mayormente por rizobios de crecimiento rápido más que por los de crecimiento lento. Antes se pensaba que sólo los *Bradyrhizobium* de crecimiento lento lo hacían (Zhang et al., 1991). Aislamientos de estos microorganismos en muestras superficiales de suelo presentaban ambos grupos de rizobios, donde los de crecimiento rápido, tuvieron mayor eficiencia de fijación de Nitrógeno. Los organismos de crecimiento lento son favorecidos cuando los recursos disponibles son constantes y abundantes, y los de crecimiento rápido, cuando la disponibilidad de recursos no es constante o en zonas donde se presentan adversidades climáticas de sequía y temperaturas extremas (Frioni, 1999).

Actualmente la taxonomía de los rizobios se desarrolla rápidamente y durante los últimos 20 años se han descrito muchas especies y géneros nuevos. La aplicación de los métodos de biología molecular en la taxonomía ha ayudado a definir los nuevos rizobios. La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable (Arzolay, 2017).

Felker y Clarl (1981) han encontrado nódulos en 13 especies del género *Prosopis* entre ellas *Prosopis alba*, *Prosopis nigra* y *Posopis chilensis*, y han determinado que la fijación puede ocurrir aun cuando la temperatura sea de 45°C. Diversos factores pueden afectar la simbiosis impidiendo la aparición de nódulos y como consecuencia de ello la leguminosa puede morir, salvo que el suelo sea muy rico en derivados nitrogenados (Huáman Medrano, 2014).

Esta leguminosa como cultivo se nutre del nitrógeno aportado por la FBN y del disponible en el suelo. La FBN puede aportar entre 25 y 90% del nitrógeno necesario para el desarrollo del cultivo, pero esto sólo puede concretarse cuando los factores ambientales no son limitantes (González et al., 1997; Perticari et al., 2003; Perticari, 2005).

En muchos suelos el nivel y la eficiencia de las cepas nativas pueden no ser los adecuados y la nodulación y la fijación del N<sub>2</sub> resultar insuficientes para satisfacer las necesidades de demanda del cultivo (Frioni, 2006). Más del 60% del Nitrógeno que se incorpora al suelo y aguas cada año, provendría de la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (Delwiche, 1981; Postgate, 1982; Zehr et al., 1996).

La FBN es el mecanismo principal de aporte de nitrógeno en los ecosistemas naturales y es muy importante en la agricultura del trópico (Marschner, 1995). En los sistemas agrícolas, la fijación simbiótica por leguminosas noduladas ha sido considerada como la de mayor significación, pero en el caso de las gramíneas se ha demostrado que puede alcanzar niveles comparables, e incluso superiores al de muchas asociaciones leguminosa-rizobio. En algunos cultivos de gramíneas forrajeras y de caña de azúcar, la FBN puede contribuir con más del 50% a las necesidades del cultivo (Bellone, 1999).

Desde muy antiguamente se practica la inoculación artificial de las semillas o del suelo en donde se van a introducir las leguminosas. Ésta técnica resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son huéspedes de alta especificidad (*Trifolium*, *Medicago*, *Glycine*), cuando la población nativa es ineficiente o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal (Frioni, 2006).

Las investigaciones sobre la FBN han producido un gran número de trabajos con participación de biólogos, bioquímicos y genetistas que han participado en un gran número de actividades científicas, industriales académicas y de gobierno. Desde la década de los '90 el impacto social de la FBN está tomando importancia, porque los agricultores utilizan las investigaciones de los científicos para beneficio de la sociedad en general. Análisis previos de los impactos de la tecnología agrícola han focalizado exclusivamente a los productores, aunque en países desarrollados los consumidores han sido los principales beneficiarios a través de los reducidos costos de los alimentos. Numerosos factores determinan los beneficios de la FBN a los productores, que incluyen regulaciones a niveles locales, regionales y nacionales, accesos a mercados y tecnología, infraestructura regional, comunal y valores culturales. Todos los factores que participan en este proceso requieren educación para el productor y la comunidad (Döbereiner et al., 1993).

La FBN representa una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. También desempeña un papel muy importante en la economía del Nitrógeno en la práctica agrícola, porque la cantidad de este elemento en la mayoría de los suelos cultivados, es bajo. En la actualidad esta cantidad de nitrógeno no puede ser suplementada a escala mundial por la producción de fertilizantes (Postgate, 1982).

La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de la producción agrícola, cuidar el ambiente y por ende lograr un desarrollo sostenible obliga a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que

tienen las bacterias que nodulan en las raíces de las leguminosas y en especial de las que se consideran no especializadas o promiscuas, de suerte, que puedan utilizarse para inducir nodulación y fijar nitrógeno en otras leguminosas que pueden ser de mayor efectividad (que el Caupí, por ejemplo) y que se cultiven en las mismas regiones. El seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir cepas que aunque competitivas provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión y que por la determinante influencia que tiene la población de *Rhizobium* autóctono, el cual compite con las cepas introducidas y da lugar a un menor rendimiento, indica que puede ser ventajoso a la hora de pensar en utilizar los rizobios aislados y propios como biofertilizantes. Esto constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con vocación agrícola (Cuadrado B. et al., 2009).

Con el propósito de promover el desarrollo de la agricultura sostenible adoptando alternativas que estén al alcance de todos los agricultores, que mantengan y recuperen la capacidad productiva de la tierra y por ende que cuiden el ambiente es conveniente utilizar al máximo los mecanismos de la fertilización biológica promovida por la asociación simbiótica *Rhizobium* – leguminosa (Moreno-Chirinos et al., 2016).

En la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, donde se llevó a cabo esta tesina, se han realizado estudios e investigaciones referidos a la temática planteada en plantas de Leucaena (Gómez, 2009; “Inoculación con cepas de Rhizobios en distintas especies de Leucaena”) y algarrobos (Cabrera, 2010; “Presencia de rizobios en algarrobos de diferentes edades en el dorsal agrícola chaqueño”; Ibañez, 2014; “Aislamiento de rizobios nativos a partir de plantines de algarrobo logrados en sustratos con compost”; Toledo, 2014; “Presencia de rizobios nativos, micorrización y fijadores libres de nitrógeno y su relación con la actividad respiratoria y degradación de celulosa en suelos de algarrobales con pasturas”). De estos trabajos se realizaron presentaciones en jornadas y congresos.

## OBJETIVOS

- Determinar el nivel de infección en plantas de Algarrobo al inocularlas con aislamientos provenientes de plantas trampas de Caupí.
- Verificar la presencia de rizobios en nódulos de Algarrobo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## I.: ETAPA 1: PRELIMINAR

### I.A. Aislamiento desde un nódulo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo citado anteriormente: Toledo (2014), partiendo de los nódulos de *Vigna unguiculata* se realizaron los aislamientos correspondientes utilizando el método de aislamiento de Vincent, (1975). Luego se utilizaron los métodos de diseminación y de siembra por estría en placa de Petri (Tortora et al., 2007) sobre medio de cultivo sólido EMA (extracto de levadura, manitol y agar), en tres series o grupos de aislamientos que fueron incubados a 30°C durante 24 hs.

1° y 3° Serie: Grupo de aislamientos con crecimiento de colonias a 24 hs de incubación a 30°C.

2° Serie: Grupo de aislamientos con crecimiento de colonias a 36 hs de incubación a 30°C.

Como se detalla en el Anexo 1: Tabla 1, cada aislamiento fue caracterizado de forma cualitativa, teniendo en cuenta los caracteres de presencia de mucílago, color y aspecto de las colonias. Además, se detalla el tamaño del nódulo del cual provienen dichos aislados y las muestras de suelo del ecosistema de algarrobales con pasturas de dos cultivares de *Panicum maximum*: *Gatton panic* y *Tanzania*, y del cultivar *Brachiaria brizanta* cv *Marandú* utilizados por Toledo (2014).

Ver foto: FIGURA 1.

### I.B. Técnica de Tinción de Gram.

A su vez, los aislamientos fueron sometidos a la Técnica de Tinción de Gram (Tortora et al., 2007), la cual permitió observar la característica de Gram-negativas y las diferentes morfologías presentadas por las bacterias. Todos los aislados resultaron a microscopio, ser bacilos gramnegativos visualizados de color rosa.

Ver foto: FIGURA 2.A. Y FIGURA 2.B.

## II.: ETAPA 2: MANTENIMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPIQUE DE RIZOBIOS

- II.A. Mantenimiento

El stock de aislamientos se conservó en placas de Petri con medio EMA. Se utilizaron pequeños tubos de ensayo para la realización de repiques para purificar las diferentes poblaciones y conservarlas posteriormente en heladera. El repique consistió en sembrar por cada placa en stock, tres repeticiones. Luego se eligieron a los mejores repiques en cuanto a caracteres cualitativos se refiere el Anexo 1: Tabla 1, por cada triplete efectuado. En el Anexo 2: Tabla 1 se demuestra el comportamiento en el tiempo para repiques en placas de Petri con medio de cultivo sólido. Se detalla allí, el tiempo de mantenimiento en heladera y su comportamiento en cuanto al crecimiento, como respuesta al primer y segundo repique. El crecimiento en placa implicó un tiempo de incubación de entre 1 y 5 días.

Ver foto: FIGURA 3.

- II.B. Preparación de Material de Inoculación.

Las siguientes sub etapas describen cómo fueron los pasos previos a seguir para llevar a cabo la realización del material de inoculación empleado en el ensayo de invernáculo. Éste, se compuso de trece aislamientos posteriormente utilizados como los tratamientos de la experiencia.

**II.B.1. Repique en Medio sólido:** Para dar lugar a estos tratamientos, primeramente se realizó una nueva siembra en medio de cultivo sólido, para purificar el stock conservado y generar poblaciones en crecimiento

activo. Para ello, se realizó un nuevo repique (de aquellos aislamientos en stock elegidos en el sub ítem anterior) en tubos de ensayo de mayor tamaño. El repique fue incubado a 30°C durante 5 días. Al transcurrir este tiempo se verificó si presentaron características cualitativas semejantes a los repiques anteriores. Además se realizó nuevamente la Técnica de Tinción de Gram y se evidenció la presencia de bacilos gramnegativos teñidos de color rosa, a excepción de los aislamientos Nº 2, 7, 10, 11 y 12 que no mostraron ser bacilos típicos, sino con otro tipo de morfología: en forma ovalada y con sus extremos en punta. A pesar de esto último, y al no tener certeza del tipo microbiano observado por tal forma, se decidió no descartar estos aislamientos para su futuro uso en la experiencia ya que independientemente de la morfología, todas las muestras tenían células teñidas.

Ver foto: **FIGURA 4.**

**II.B.2. Multiplicación en Medio líquido:** En esta sub etapa se siguieron recomendaciones de Balatti (1992) y se incorporaron modificaciones para su pasaje y multiplicación de bacterias a medio líquido.

Para este paso se preparó el medio de cultivo líquido estéril en nuevos tubos de ensayo, se tomó con ansa una muestra de cada estría impregnada en el paso anterior e inmediatamente fue introducida en 9 ml del nuevo medio. Posteriormente, fueron sometidos a incubación por 48 hs en equipo “Shaker” (Incubador termostático de temperatura y revoluciones controladas) y a una temperatura de 29 °C.

A los tres días del enriquecimiento en medio líquido se observó en forma cualitativa el crecimiento de la población bacteriana. En la Anexo 2: Tabla 2, se detalla el comportamiento en el tiempo de cada aislamiento en el nuevo medio de cultivo, como así también los caracteres cualitativos observados en cada uno de ellos.

Ver foto: **FIGURA 5 Y FIGURA 6.**

- **II.C. Caracterización de colonias y Análisis de frecuencias.**

Previamente a la preparación del ensayo se realizó un análisis de frecuencias para evaluar todas las características cualitativas observadas en los aislamientos a utilizados.

Ver Tablas de **FIGURAS: 7, 8, 9, 10, 11 y 12.**

**II.C.1.: Resumen del análisis de frecuencias:**

Como detallan las tablas del análisis de frecuencias, se puede observar que existe una coincidencia entre tres aislamientos para los siguientes caracteres cualitativos: buen crecimiento en placa de Petri; color de colonias rosa oscuro y ausencia de muclago. Los aislamientos que presentaron estas similitudes fueron: 4, 7, 12 y 13. Sin embargo, no hubo coincidencia para la característica de tipo de nódulo origen, es decir, este aspecto no nos define la mayor frecuencia de estos caracteres para los aislados nombrados.

Ahora bien, en lo que se refiere a multiplicaciones en medio de cultivo líquido, sólo vuelven a destacarse los aislamientos Nº 7 y 13 pero, también resulta en este aspecto con buen comportamiento, el aislamiento Nº 3 que se diferencia de los anteriores por haber presentado excesiva presencia de muclago en EMA y por ser además de color rosa. Los aislados restantes y destacados en medio de cultivo sólido, no llegan a crecer bien en este nuevo medio de cultivo, mostrándose desde regular a muy malo.

