

RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez
Claudio Penna & Fabricio Cassán
EDITORES

ISBN 978-987-26716-1-7



Asociación Argentina de Microbiología
República Argentina
2013

RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez
Claudio Penna & Fabricio Cassán
EDITORES

RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez
Claudio Penna & Fabricio Cassán
EDITORES

Publicación Electrónica del Taller Internacional sobre
Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable 2010

Desarrollado el 21 y 22 de Octubre de 2010.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina

ISBN 978-987-26716-1-7



Asociación Argentina de Microbiología
República Argentina

2013

Rizosfera, biodiversidad y agricultura sustentable / Inés García de Salamone ... [et.al.]; edición literaria a cargo de Inés García de Salamone.
1a ed. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología; Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez, Claudio Penna, Fabricio Darío Cassán, 2012.

E-Book.

ISBN 978-987-26716-1-7

1. Biología de Suelos. I. García de Salamone, Inés II. García de Salamone, Inés, ed. lit.
CDD 631.46

Fecha de catalogación: 21/11/2012

RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez
Claudio Penna & Fabricio Cassán
EDITORES

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Impreso en Argentina – Printed in Argentina.

Queda prohibida la reproducción total o parcial del texto de la presente obra en cualquiera de sus formas, electrónica o mecánica, sin el consentimiento previo y escrito de la Editorial.

Asociación Argentina de Microbiología

Dean Funes 472 (C1214AAD). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Bs. As. Argentina.
Teléfonos: (54-11) 4932-8948 (54-11) 4932-8858.
Correo Electrónico: info@aam.org.ar
Sitio Web: <http://www.aam.org.ar/>



Comité Organizador TIRBAS 2010

Inés Eugenia García de Salamone
Fabricio Cassán
Claudio Penna
Susana Vázquez
Diego Sauka

Comisión Directiva AAM 2010-2011

Presidente	Manuel Gómez Carrillo
Vicepresidente	Marta Rocci
Secretaria	María Cecilia Freire
Secretaria de actas	María I. G. Fernández
Prosecretaria	Alejandra Picconi
Tesorera	Adriana De Pasulis
Protesorero	Claudio Penna
Vocal Titular 1º	Jorge Santoianni
Vocal Titular 2º	María José Gallego
Vocal Titular 3º	Marta Rivas
Vocal Titular 4º	María Soledad Ramirez
Vocal Suplente 1º	Adriana Sucari
Vocal Suplente 2º	Diego Sauka
Vocal Suplente 3º	Manuel Boutoureira
Vocal Suplente 4º	Gustavo Giusiano

Comisión Directiva DIMAYA/AAM 2010-2011

Presidente	Fabricio Cassán
Vicepresidente	Claudio Penna
Secretario	Diego Sauka
Tesorera	Inés García de Salamone
Secretaria de actas	Susana Vázquez
Vocal Titular 1º	Lucas Ruberto
Vocal Titular 2º	Rosana Massa
Vocal Suplente 1º	Mónica Baldini
Vocal Suplente 2º	Diego Libkind

Índice de Contenidos

Prólogo..... 13

Inés Eugenia García de Salamone

Capítulo 1

Efecto de las prácticas agronómicas sobre las bacterias deletéreas rizosféricas y endofitas 15

Effect of agronomic practices on deleterious rhizosphere and endophytic bacteria
Marleny Burkett-Cadena, Camilo A. Ramirez, Mark R. Liles, Joseph W. Kloepper

Capítulo 2

Interacciones entre fitopatógenos y microorganismos benéficos en la rizosfera 33

Interactions among plant pathogens and beneficial rhizosphere microorganisms
Marta C. Rivera, Eduardo R. Wright

Capítulo 3

Hongos formadores de micorrizas arbusculares: Influencia de las prácticas agronómicas sobre su diversidad y dinámica de colonización 47

Arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of agronomic practices on diversity and dynamics of colonization
Santiago Schalamuk, Magdalena Druille, Marta N. Cabello

Capítulo 4

Huellas de la simbiosis pasto-endofito en el agroecosistema 73

Footprints of grass-endophyte symbiosis in agroecosystems
Marina Omacini, Pedro E. Gundel, María Semmartin

Capítulo 5

***Bacillus thuringiensis* y su utilidad en el control de insectos asociados a la rizosfera 89**

Bacillus thuringiensis and their utility in the control of insects associated to the rhizosphere
Diego H. Sauka; Rodrigo H. Monella, Graciela B. Benintende

Capítulo 6

Nematodos como indicadores de la calidad del suelo: Efectos de la fertilización nitrogenada 109

Nematodes as indicators of soil quality: Effects of nitrogen fertilization
Claudia Viviana Azpilicueta, María Cristina Aruani

Capítulo 7

Perfil Fisiológico de Comunidades de Suelo Basado en el Consumo de Oxígeno 123

Community-Level Physiological Profiling of Soil Communities Based on Oxygen Consumption

Jay L. Garland, M. Celina Zabalo

Capítulo 8

Bacterias solubilizadoras de fósforo como biofertilizantes: aislamiento, caracterización, diversidad y promoción del crecimiento vegetal 137

Phosphate solubilizing bacteria as biofertilizers: isolation, characterization, diversity and growth vegetable promotion

Leticia A. Fernández, Marcelo A. Sagardoy

Capítulo 9

Investigación aplicada en *Azotobacter* sp. dirigida a la promoción de crecimiento en cultivos de interés económico en Colombia 151

Azotobacter sp. applied research aimed to growth promotion of crops with economics interest in Colombia