### **III.: ETAPA 3: PREPARACIÓN DEL ENSAYO**

- **III.A. Preparación del Material Vegetal.**

**III.A.1. Procedencia de las semillas:** Las semillas que se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de Algarrobo blanco (*Prosopis alba* var. Grisebach) fueron provistas por el Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (IIFA) dependiente del Ministerio de Producción del Gobierno de la Provincia del Chaco, ubicado en el Departamento de Presidencia Roque Sáenz Peña. La ficha de información fiel de procedencia se cita en el Anexo 4: Tabla 1.

**III.A.2. Determinación del Poder Germinativo:** Como primera referencia, en algarrobo las semillas son de 6 a 7 mm de largo, 4 a 5 mm de ancho y 2 a 3 mm de espesor. El proceso de germinación se produce rápidamente una vez que el agua penetra en la semilla. La mejor tasa de germinación (energía germinativa) se obtiene con temperaturas de alrededor de 30°C, si bien germinan entre los 20-40 °C, parece ser que el efecto de la temperatura incide fundamentalmente en la regulación de la cantidad y ritmo de absorción de agua en la semilla en germinación (Prokopiuk & Chifa, 2000).

Debido a que en el pool de semillas provistas se reflejó una notoria diferencia de tamaños, se tuvo en cuenta este aspecto y se las separó en dos grupos: "semillas pequeñas" y "semillas grandes" y se determinó además, si el tamaño de las mismas incide sobre la germinación. El tamaño de referencia a considerar como "semillas grandes" fue el de 5 mm de ancho.

Las semillas se sometieron a un tratamiento pre germinativo para favorecer el proceso de forma homogénea en el tiempo, por medio de una técnica física de escarificación en agua. Para llevar a cabo la técnica, se utilizó agua a una temperatura inicial de 50°C. Se guardó cada recipiente con agua aisladamente en laboratorio a temperatura ambiente y al cabo de tres días, se seleccionó a aquellas semillas que se embebían y se las incubó en dos germinadores separados por tamaño, a una temperatura de 30°C.

La primera observación post incubación se hizo a las 24 horas. Y para ambos tamaños el resultado fue contrastante: el germinador de "semillas pequeñas" presentó un poder germinativo de 8%; sin embargo, para el caso de "semillas grandes" se obtuvo un valor de 88%.

Debido a los resultados, se decidió emplear semillas de tamaño mayor a 5 mm de ancho, previamente sometidas a tratamiento pre germinativo de 48 horas de escarificación y posterior incubación durante 24 horas a 30°C.

Bajo esta premisa se determinó el número de semillas necesario para llevar a cabo el ensayo de invernáculo. A 4 días, antes de la siembra, se realizó el acondicionamiento de las semillas a emplear.

Ver foto: FIGURA 13.

### **III.B. Preparación del Material Inoculante.**

En esta etapa se siguieron recomendaciones de Balatti (1982) para la preparación del material inoculante.

Esta tarea se llevó a cabo de forma paralela al acondicionamiento de semillas para el futuro ensayo. Los aislamientos enriquecidos en medio líquido y conservados en tubos de ensayo en heladera, como lo explica el sub ítem II.B.2., fueron sometidos nuevamente a 24 hs en equipo "Shaker" a 29°C y posteriormente traspasados a vasos de plástico estériles con 50 ml del mismo medio de cultivo. Ésta actividad consistió en incorporar con pipeta de precisión, a cada vaso de 50 ml de medio de cultivo líquido, 4 ml del medio de cultivo crecido y se continuó con la incubación de éstos en el mismo equipo durante 72 hs.

Para finalizar esta etapa se efectuó una siembra o impregnación en placa de Petri con medio EMA de gotas muestra del medio de cultivo líquido conservado y se verificó en 3 aislamientos que su capacidad de

crecimiento continuó sin afectarse tras la incorporación del nuevo medio. Este aspecto también se detalla en el Anexo 2: Tabla 2.

Ver foto: **FIGURA 14.**

- **III.C. Preparación de Solución Nutritiva.**

Para el ensayo, se empleó la Solución Nutritiva de Jensen (Vincent, 1970). La misma se preparó según la receta del autor, detallada en el Anexo 3: Tabla 1. Se pesó cada soluto con balanza de precisión y se tomó el dato de medida de pH de la solución, que dio un valor de 6.

Ver foto: **FIGURA 15.**

- **III.D. Preparado de bandejas forestales.**

Cada bandeja a utilizar fue lavada y acondicionada para su uso. Además se utilizaron bolsitas de plástico de polietileno para contener al sustrato dentro de cada tubete con volumen de 250 cm<sup>3</sup>.

**III.D.1. Sustrato:** Se siguió la metodología de Prueba en Planta (Vincent, 1975), utilizando como sustrato arena estéril. La misma recomienda el uso de arena gruesa de río, lavada, humedecida y periódicamente regada con una de las soluciones para plántulas. La arena limpia, seca y tamizada se fraccionó en frascos de vidrio y se procedió a esterilizar en autoclave. Además, se agregó Perlita expandida para mejorar aireación y retención de agua en cada contenedor, y mezclada en relación 1:1 con la arena.

Ver foto: **FIGURA 16.**

- **III.F. Diseño Experimental.**

Se planteó el ensayo con diseño en bloques, completos al azar. Se utilizaron 5 bandejas forestales de 24 tubetes. Cada bandeja representó una repetición. Dentro de cada repetición se sortearon al azar las respectivas celdas para los 13 tratamientos, ubicando a los testigos en las celdas restantes. Cada tratamiento representó una planta inoculada, y cada testigo una planta sin inocular.

Ver foto: **FIGURA 17.**

#### **IV.: ETAPA 4: ENSAYO**

- **IV.A. Siembra y Establecimiento de las plantas.**

El día 10/09/2016 en laboratorio, se sembró cada tubete con 3 semillas pre germinadas e inoculadas según su ubicación en la bandeja. A los 2 días se las llevó a invernáculo bajo media sombra. Luego se raleó dejando una planta por celda, a medida que éstas se establecían. El raleo consistió en cortar a nivel del cuello la planta de menor desarrollo y la selección en elegir la planta en mejor estado a la vista.

- **IV.B. Actividades.**

A los 20 días de la siembra se inoculó por segunda y última vez cada tratamiento. 5 días después se incorporó solución nutritiva a todas las plantas y de allí en adelante, cada 5 días en promedio acompañado del riego semanal.

Ver foto: **FIGURA 18.**

A los 25 días desde la siembra (DDS) se decide incorporar la Solución Nutritiva acompañada del riego, y a partir de aquí se realizó esta operación en promedio cada 7 días, dependiendo del día de riego.

Se pudo observar alrededor de los 35 días de cultivo, que la gran mayoría de las plantas presentaron síntomas de abscisión al mostrar foliolulos, foliolos u hojas completamente amarillentas, como así también se verificó que el 64% de las plantas ya habían perdido sus cotiledones. A partir de estas observaciones se decidió duplicar la dosis por planta.

Al llegar a los 60 DDS, se sorteó una bandeja para extraer las plantas (la bandeja que resultó elegida por sorteo fue la Repetición nro. 2) pues, según Cabrera (2010) con su trabajo, a los 60 días de edad, las plantas de algarrobo muestran presencia de nódulos radicales. Para ello, se extrajeron las plantas, se lavaron las raíces, se observó detalladamente el sistema radical de cada plantín, se secó en estufa hasta peso constante y luego se pesó con balanza de precisión cada tratamiento y un testigo elegido al azar.

Recordando que, según ensayos realizados en la cátedra (Ibañez, 2014; Cabrera, 2010), a los 90 días de edad también se evidencia la aparición de nódulos en plantines de algarrobo, a los 93 DDS se sorteó una 2º bandeja (Repetición nro. 3) para extracción. A partir de aquí y en adelante, las repeticiones restantes se regaron de forma habitual pero acompañadas de 3 ml de Solución Nutritiva por planta, es decir desde aquí se triplicó la dosis inicial.

- **IV.C. Registro de datos y controles.**

A medida que se realizaba el riego, se llevó a cabo un registro semanal de datos **cuantitativos** de: altura de tallo (medida realizada con regla, desde la superficie del sustrato hasta el punto que coincide con el nudo correspondiente a la primera hoja); número de hojas desarrolladas; número de hojas caídas, como también un registro de datos **cualitativos**: estado de cotiledones; aparición de peciolos rojos; estado general de planta.

Ver foto: **FIGURA 19.**

- **IV.D. Evaluación final.**

Se dejaron las 3 repeticiones restantes (bandejas Nº 1, 4 y 5) en invernáculo hasta el último día de ensayo: 115 DDS, extrayendo el total de las plantas. Se tomó esta decisión al ver que las plantas no presentaron nuevos cambios en las últimas dos semanas de cultivo.

Luego de extraer las plantas se realizó una medición con regla de Altura final de planta, medida desde el nudo correspondiente a la inserción de los cotiledones hasta el meristema apical.

Ver foto: **FIGURA 20. Y FIGURA 21.**

**IV.D.1. Resultado del ensayo:** A los 60 días desde la siembra y hasta el último día de ensayo no se evidenció la presencia de nódulos en las plantas extraídas.

**IV.D.2. Determinación de nitritos y nitratos en el sustrato:** Para estimar la presencia de formas inorgánicas de Nitrógeno que hayan podido quedar presentes en el sustrato, se determinó presencia de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  por medio de la técnica citada en la Guía de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Como resultado, no se encontraron formas de Nitrógeno en el sustrato al finalizar el ensayo.

**IV.D.3. Análisis estadísticos:** (Varianza, Frecuencias y Correlación) Para realizar los análisis estadísticos correspondiente a los datos obtenidos según el diseño experimental, se utilizó el Software Estadístico "Infostat" (Di Rienzo et al., 2008). Para el análisis de la Varianza, se utilizó el Método de Comparación de Duncan al nivel de significación del 5 %.

# RESULTADOS

- **1) Altura final de planta.**

Como se observa en la Figura A (Pág. 31), la mayoría de los tratamientos superaron al testigo en valores promedio, a excepción de los tratamientos Nº 1 y 8. Sin embargo, en el análisis de la varianza no se obtuvo significación estadística. Además se realizó análisis de frecuencias de los datos obtenidos.

Ver: **FIGURA 22.1.** y **FIGURA 22.2**

- **2) Altura de tallo.**

La variable Altura de tallo fue medida semanalmente a partir de los 16 DDS, Figura B, allí se muestra el comportamiento de cada tratamiento en el tiempo.

Ver: **FIGURA 23.**

Se observa en la Figura B que el T12 obtuvo valores mayores desde el inicio respecto al testigo y a los demás tratamientos, llegando al final del ensayo con un valor mayor a 3 cm de elongación de tallo. Sin embargo, casi el 30% de los tratamientos llegó a esta instancia con un mínimo de 2,5 cm, valor superior al testigo a los 90 DDS. En particular, el T8 mostró un incremento importante sobre el testigo desde los 16 a 25 DDS, pero se mantiene en valores semejantes a éste durante todo el período de cultivo.

La diferencia obtenida en el T12 fue significativamente mayor al tratamiento testigo y al T3 durante todo el ensayo. Este comportamiento se repitió en el 90 % de duración del ensayo frente a los tratamientos 1 y 8, en el 70% respecto a T9 y en el 20% frente a T11.

A su vez, también se destaca en la Figura B, que además del tratamiento Nº 12, fueron superiores significativamente al testigo desde los 16 hasta los 40 DDS, los tratamientos Nº 5 (●) y 4 (●), como así también desde los 25 hasta los 40 DDS, los tratamientos Nº 10 (●), 2 (●) y 6 (●). Así mismo, en al menos dos momentos también superó con significancia al testigo, el tratamiento Nº 7 (○).

Es decir, 42% de los tratamientos supera significativamente al tratamiento testigo.

- **3. a) Nº Total de hojas.**

Esta variable también se midió a partir de los 16 DDS. La Figura C, muestra el comportamiento de cada tratamiento en el tiempo para esta variable.

Ver: **FIGURA 24.**

Como se puede observar en la Figura C, los tratamientos que mostraron un notorio aumento de 1 a 3 hojas desde los 16 hasta los 30 DDS fueron: 6, 9, 10, 13, 5, 11, 2, junto a los tratamientos 3 y 7 que alcanzaron a superar también a estos últimos. A los 45 días de cultivo, todos los tratamientos obtuvieron más de 4 hojas, a excepción del T8. Tras pasar 60 DDS el T12 mostró un notorio incremento sobre los demás tratamientos, siendo el único en llegar a 7 hojas. Sin embargo a los 75 días el T5 y T13 igualan a T12, superándolo al final del ensayo junto a los tratamientos 9 y 11.

Hasta los 25 DDS el 50% de los tratamientos (2, 4, 5, 6, 10, 11 y 13) mostraron diferencia significativa respecto al testigo. Es decir que sólo de superó al testigo en los momentos iniciales del ensayo.

Se observa que en las variables Altura y Nº Total de hojas, los tratamientos que superaron al testigo fueron T2, T4, T5 y T10.

- **3. b.) Uniformidad entre tratamientos para Nro. de Hojas.**

Como se detalla en la Figura D, todos los tratamientos sufren uniformemente aumentos en desarrollo de nuevas hojas al transcurrir el tiempo. A pesar de que algunos son más eficientes en desarrollarlas, todos llegan a tener al último día de medición (90 DDS), un total mínimo de 5 hojas por planta.

Ver: **FIGURA 25.**

- **4) Nº de hojas caídas.**

Variable determinada a partir de los 40 DDS y hasta el final del ensayo.

Ver: **FIGURA 26.**

Para esta variable, según la Figura E, el tratamiento que más hojas perdió fue el T12 (cuatro hojas en promedio), seguido de los tratamientos T5, T7 Y T13. Sin embargo, el 35 % de los tratamientos perdió al menos una hoja, y el 57 % dos hojas.

Según el análisis de la varianza, los tratamientos que muestran diferencias significativas frente al testigo son los Nº: 7 y 12 (Figura E).

El T7 supera significativamente al testigo y al 78% de los tratamientos a los 45 DDS, y el T12 supera al testigo y al T1 en dos momentos aislados: a los 50 y 90 DDS. A su vez, éste último se comporta de la misma manera en el 50% de los casos frente a los T: 11, 10 y 6.

- **5) Peso seco.**

Como se observa en la Figura F, para esta variable los resultados indicaron que el tratamiento que mayor PS obtuvo fue el T11 y el de menor el T13. Este último es el único tratamiento con valor inferior al testigo.

En cuanto al análisis de varianza, para esta variable, no se alcanzaron valores significativos.

Ver **FIGURA 27.**

- **6) Relación Atura/Peso seco.**

Al definir esta relación de variables de desarrollo, podemos inferir en que cuanto mayor es esta relación mejor es la asimilación de nutrientes para la planta

Ver: **FIGURA 28.**

A esta premisa antes citada, responden los tratamientos: 5 y 3 en orden decreciente por tener mayor relación, y que además superan al testigo. A su vez éste último tiene una relación mayor a los tratamientos 8, 2 y 6.

Al igual que la variable anterior, en este caso tampoco se obtuvieron valores significativos para el análisis de la varianza.

- **7) Relaciones entre las distintas variables evaluadas.**

Para poder establecer las relaciones que puedan existir entre estas variables tomadas en cuenta, se recurrió a un Análisis de correlación. En las siguientes tablas se pueden observar los coeficientes de correlación para cada par de variables de interés.

Ver Tablas: Coeficientes de correlación. **FIGURA 29; FIGURA 30; FIGURA 31.**

El nivel de infección buscado no fue posible determinar ya que no hubo presencia de nódulos en las raíces de las plantas. Si bien, la falta de simbiosis podría llevar a pensar que habría Nitrógeno en el sustrato, la determinación de presencia de nitritos y nitratos en el mismo, dio resultado negativo. Por lo tanto se puede inferir en que los aislamientos no fueron infectivos para la planta en esta experiencia. Por otro lado, las variables Altura final de planta, Peso seco y Relación altura/peso seco en los resultados presentaron diferencias entre los 13 tratamientos y el testigo sin inocular aunque sin significación estadística, mientras que Altura de tallo, Nº Total de hojas y Nº de hojas caídas si presentaron diferencias significativas entre tratamientos y el testigo, como así también entre los mismos tratamientos y en diferentes momentos del cultivo. Los tratamientos de inoculación: T2, T4, T5, T7, T10 y T12 mostraron estas diferencias frente al testigo en Altura de tallo. A su vez, estos últimos también presentaron diferencias significativas frente al testigo en la variable Nº Total de hojas, a excepción del T12. Para la variable Nº de hojas caídas las diferencias significativas frente al testigo se manifestaron en los tratamientos T7 Y T12.

De los tratamientos T2, T4, T5, T7 y T10, que obtuvieron diferencias significativas en planta frente a los tratamientos sin inocular, sólo dos de ellos (T2 Y T7) presentaron semejantes caracteres entre sí en cuanto al análisis de frecuencia utilizado en el ítem **II.C.1.** Es decir, ambos ejercen el mismo efecto en planta y se comportan similarmente como aislamientos en los medios de cultivo sólido y líquido, aunque el T7 más que el T2 en este último.

## DISCUSIONES

El establecimiento de la simbiosis es la resultante de un proceso finamente regulado que implica el reconocimiento entre ambos socios. Son pocos los rizobios que poseen un estrecho rango de hospedantes, teniendo en su mayoría una baja selectividad (Zahran 2001), no coincidiendo con los resultados encontrados en el trabajo en el cual ninguno de los aislamientos resultó infectivo. Ha sido reportado que rizobacterias de los géneros *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, aisladas de algarrobales de la región del Parque Chaqueño Argentino son capaces de inducir nódulos fijadores de N<sub>2</sub> en *Prosopis alba* (Díaz et al., 2013; Velázquez et al., 2001); como también los resultados obtenidos por Diaz (2013) donde de cinco aislamientos resultaron infectivos, cuatro mostrando una variación en el número de nódulos, y concluyendo que el aislamiento no infectivo fue debido a su especificidad. Es importante destacar que existe además una percepción de los rizobios específicos que induce en las leguminosas un conjunto de respuestas sistémicas que contribuyen a que las plantas elaboren respuestas adaptativas eficientes, sobre todo en condiciones ambientales limitantes (Zamioudis y Pieterse, 2012), por lo cual la inoculación con rizobacterias contribuye favorablemente a la supervivencia de las plantas durante su establecimiento. Sin conocer taxonómicamente con qué rizobios trabajamos, y teniendo en cuenta que independientemente de no haber generado infección, algunos aislamientos utilizados en este trabajo expresaron en planta diferentes potenciales de crecimiento: más del 30 % de las plantas tratadas tuvieron una altura final superior a 8 cm, valor más frecuente entre plantas según el análisis de frecuencias realizado y altura no alcanzada por el tratamiento testigo. El 50 % de las plantas superaron significativamente al tratamiento testigo en la variable altura de tallo. El 64,2 % de las plantas obtuvo un notorio incremento en número de hojas en las primeras dos semanas de cultivo, inclusive el 50 % del total superó significativamente al testigo hasta los 25 DDS. Para estas dos últimas variables el 28,5 % de los tratamientos superó al testigo con significancia estadística. El 57 % de las plantas presentaron un mínimo de dos hojas caídas durante el ensayo, pero los tratamientos 7 y 12 superaron significativamente al testigo perdiendo en mayor número. En cuanto al peso seco, a pesar de no haberse presentado significación estadística, el tratamiento de mayor valor fue el T11 y el de menor, el T13, siendo éste inclusive de menor valor al testigo. Y al relacionar las variables Altura de planta y Peso seco los tratamientos 5 y 3 fueron los superiores al testigo. Éste último, a su vez obtuvo una relación mayor que T8, T2 y T6. Es decir, se verifica de alguna manera que estos aislados podrían promover el crecimiento de planta de Algarrobo blanco en los primeros momentos de cultivo. Wdowiak-Wróbel et al. (2017) remarca que en los años recientes muchos estudios de diversidad de rizobios se han orientado en la búsqueda de nuevas especies con propiedades promotoras de crecimiento.

## CONCLUSIÓN

No fue posible determinar la presencia de nódulos en plantas de Algarrobo blanco, por lo tanto no se pudo cumplir con los objetivos propuestos.

Los inóculos no resultaron ser infectivos para la planta de Algarrobo y a pesar de estar presentes en nódulos de Caupí, no serían específicos para este nuevo huésped. Sin embargo, se los destaca como microorganismos PGPR, pues si bien no pudieron reaccionar frente a la leguminosa como verdaderos rizobios infectivos, un porcentaje de ellos expresó su potencial en cuanto a crecimiento y desarrollo como a crecimiento rápido en medios de cultivo sólido y líquido, incluyendo aquí el posible potencial para la industria. Esto último, indicaría su posible uso futuro como material PGPR.

# TABLAS Y FIGURAS

## 1) Materiales y Métodos:

### I.: ETAPA 1: PRELIMINAR

#### I.A. Aislamiento desde un nódulo.

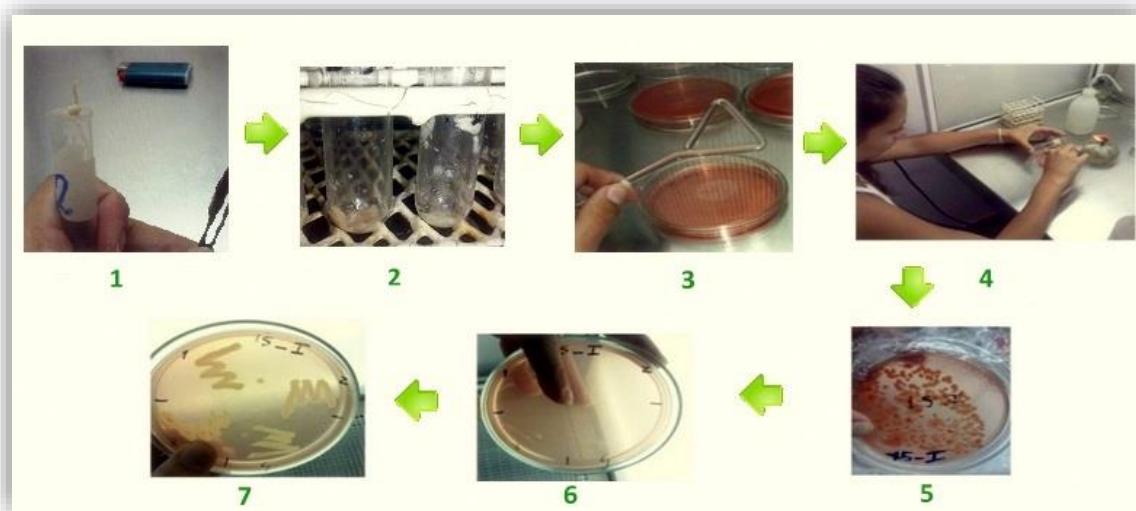


FIGURA 1: Aislamiento desde un nódulo: 1) Detalle del nódulo origen; 2) Detalle del nódulo machacado; 3) Impregnación en agar; 5) Colonias a 24 hs de Incubación; 6) Aislamiento a 24 hs de incubación; 7) Aislamiento a 48 hs de incubación.

#### I.B. Técnica de Tinción de Gram.



FIGURA 2.A: Tinción de Gram: 1) Materiales para la tinción de Gram; 2) Secado del flotis; 3) Ubicación en microscopio; 4) Observación de rizobios teñidos de color rosa oscuro en detalle con aumento 40x.

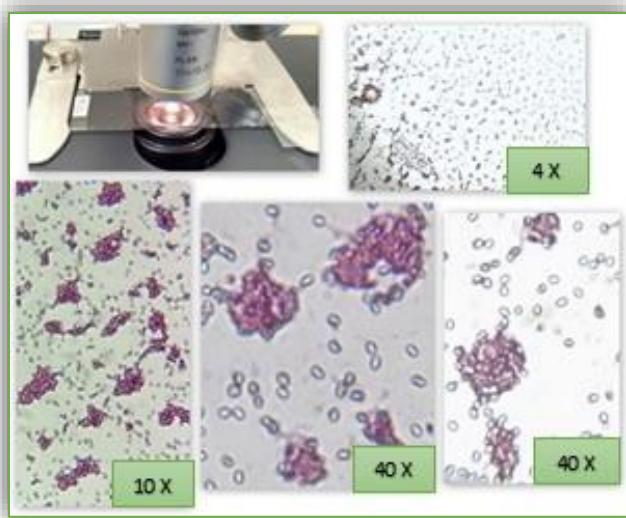


FIGURA 2.B: Morfología de bacterias: forma de bacilos presentada por un aislamiento en la tinción de Gram.

**II.: ETAPA 2: MANTENIMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPIQUE DE RIZOBIOS**

• **II.A. Mantenimiento**

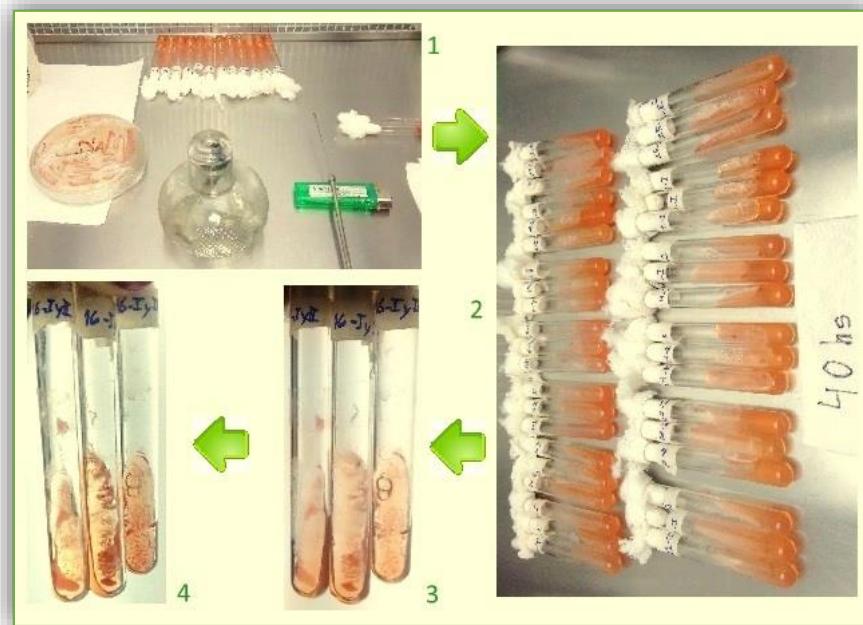


FIGURA 3: Mantenimiento: Repique de placa de Petri a tubos de ensayo. 1) Materiales necesarios para el repique; 2) Tripletes por aislamiento, a 40 horas de incubación; 3) Detalle de aislamiento Nº 12 a 48 hs; 4) Detalle de aislamiento Nº 12 a 72 hs.

- **II.B. Preparación de Material de Inoculación.**

**II.B.1. Repique en Medio sólido:**



FIGURA 4: Repique en medio sólido: tubos de ensayo de mayor tamaño tras 24 hs de incubación.

**II.B.2. Multiplicación en Medio líquido:**

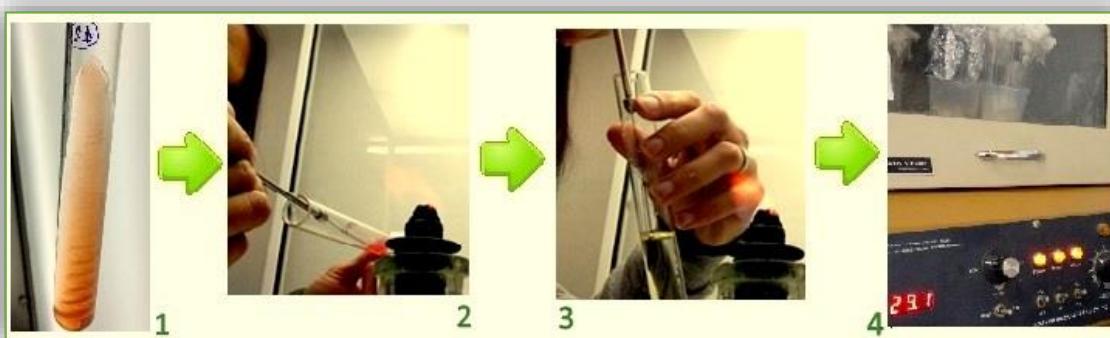


FIGURA 5: Nuevo medio de cultivo: 1) Repique: detalle de crecimiento en estrías tras 48 hs de incubación; 2) Raspado de estría con ansa; 3) Ansa cargada introducida en 9 ml de medio de cultivo líquido; 4) Incubación en equipó shaker a 29,5°C.

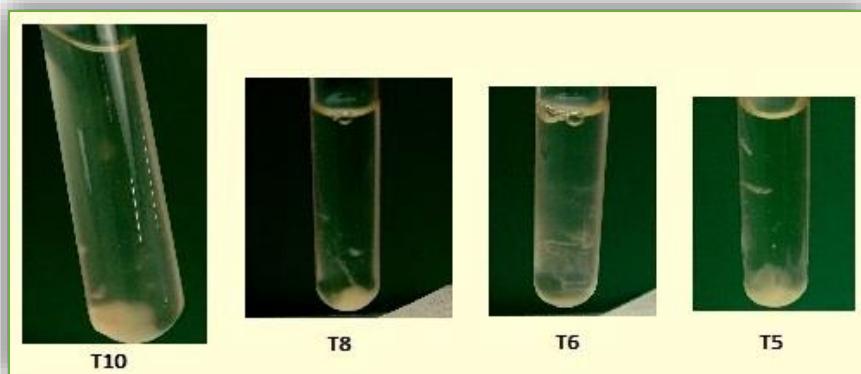


FIGURA 6: Detalle de turbidez de los aislamientos Nº 10, 8, 6 y 5 tras 72 hs de incubación en medio de cultivo líquido.

- II.C. Caracterización de colonias y Análisis de frecuencias.

II.C.1: Crecimiento en medio sólido (placas de Petri):

Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
Crecimiento	Bueno	4	7 (1,5,6,8,9,10,11)	0,54	7	0,54
Crecimiento	Muy Bueno	5	6 (2,3,4,7,12,13)	0,46	13	1

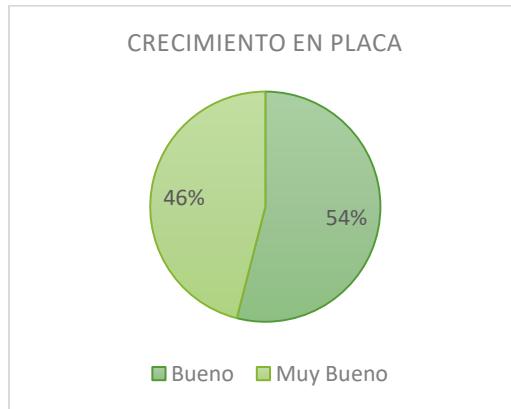


FIGURA 7

II.C.2: Presencia de mucílago:

Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
Mucílago	SI	1	4 (5,8,9,11)	0,31	4	0,31
Mucílago	NO	2	7 (1,4,6,7,10,12,13)	0,54	11	0,85
Mucílago	EXCESIVO	3	2 (2,3)	0,15	13	1

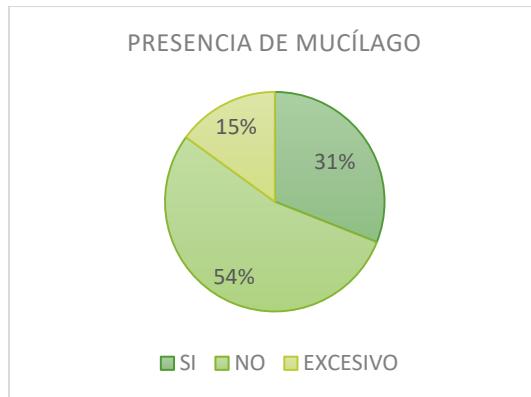


FIGURA 8

**II.C.2:** Tipo de Nódulo Origen: Tamaño

Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
Tamaño Nódulo	Pequeño (<5 mm)	1	4 (2,3,4,6)	0,31	4	0,31
Tamaño Nódulo	Grande (>5 mm)	2	7 (1,5,7,8,9,10,11)	0,54	11	0,85
Tamaño Nódulo	Mixto	3	2 (12 y 13)	0,15	13	1

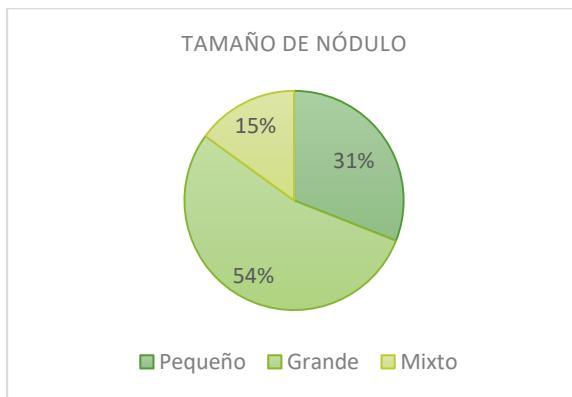


FIGURA 9

**II.C.3:** Color de colonias:

Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
Color	Rosa	1	6 (1,3,5,8,9,11)	0,46	6	0,46
Color	Rosa Oscuro	2	4 (6,7,10,12,)	0,31	10	0,77
Color	Rosa y Rosa Oscuro	3	3 (2,4,13)	0,23	13	1

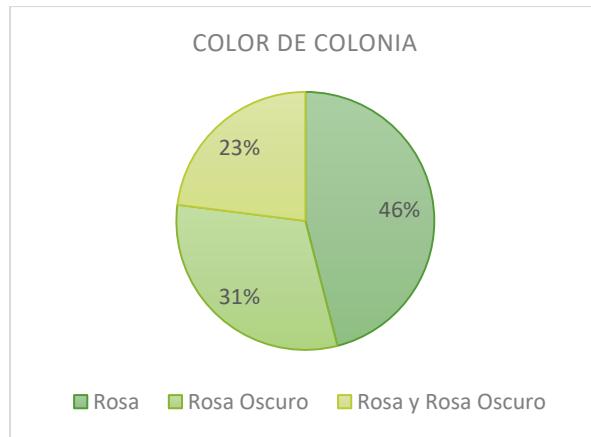


FIGURA 10

**II.C.4:** Enriquecimiento en medio líquido (Tubos de ensayo):

Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
<b>Aspecto Tubo</b>	Muy Malo	1	1(12)	0,08	1	0,08
<b>Aspecto Tubo</b>	Malo	2	1 (11)	0,08	2	0,15
<b>Aspecto Tubo</b>	Regular	3	5 (4,5,6,9,13)	0,38	7	0,54
<b>Aspecto Tubo</b>	Bueno	4	5(1,2,3,8,10)	0,38	12	0,92
<b>Aspecto Tubo</b>	Muy Bueno	5	1 (7)	0,08	13	1

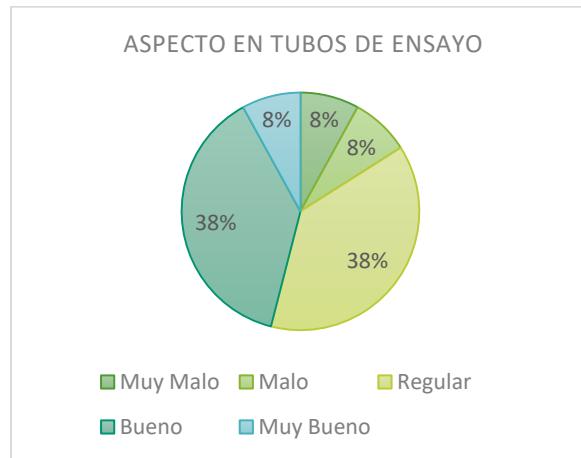
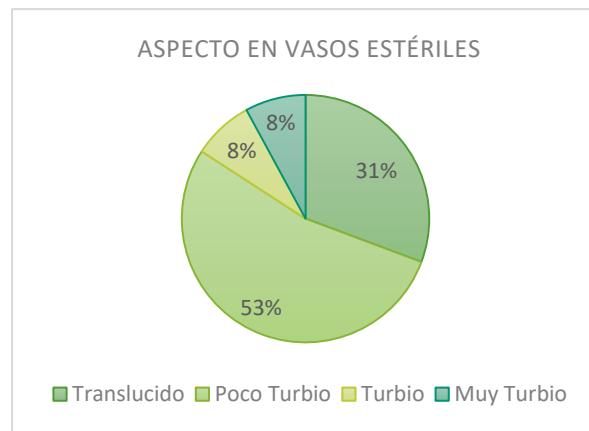


FIGURA 11

**II.C.5: Enriquecimiento en medio líquido (Vasos estériles):**

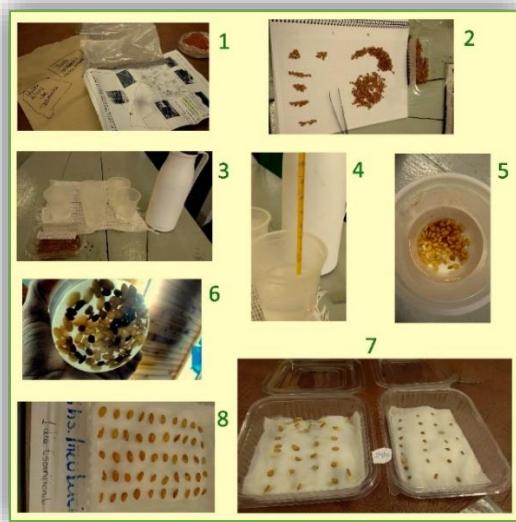
Variable	Clase	MC	FA (Nro. de Aislado)	FR	FAA	FRA
<b>Aspecto Vasos Estériles</b>	Translucido	1	4 (4,8,9,12)	0,31	4	0,31
<b>Aspecto Vasos Estériles</b>	Poco Turbio	2	7 (1,2,5,6,7,10,11)	0,54	11	0,85
<b>Aspecto Vasos Estériles</b>	Turbio	3	1 (3)	0,08	12	0,92
<b>Aspecto Vasos Estériles</b>	Muy Turbio	4	1 (13)	0,08	13	<b>1</b>

FIGURA 12

### III.: ETAPA 3: PREPARACIÓN DEL ENSAYO

- **III.A. Preparación del Material Vegetal.**

#### **III.A.2. Determinación del Poder Germinativo:**



**FIGURA 13:** Preparación del Material Vegetal: 1) Semillas embolsadas con información de procedencia; 2) Conteo; 3) Vasos con agua a temperatura inicial de 50°C; 4) Medida de la temperatura; 5) semillas en agua; 6) Detalle semillas embebidas vs no embebidas; 7) Bandeja de "semillas grandes" y bandeja de "semillas pequeñas" a 24 hs; 8) Detalle de semillas grandes en germinación tras 16 hs de incubación.

- **III.B. Preparación del Material Inoculante.**



**FIGURA 14:** Preparación del Material Inoculante: 1) Medio de cultivo líquido listo para uso; 2) y 5) Detalle de elementos empleados; 3) Incorporación del nuevo medio a los vasos estériles y traspaso de aislamientos conservados en tubos a los mismos; 4) Detalle del paquete de vasos estériles; 6) Calibrado de pipeta; 7) Vasos estériles en equipo shaker a 29,5°C.

- **III.C. Preparación de Solución Nutritiva.**

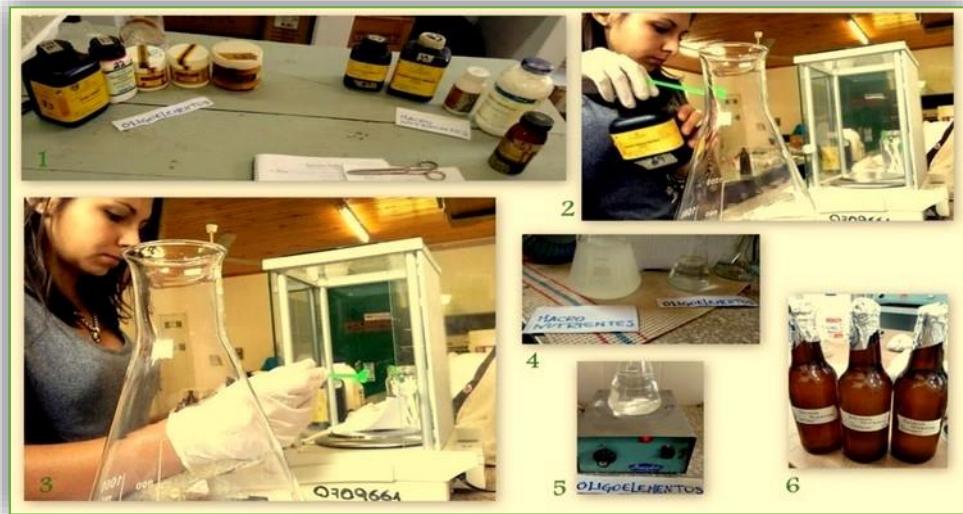


FIGURA 15: Solución Nutritiva: 1) Solutos a utilizar: Macro y Micronutrientes; 2) y 3) Determinación del peso necesario según la receta del autor; 4) Soluciones listas para uso; 5) Dilución; 6) Botellas con Solución Nutritiva preparada.

- **III.D. Preparado de bandejas forestales.**



FIGURA 16: Preparación del Sustrato: 1) Tamizado de arena de río; 2) Elementos para lavado de la arena; 3) Residuos del tamiz; 4) Lavado de arena; 5) y 6) Frascos con arena seca, lavada y tamizada para esterilizar con detalle de autoclave en funcionamiento; 7) y 8) Mezclas 1:1 de arena y perlita; 9) Detalle del sustrato terminado e incorporación en bandejas.

- **III.F. Diseño Experimental.**



FIGURA 17: Bandejas en invernáculo: 3 días desde de la siembra, ubicadas al azar sobre mesada.

**IV.: ETAPA 4: ENSAYO**

- **IV.B. Actividades.**



FIGURA 18: 2º Inoculación: 1) Mesada de laboratorio, previa aplicación de material inoculante; 2) Inoculación; 3) Detalle de aplicación de material inoculante.

**IV.C. Registro de datos y controles.**



FIGURA 19: Controles: 1) Medida de pH de la Solución Nutritiva; 2) Detalle de material utilizado para aplicación de la Solución; 3) Aplicación de riego; 4) Vista de cotiledones amarillentos; 5) Aplicación de la Solución; 6) Medición de altura de tallo.

- **IV.D. Evaluación final.**

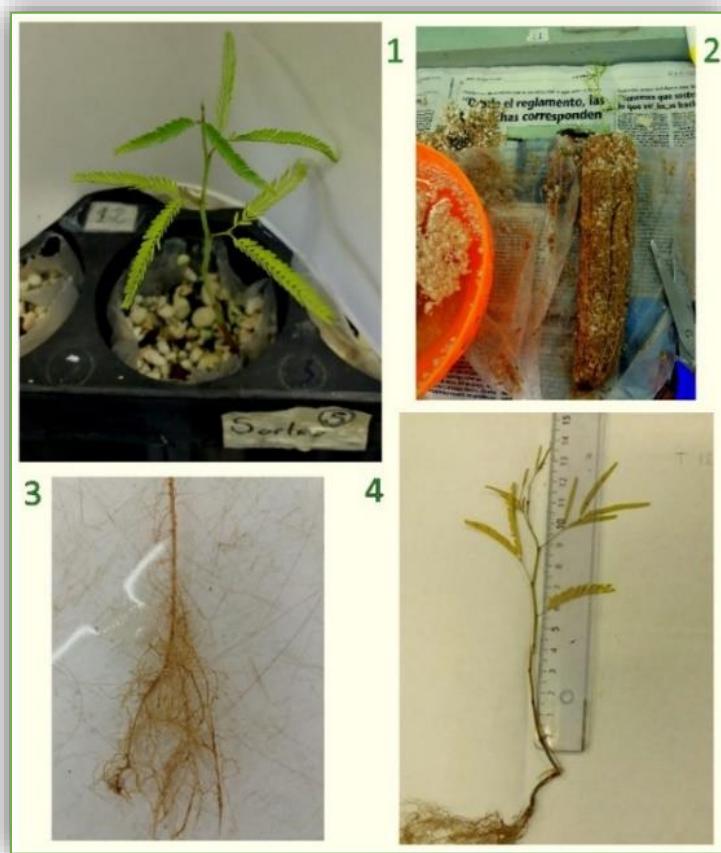


FIGURA 20: Extracción de plantas: 1) Detalle de estado de planta a los 115 DDS; 2) Detalle de sustrato; 3) Sistema radical lavado sin nódulos; 4) Medida de Altura final de planta.



FIGURA 21: Fin del ensayo: plantas lavadas, testigos y tratamientos.

## 2) Resultados y discusiones.

- 1) Altura de planta.

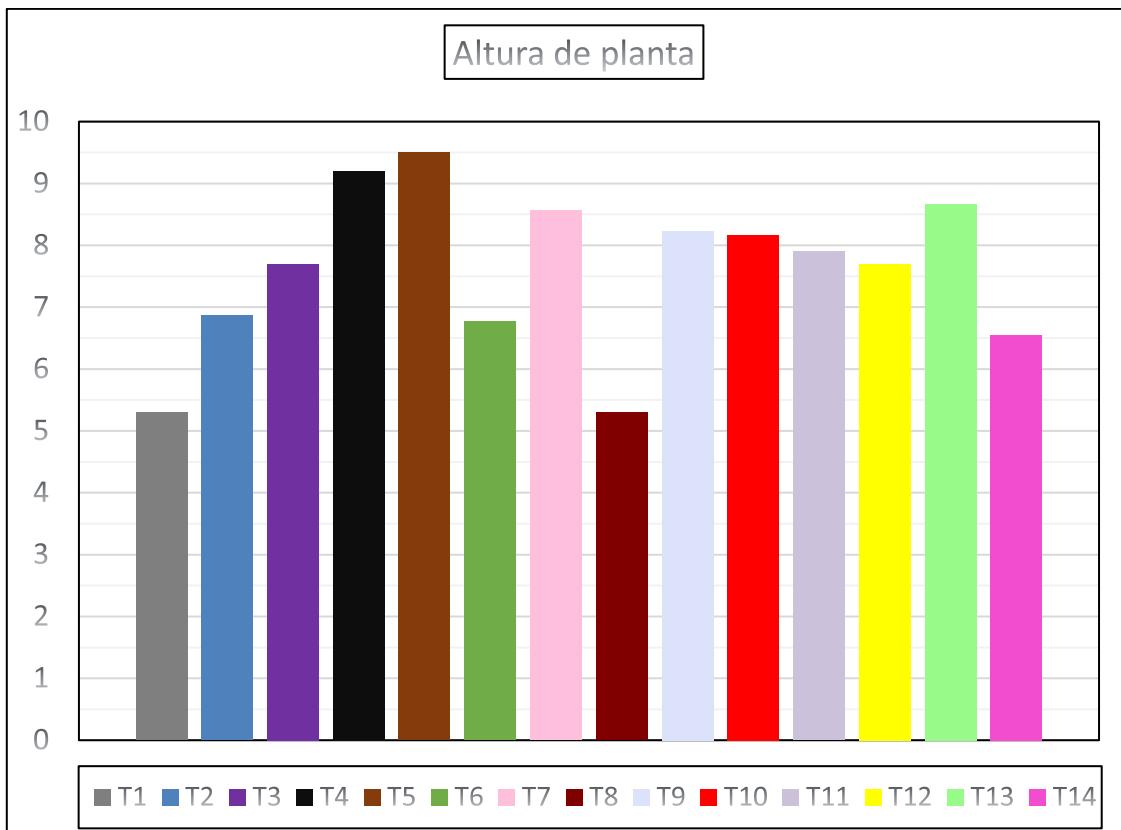


FIGURA 22.1: Altura promedio por tratamiento en cm. (T14: Tratamiento testigo).

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
ALTURA DE PLANTA	Baja	(3,20	4,74)	3,97	3	0,07	3	0,07
ALTURA DE PLANTA	Medianamente baja	(4,74	6,28)	5,51	5	0,12	8	0,19
ALTURA DE PLANTA	Mediana	(6,28	7,82)	7,05	11	0,26	19	0,45
ALTURA DE PLANTA	Medianamente Alta	(7,82	9,36)	8,59	15	0,36	34	0,81
ALTURA DE PLANTA	Alta	(9,36	10,90)	10,13	8	0,19	42	1,00

FIGURA 22.2: Tabla de análisis de frecuencias.

- 2) Altura de tallo.

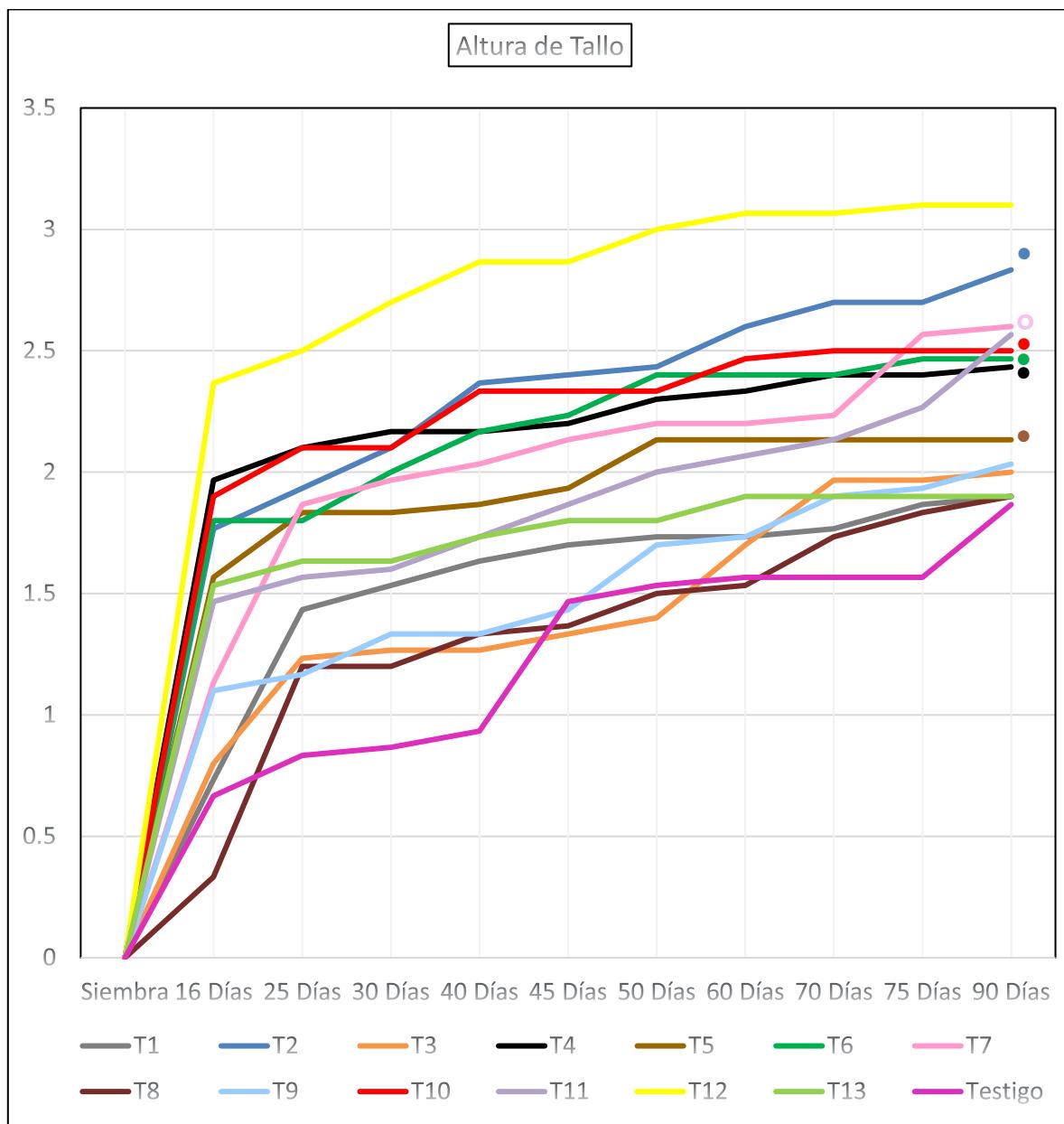


FIGURA 23: Altura del tallo por tratamiento en el transcurso del ensayo. Los ● indican significación sobre el testigo.

- 3. a) Nº Total de hojas.

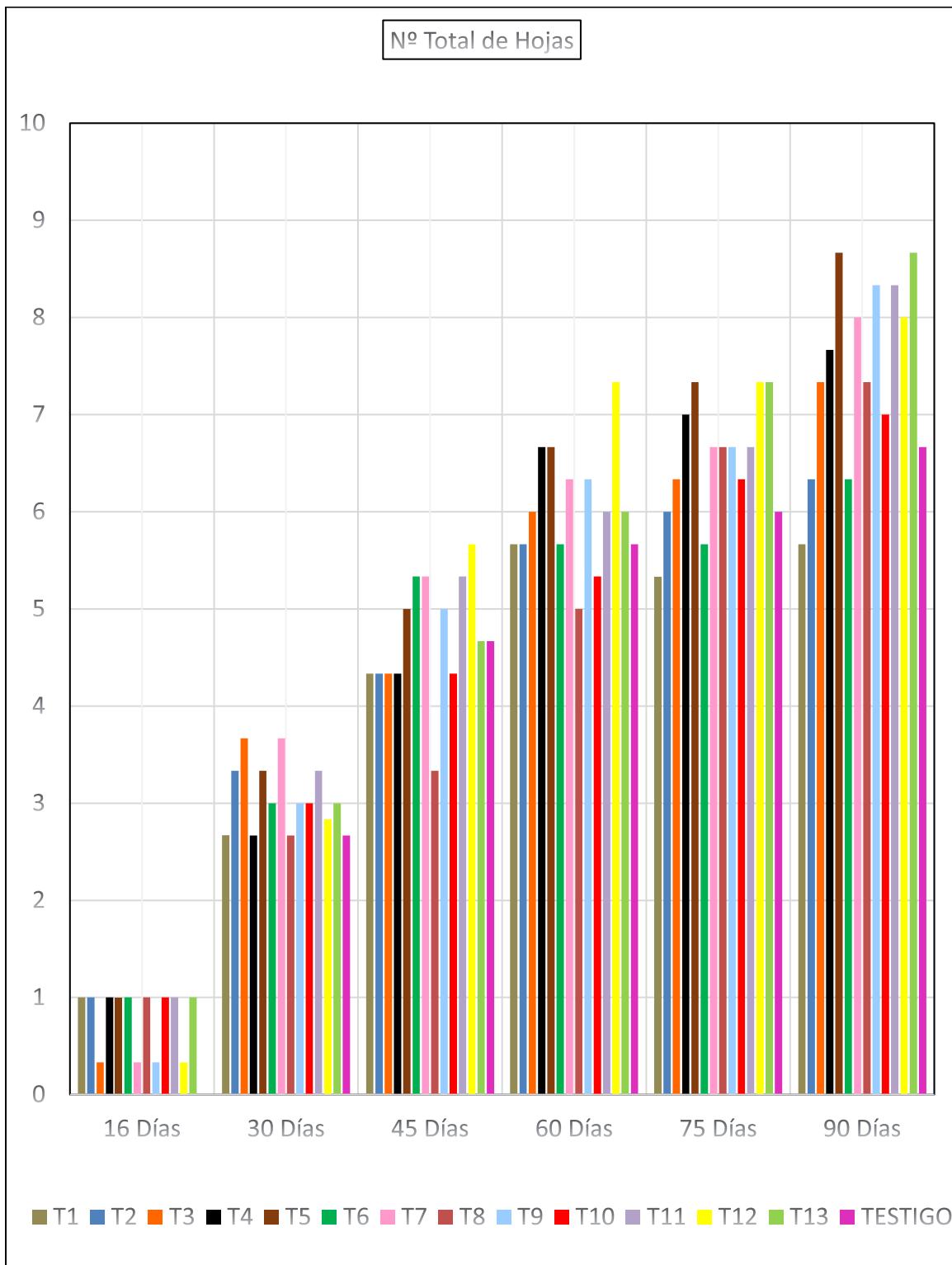


FIGURA 24: Nº Total de hojas por tratamiento: detalle de seis mediciones realizadas.

- 3. b.) Uniformidad entre tratamientos para Nro. de Hojas.

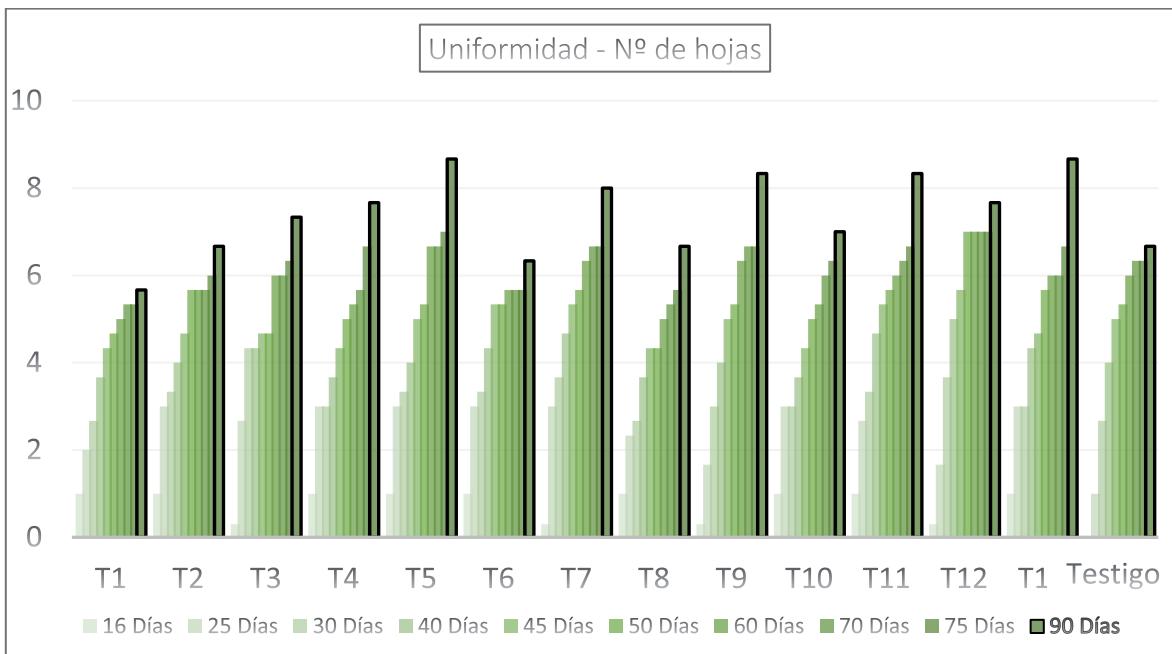


FIGURA 25: Uniformidad: Nº de hojas desarrolladas en el tiempo por tratamiento.

- 4) Nº de hojas caídas.

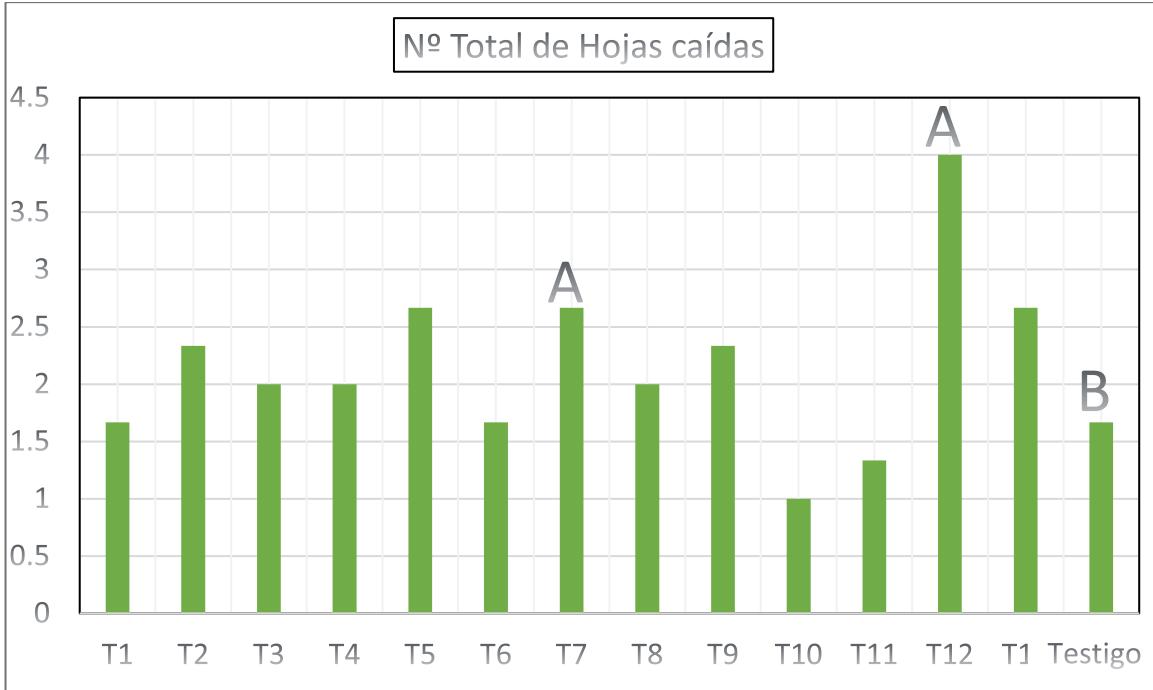


FIGURA 26: Nº total de Hojas Caídas: detalle por Tratamiento y letras de significación frente al testigo.

- 5) Peso seco.

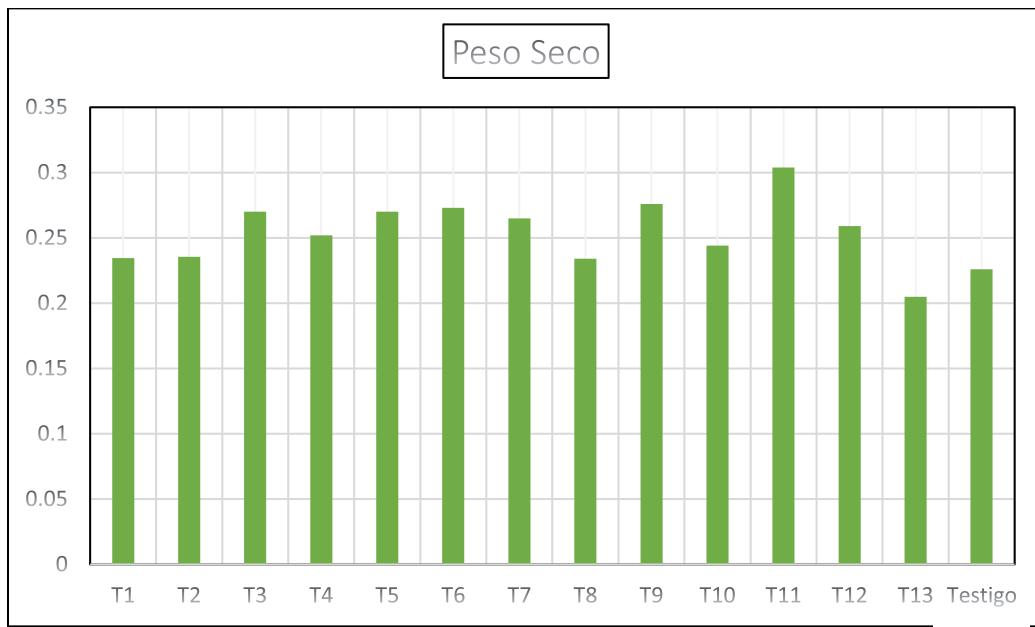


FIGURA 27: Peso Seco: Gramos promedio por tratamiento.

- 6) Relación Atura/Peso seco.

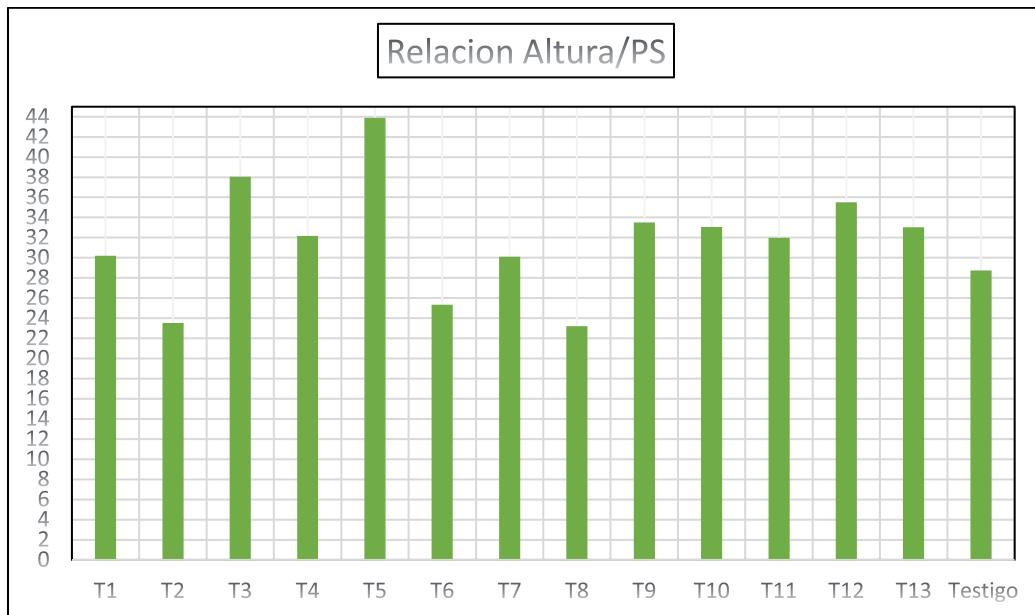


FIGURA 28: Relación entre altura de planta y peso seco promedio por tratamiento.

- **7) Relaciones entre las distintas variables evaluadas.**

Coeficientes de correlación para Altura de Tallo y Nº Total de Hojas:

Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
ALTURA DE TALLO	ALTURA DE TALLO	14	1,00	<0,0001
ALTURA DE TALLO	Nro. TOTAL DE HOJAS	14	0,01	0,9853
Nro. TOTAL DE HOJAS	ALTURA DE TALLO	14	0,01	0,9853
Nro. TOTAL DE HOJAS	Nro. TOTAL DE HOJAS	14	1,00	<0,0001

Figura 29: Tabla de Correlación de Pearson: Altura de tallo y Nº Total de hojas.

Coeficientes de correlación para Altura de Tallo y Altura de Planta:

Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
ALTURA DE TALLO	ALTURA DE TALLO	14	1,00	<0,0001
ALTURA DE TALLO	ALTURA DE PLANTA	14	0,13	0,6485
ALTURA DE PLANTA	ALTURA DE TALLO	14	0,13	0,6485
ALTURA DE PLANTA	ALTURA DE PLANTA	14	1,00	<0,0001

Figura 30: Tabla de Correlación de Pearson: Altura de tallo y Altura de planta.

Coeficientes de correlación para Altura de Tallo y Número de Hojas Caídas:

Variable (1)	Variable (2)	n	Pearson	p-valor
ALTURA DE TALLO	ALTURA DE TALLO	14	1,00	<0,0001
ALTURA DE TALLO	HOJAS CAÍDAS	14	0,21	0,4651
HOJAS CAÍDAS	ALTURA DE TALLO	14	0,21	0,4651
HOJAS CAÍDAS	HOJAS CAÍDAS	14	1,00	<0,0001

Figura 31: Tabla de Correlación de Pearson: Altura de tallo y Nº Hojas caídas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arzolay, Y. 2017. Caracterización de bacterias endosimbióticas de nódulos de leguminosas nativas del estado Guárico, mediante técnicas bioquímicas y moleculares. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
- Balatti, A. 1982. Culturing Rhizobium in large-scale fermentors. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Grahman, PH and Harris, SC, eds. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Balatti, A., 1992. Producción de inoculantes para leguminosas. Tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium. Sta. Rosa, Argentina, Noviembre. 152 p.
- Bellone, C. H. 2006. Fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Sección Publicaciones de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán. 223 p.
- Bellone, C. H., Carrizo de Bellone, S. 2006. Effects of ridley spaced trees and livestock grazing on understory environments in tropical savannas. Agroforestry Systems; 24:1-20.
- Bellone, C.H. 1999. Estimación de la fijación biológica del nitrógeno en algunas variedades de caña de azúcar cultivadas en la provincia de Tucumán. En Biología del Suelo Stegmayer, A., Pernasetti, D. Y Gomez Bello, C. pp. 259-261.
- Cabrera, A. G. 2010; Presencia de rizobios en algarrobos de diferentes edades en el dorsal agrícola chaqueño. Trabajo Final de Graduación (Modalidad tesina). UNNE. FCA.
- Carpena, R., Esteban, E., Lucena, J. J., Peñalosa, S., Vázquez, P., Zornoza, P., & Gárate, A. 2006. Simbiosis y fito recuperación de suelos. Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada. pp. 255-268.
- Coyne M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo. 416 pp
- Cuadrado, B., Rubio, G., & Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 38(1):78-104.
- Díaz, L. C., González, P., Rubio, E., & Melchiorre, M. 2013. Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. Biology and fertility of soils, 49(8): 1153-1165.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzani M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. 2008. Infostat, versión 2008. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Delwiche, C.C. 1981. The nitrogen cycle and nitrous oxide. In Delwiche, C.C. Ed. Desnitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide. John Wiley and Sons. New York. pp. 1-15.
- Döbereiner, J., Reis, V.M., Paula, M.A. and Olivares, F. 1993. Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. In New Horizons in Nitrogen Fixation. Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. (eds) Boston. Kluwer Academic. pp. 671-676.
- Felker, P., & Clark, P. R. 1981. Rooting of mesquite (*Prosopis*) cuttings. Journal of Range Management. pp. 466-468.
- Frioni, L. 1999. Procesos Microbianos. Tomo 1 y 2. Fundación de U.N.R.C. Río Cuarto. Córdoba.

- Frioni, L. 2006. Microbiología básica, ambiental y agrícola. Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 464 p.
- González, N., Perticari, A., de Gurfinkel, B. S., & Cáceres, E. R. 1997. Nutrición nitrogenada. El cultivo de la soja en la Argentina. Giorda L, Baigorri H, editores. INTA - SAGPyA. Editar, San Juan, Argentina. pp. 188-198.
- Huáman Medrano, E. A. 2014. Frecuencia de aislamiento de *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp. a partir de nódulos de *Vigna unguiculata* "frijol caipi" cultivado en suelos agrícolas de Chao y Virú-La Libertad, en Enero del 2014.
- Ibañez, J. M. 2014. Aislamiento de rizobios nativos a partir de plantines de algarrobo logrados en sustratos con compost. Trabajo Final de Graduación (Modalidad tesina). UNNE. FCA.
- Marschner, H. 1995. Functions of mineral nutrients: macronutrients. pp. 379-396.
- Microbiología Agrícola, 2016. Guía de Trabajos Prácticos. FCA. UNNE.
- Moreno-Chirinos, Z. E., Valdez-Núñez, R. A., Soriano-Bernilla, B. S., & Ruesta-Campoverde, N. A. 2016. Eficiencia en la nodulación por rizobios nativos, procedentes de nódulos de *Pisum sativum* "arveja" colectados de diferentes Departamentos del Perú. *Scientia Agropecuaria*, 7(SPE):165-172.
- Paredes, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Perticari, A., Arias, N., Baigorri, H., De Battista, J., Lett, L., Montecchia, M. & Vicentini, R. 2003. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. El libro de la soja. Quito: SEMA. pp. 69-76.
- Perticari, A. 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN. In Actas del Congreso Mundo Soja, Buenos Aires. Argentina. pp. 121-126.
- Postgate, J. R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. CUP Archive.
- Prokopiuk, D., & Chifa, C. 2000. Comparación de tratamientos pregerminativos en semillas de algarrobo blanco (*Prosopis alba* Grises). Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. UNNE. Chaco. Argentina.
- Ringuelet, A., & Gil, I. 2005. Fertilizantes y abonos. Alimentos para las plantas. Córdoba: Agencia Córdoba Ciencia. 2005. 30 p.
- Toledo, S. 2014. Presencia de rizobios nativos, micorrización y fijadores libres de nitrógeno y su relación con la actividad respiratoria y degradación de celulosa en suelos de algarrobales con pasturas. Trabajo Final de Graduación (Modalidad tesina). UNNE. FCA.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana.
- Velázquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernández, M. P., Muñoz, E., Mateos, P. F. & Gillis, M. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3):1011-1021.
- Vincent J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwells Scientific Publications. 164 p.
- Vincent, J. M. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Editorial Hemisferio Sur, S.R.L.
- Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Karaś, M., Wójcik, M., & Małek, W. 2017. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of *Ononis arvensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*. pp. 1-17.

- Zahran, H. H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of biotechnology*, 91(2):143-153.
- Zamioudis, C., Pieterse, C.M. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *MPMI*, 25(2):139-50.
- Zehr, J. P., Braun, S., Chen, Y., & Mellon, M. 1996. Nitrogen fixation in the marine environment: Relating genetic potential to nitrogenase activity. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 203(1):61-73.
- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M., & Lindström, K. 1991. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(1):104-113.

## ANEXOS

**Anexo 1: Tabla 1:** Características cualitativas de los 13 aislamientos en Placas de Petri para medio de cultivo sólido.

Nro. de Aislamiento	Tanda O Grupo de Aislados	Muestra de Suelo de donde Proviene (Toledo, 2015)	Tipo de Nódulo (1 – 5 mm)	Crecimiento en EMA	Presencia de Mucílago	Color de Colonia	Aspecto de Estría
1	3	Calle - Braquiaria	Grande	BUENO	SI	Rosa	seco poco continuo
2	3	Calle - Braquiaria	Pequeño	MUY BUENO	EXCESIVO	Rosa y R. oscuro	Gomoso poco continuo y seco gran parte
3	3	Bajo Copa - Braquiaria	Pequeño	MUY BUENO	EXCESIVO	Rosa	Mas gomoso que seco y poco continuo
4	2	Calle 3 – Braquiaria	Pequeño	MUY BUENO	SI	Rosa y R. oscuro	Gomoso continuo a discontinuo
5	2	Calle 2 - Braquiaria	Grande	BUENO	NO	Rosa	Seco superficial continuo a poco continuo
6	2	Calle 2' - Braquiaria	Pequeño	BUENO	SI	Rosa oscuro	Continuo algo gomoso
7	2	Calle – Gatton Panic	Grande	MUY BUENO	SI	Rosa oscuro	Gomoso pero más seco más o menos continuo
8	1	Fuera de copa – Gatton Panic	Grande	BUENO	NO	Rosa	Más seco y poco a continuo
9	1	Bajo Copa - Tanzania 2	Grande	BUENO	NO	Rosa	Poco gomoso seco y poco continuo
10	3	Calle - Tanzania	Grande	BUENO	SI	Rosa oscuro	Gomoso Continuo a poco continuo
11	3	Calle – Tanzania'	Grande	BUENO	NO	Rosa	Seco poco continuo
12	2	Calle – Tanzania 3	Mixto	MUY BUENO	SI	Rosa oscuro	Gomoso y continuo
13	1	Bajo Alambrado	Mixto	MUY BUENO	SI	Rosa y R. OSCURO	Gomoso y poco continuo el rosa oscuro y continuo y más seco el rosa
14	-	TESTIGO	-	-	-	-	-

**Anexo 2: Tabla 1:** Característica Cuantitativa: Comportamiento en el tiempo para repiques en Placas de Petri en medio de cultivo sólido.

Nro. Aislado	Tiempo de Crecimiento desde el nódulo:	Tiempo de Crecimiento como Aislamiento:	Tiempo en Heladera Entre 1° Aislamiento y 1° Repique:	Tiempo de Crecimiento Para 1° Repique:	Tiempo en Heladera entre 1° y 2° Repique:	Tiempo de Crecimiento para 2° Repique:
<b>1</b>	24 hs	24 hs	6 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>2</b>	24 hs	24 hs	6 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>3</b>	24 hs	24 hs	6 meses	48 hs	10 meses	36 hs
<b>4</b>	36 hs	72 hs	7 meses	48 hs	10 meses	88 hs + repique 24 hs
<b>5</b>	36 hs	72 hs	7 meses	48 hs	10 meses	40 hs
<b>6</b>	36 hs	72 hs	7 meses	48 hs	10 meses	40 hs + repique 24 hs
<b>7</b>	36 hs	72 hs	7 meses	48 hs	10 meses	40 hs
<b>8</b>	24 hs	24 hs	8 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>9</b>	24 hs	24 hs	8 meses	Más de 48 hs	10 meses	40 hs
<b>10</b>	24 hs	24 hs	6 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>11</b>	24 hs	24 hs	6 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>12</b>	36 hs	72 hs	7 meses	48 hs	10 meses	24 hs
<b>13</b>	24 hs	24 hs	8 meses	48 hs	10 meses	24 hs

**Anexo 2: Tabla 2:** Caracterización de aislamientos en medio de cultivo líquido: tubos de ensayo y vasos estériles.

Nro.	Tiempo De crecimiento en tubos (Shaker)	Tipo De crecimiento en tubos.	Tiempo De crecimiento en vasos estériles (Shaker)	Tipo De crecimiento en vasos estériles (3 días antes de siembra de ensayo)	Tiempo de crecimiento: Plaqueo en EMA sólido de 3 tratamientos para prueba.
<b>1</b>	4 días	BUENO	3 días	POCO TURBIO	-
<b>2</b>	4 días	BUENO	3 días	POCO TURBIO	24 hs
<b>3</b>	4 días	BUENO	3 días	TURBIO	-
<b>4</b>	4 días	REGULAR	3 días	TRANSLÚCIDO	-
<b>5</b>	4 días	REGULAR	3 días	POCO TURBIO	-
<b>6</b>	4 días	REGULAR	3 días	POCO TURBIO	-
<b>7</b>	4 días	MUY BUENO	3 días	POCO TURBIO	-
<b>8</b>	4 días	BUENO	3 días	TRANSLÚCIDO	-
<b>9</b>	4 días	REGULAR	3 días	TRANSLÚCIDO	-
<b>10</b>	4 días	BUENO	3 días	POCO TURBIO	24 hs
<b>11</b>	4 días	MALO	3 días	POCO TURBIO	-
<b>12</b>	4 días	MUY MALO	3 días	TRANSLÚCIDO	-
<b>13</b>	4 días	REGULAR	3 días	MUY TURBIO	24 hs

**ANEXO 3: Tabla 1:** Solución Nutritiva de Jensen (Vincent, 1970)**Composición Química de la Solución:**

- PO4HCA 1g
- PO4HK2 0.2g
- SO4Mg.7H2O 0.2g
- ClNa 0.2g
- Cl3Fe 0.1g
- H2O hasta 1000 ml
- Solución de Oligoelementos 1 ml (Gibson 1963) a razón de 1cc/litro:
  - Bo 0.05 % - H3BO3
  - Mn 0.05% - MnSO4
  - Zn 0.005% - ZnSO4
  - Mo 0.005% - NaMoO4.2H2O
  - Cu 0.002% - CuSO4

**ANEXO 4: Tabla 1:** Procedencia de las semillas.**Ficha de Procedencia:**

Proyecto “Planta Procesadora de Semillas de Prosopis y Áreas Semilleras”

Procedencia: L. 68 Cte. Fernández.

Especie: Prosopis Alba.

Huerto: 25 H 5336 J Pr Centro de Chaco, Lote cercano a vivero.

Vivero: Nº De Inscripción 5226J2.

Latitud: 26°46'19.58'' S.

Longitud: 60°33'22.70'' O.

PG: 95%.

Fecha de Recolección: 15/12/2013.

**ANEXO 5: Tablas de datos de variables en tres repeticiones evaluadas estadísticamente:**

- **1) Altura de planta.**

T	R	ALTURA DE PLANTA
1	1	7,3
2	1	4,4
3	1	7,8
4	1	10,3
5	1	10,9
6	1	9,6
7	1	9,1
8	1	8,3
9	1	5,8
10	1	8,8
11	1	7,5
12	1	5,7
13	1	8,8
14	1	6,9
1	4	8,6
2	4	6,4
3	4	8,5
4	4	8,5
5	4	8,6
6	4	5,6
7	4	7,9
8	4	3,2
9	4	9,4
10	4	7,5
11	4	9,5
12	4	10,5
13	4	8,2
14	4	5,2
1	5	3,3
2	5	9,8
3	5	6,8
4	5	8,8
5	5	9
6	5	5,1
7	5	8,7
8	5	7,6

9	5	9,5
10	5	8,2
11	5	6,7
12	5	6,9
13	5	9
14	5	7,5

- **2) Altura de tallo.**

T	R	16 Días	25 Días	30 Días	40 Días	45 Días	50 Días	60 Días	70 Días	75 Días	90 Días
1	1	1,2	1,8	2,1	2,3	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	2,7
2	1	1,7	1,6	2	2,4	2,5	2,6	2,6	2,9	2,9	2,4
3	1	1	1	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2
4	1	1,3	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,8	1,8	1,8	1,9
5	1	1,3	1,5	1,5	1,5	1,6	2	2	2	2	2
6	1	2,5	2,5	2,6	2,9	2,9	3	3,1	3,1	3,1	3,1
7	1	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	2,6	2,6
8	1	1	1	1	1,1	1,2	1,4	1,5	2	2,3	2,5
9	1	1,5	1,5	2	2	2	2	2	2,2	2,2	2,3
10	1	1,4	2	2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
11	1	1,3	1,2	1,3	1,6	1,7	1,9	2,1	2,3	2,4	2,4
12	1	2	2,4	2,6	2,6	2,6	2,8	3	3	3	3
13	1	1,5	1,8	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
14	1	1	1,2	1,3	1,5	2,7	2,7	2,8	2,8	2,8	3,1
1	4	1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,5	1,5
2	4	2	2,3	2,4	2,8	2,8	2,8	3,2	3,2	3,2	3,2
3	4	1,4	1,7	1,8	1,8	2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,2
4	4	2,3	2,6	1,8	2,8	2,8	3	3	3,2	3,2	3,2
5	4	2,2	2,1	2,1	2,2	2,2	2,4	2,4	2,4	2,2	2,2
6	4	1,5	1,4	1,8	1,8	1,8	1,8	2	2	2	2
7	4	2	1,8	2,1	2,2	2,5	2,6	2,6	2,6	2,6	2,7
8	4	0	1,6	1,6	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
9	4	0	1	1	0,9	1	1,2	1,3	1,6	1,6	1,6
10	4	2,4	2,6	2,5	2,7	2,6	2,6	3	3	3	3
11	4	1,9	1,9	1,9	1,9	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	3
12	4	3,1	3,1	3,3	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
13	4	2,1	2,1	2,1	2,3	2,5	2,4	2,7	2,7	2,7	2,7
14	4	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,6
1	5	0	1,4	1	0	0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

2	5	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2,4
3	5	0	1,1	1	1	1	1,1	1,8	1,8	1,8	1,8
4	5	2,3	2,1	2,1	2,1	2,2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,2
5	5	1,3	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2	2
6	5	1,4	1,5	1,6	1,8	2	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
7	5	0	2,3	2,3	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
8	5	0	1	1	1,1	1,1	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4
9	5	1,8	1	1	0,9	1,3	1,9	1,5	1,9	2	2,2
10	5	1,9	1,8	1,8	2,1	2,1	2,3	2,3	2,4	1,9	2,3
11	5	1,2	1,6	1,6	1,7	1,8	2	2	2	2,3	2,3
12	5	2	2	2,2	2,4	2,4	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
13	5	1	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
14	5	1	1,3	1,3	1,3	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,9

• 3. a) Nº Total de hojas.

T	R	16 Días	25 Días	30 Días	40 Días	45 Días	50 Días	60 Días	70 Días	75 Días	90 Días
1	1	1	2	4	5	6	6	6	7	7	7
2	1	1	3	3	4	5	5	5	5	6	5
3	1	0	1	3	3	3	3	6	6	6	6
4	1	1	3	3	5	5	7	7	7	9	9
5	1	1	3	4	4	5	5	6	6	7	8
6	1	1	3	4	5	6	6	7	7	7	8
7	1	1	3	3	4	5	5	7	7	7	8
8	1	1	3	3	4	5	5	6	6	6	9
9	1	1	3	3	3	3	4	5	5	5	7
10	1	1	3	3	4	4	5	5	6	7	7
11	1	1	3	4	5	6	6	6	6	7	8
12	1	0	1	3	5	6	8	9	9	9	9
13	1	1	3	3	4	4	5	6	6	7	8
14	1	0	1	4	6	6	6	6	6	6	8
1	4	1	3	3	4	5	5	6	6	6	7
2	4	1	3	3	3	4	5	5	5	5	6
3	4	1	3	4	4	5	5	6	6	6	8
4	4	1	3	2	3	4	4	4	5	7	7
5	4	1	3	3	5	6	6	8	8	9	10
6	4	1	3	2	4	5	5	5	5	5	6
7	4	0	3	4	5	6	6	6	7	7	7
8	4	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3

9	4	0	0	2	4	5	5	7	7	7	8
10	4	1	3	3	3	4	4	5	5	6	7
11	4	1	2	3	5	5	6	6	7	7	9
12	4	0	1	5	7	7	8	8	8	8	9
13	4	1	3	3	4	5	6	6	6	7	9
14	4	0	1	2	4	4	5	5	6	6	6
1	5	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3
2	5	1	3	4	5	4	7	7	7	7	8
3	5	0	5	4	5	5	5	6	6	7	8
4	5	1	3	3	3	4	4	5	5	5	7
5	5	1	3	3	3	4	5	6	6	6	8
6	5	1	3	3	4	5	5	5	5	5	5
7	5	0	3	4	5	5	6	6	6	6	9
8	5	1	3	4	6	7	7	7	8	8	10
9	5	0	2	4	5	7	7	7	8	8	10
10	5	1	3	3	4	5	6	6	6	6	7
11	5	1	3	3	4	5	5	6	6	6	8
12	5	1	3	3	3	4	5	5	5	5	6
13	5	1	3	3	5	5	6	6	6	6	9
14	5	0	1	2	2	4	4	6	6	6	6

- **4) Nº de hojas caídas.**

T	R	40 Días	45 Días	50 Días	60 Días	70 Días	75 Días	90 Días
1	1	2	2	2	2	3	3	3
2	1	1	0	2	2	3	3	3
3	1	0	0	0	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1	2	2	3
5	1	0	0	0	0	1	1	2
6	1	0	0	1	1	2	2	3
7	1	0	1	1	1	2	2	3
8	1	0	0	1	1	2	2	2
9	1	0	0	1	1	1	1	1
10	1	0	0	0	0	1	1	1
11	1	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	3	5	5	5	5	5
13	1	0	0	1	1	2	2	2
14	1	0	0	0	3	3	3	3
1	4	0	0	0	1	1	1	2

2	4	0	0	0	0	0	0	1
3	4	0	0	0	0	1	1	2
4	4	0	0	0	0	0	0	1
5	4	0	0	3	3	3	3	4
6	4	0	0	0	0	0	0	2
7	4	3	3	3	3	3	3	3
8	4	0	0	0	0	0	0	1
9	4	0	1	1	1	2	2	3
10	4	0	0	0	0	0	0	0
11	4	0	0	0	1	2	2	2
12	4	0	1	4	4	4	4	5
13	4	0	0	1	1	2	2	3
14	4	0	0	0	0	1	1	1
1	5	0	0	0	0	0	0	0
2	5	0	0	2	2	2	2	3
3	5	0	0	1	2	2	2	2
4	5	0	0	0	2	2	2	2
5	5	1	0	0	0	2	2	2
6	5	1	0	0	0	0	0	0
7	5	0	2	2	2	2	2	2
8	5	0	2	2	2	2	2	3
9	5	0	0	1	2	3	3	3
10	5	0	1	1	1	1	1	2
11	5	0	0	0	0	1	1	2
12	5	0	0	0	0	1	1	2
13	5	0	0	1	1	1	1	3
14	5	0	0	0	1	1	1	1

- 5) Peso seco.

T	R	PESO SECO
1	1	0,236
2	1	0,275
3	1	0,18
4	1	0,245
5	1	0,334
6	1	0,273
7	1	0,28
8	1	0,169
9	1	0,184

10	1	0,262
11	1	0,169
12	1	0,169
13	1	0,191
14	1	0,202
1	4	0,284
2	4	0,256
3	4	0,23
4	4	0,341
5	4	0,26
6	4	0,296
7	4	0,303
8	4	0,274
9	4	0,265
10	4	0,294
11	4	0,31
12	4	0,185
13	4	0,308
14	4	0,215
1	5	0,271
2	5	0,266
3	5	0,196
4	5	0,278
5	5	0,282
6	5	0,184
7	5	0,245
8	5	0,221
9	5	0,367
10	5	0,255
11	5	0,205
12	5	0,301
13	5	0,18
14	5	0,239

- **6) Relación Atura/Peso seco.**

T	R	RELACION ALTURA DE PLANTA Y PESO SECO
1	1	30,9
2	1	12
3	1	47,7
4	1	17,9
5	1	29,3
6	1	23,4
7	1	27,8
8	1	40,2
9	1	46,1
10	1	39,3
11	1	52
12	1	5,2
13	1	57
14	1	44,5
1	4	30,2
2	4	37,5
3	4	22,1
4	4	16,4
5	4	35
6	4	29,3
7	4	26
8	4	30,2
9	4	28,6
10	4	10,8
11	4	18,7
12	4	51,3
13	4	30,5
14	4	40,9
1	5	30,2
2	5	28,1
3	5	38,2
4	5	24,1
5	5	33,6
6	5	30,9
7	5	28,1
8	5	47,5
9	5	23,9

10	5	35,2
11	5	40
12	5	22,9
13	5	41,6
14	5	21,7