Ruth Rebeca Bonilla, René Novo, Belisario Roncallo, Mauricio Camelo, Paola Criollo, Germán Andrés Estrada, María Fernanda Garrido, Mónica López, Andrés Eduardo Moreno, Melissa Obando, Lorena Parra, Diego Mauricio Rivera, Daniel Fernando Rojas, Mario Van Strahlen, Corina Zambrano

Capítulo 10

El género *Pseudomonas* en suelos agrícolas y en rizosfera. De moléculas a comunidades 173

Pseudomonas in agricultural soils and rhizosphere. From molecules to communities

Betina Agaras, Claudio Valverde

Capítulo 11

Asociación entre *Azospirillum brasilense* y plantas de frutilla (*Fragaria ananassa*): quimiotaxis y colonización radicular 195

Association between *Azospirillum brasilense* and strawberry plants

(*Fragaria ananassa*): chemotaxis and root colonization

Raúl O. Pedraza, María F. Guerrero-Molina, Beatriz C. Winik, María L. Tortora, Alicia L. Ragout, Katia R. Teixeira, Beatriz E. Baca

Capítulo 12

Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias 215

Ethylene as a mediator of direct and indirect mechanisms carried out by plant growth promoting rhizobacteria

Claudia M. Ribaudó, Daniela S. Riva, José A. Curá, Clara Ponds, Antonio Granell-Richart, María L. Cantore

Capítulo 13

Más allá del tratamiento a las semillas: Evolución de productos basados en PGPRs que contienen complejas comunidades microbianas 241

Beyond seed treatments: evolution of PGPR products containing complex microbial communities

Joseph W. Kloepper, Juan David Castillo, Marleny Burkett-Cadena, Katheryn S. Lawrence

Capítulo 14

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal como componentes en el mejoramiento ambiental 261

Plant growth-promoting bacteria as a component for environmental improvement

Luz E. de-Bashan, M.C. Juan-Pablo Hernández, Yoav Bashan

Capítulo 15

Diversidad funcional de comunidades microbianas rizosféricas en suelos expuestos a sustancias contaminantes 287

Functional diversity of rhizosphere microbial communities in soils exposed to contaminants

Jhovana S. Escobar Ortega, Agr. Luciana P. Di Salvo, Florencia D'Auria, Sebastian M. Gatica, Inés E. García de Salamone

Capítulo 16

Acumulación y tolerancia al metal pesado cadmio en rizobios de vida libre y en simbiosis con leguminosas 307

Accumulation and tolerance to heavy metal cadmium in free-living rhizobia and in symbiosis with legumes

Stella Castro, Eliana Bianucci, Jérica Rivadeneira, María del Carmen Tordable, Adriana Fabra, Juan Sobrino-Plata, Luis Hernández, Ramón Carpena-Ruiz

Capítulo 17

Micorrizorremediación como alternativa para la recuperación de suelos contaminados por actividades mineras 325

Myco-rhizoremediation as alternative for recovering soils polluted by mining activities

Pablo Cornejo, Sebastián Meier, César Arriagada, Fernando Borie

Prólogo

Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable son temas muy amplios y mutlidisciplinarios por naturaleza. Numerosos científicos de áreas tales como ciencias del suelo, producción y protección de cultivos han centrado sus investigaciones en los mismos y la información disponible actualmente puede abordarse desde un punto de vista holístico. Durante las últimas décadas, ha habido avances significativos y se han hecho evidentes las conexiones entre la sustentabilidad de los agroecosistemas y el mantenimiento de la biodiversidad. Por su parte, las raíces aun siguen siendo un desafío de investigación pero se ha esclarecido su influencia sobre los ciclos biogeoquímicos y se ha avanzado significativamente en el conocimiento de las asociaciones entre organismos en el ambiente de la rizosfera.

Este libro tiene diecisiete capítulos y brinda tanto información balanceada como conocimiento integral de la rizosfera. El mismo pretende colaborar con la comprensión sobre varios aspectos que son la base para lograr sustentabilidad agrícola y ambiental. Los capítulos 1, 2 y 3 analizan diversos aspectos de los efectos de las prácticas agronómicas sobre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares, bacterias benéficas y deletéreas de la rizosfera. Los cambios que se producen por el manejo inadecuado de los sistemas agrícolas pueden conducir a cambios en las comunidades microbianas que puede provocar la producción exagerada de metabolitos nocivos para las plantas. En el capítulo 4 se describen los aspectos biológicos, ecológicos y agronómicos mas relevantes de la simbiosis entre pastos y hongos endófitos asexuales y se resumen los conocimientos actuales acerca de las vías por las cuales pueden modificar las relaciones que establecen las plantas hospedantes con la biota del suelo, a corto y a largo plazo y así modular la estructura y el funcionamiento de las comunidades. También se identifican los vacíos de conocimiento acerca de las implicancias de esta simbiosis en el manejo del agroecosistema y en qué medida existen alternativas para manipularla de manera tal que favorezca una menor utilización de insumos. Los capítulos 5 y 6 analizan las comunidades de nematodos e insectos asociados a la rizosfera. Por su parte, el capítulo 7 analiza los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas edáficas utilizando una metodología basada en la evaluación del consumo de oxígeno frente a la utilización de distintas fuentes de carbono. En este libro se pueden encontrar varios capítulos que analizan las comunidades de distintas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) tales como bacterias solubilizadoras de fósforo del suelo

(capítulo 8), como la aplicación del género *Azotobacter* (capítulo 9), *Pseudomonas* (Capítulo 10), *Azospirillum brasilense* (capitulo 11). Los capítulos 12 y 13 incluyen un análisis detallado de mecanismos directos e indirectos sobre el crecimiento vegetal de varias rizobacterias. Los dos capítulos siguientes están dedicados a algunos modelos de utilización de PGPB como herramienta del mejoramiento ambiental (Capitulo 14) y a la caracterización de la diversidad funcional observada en las comunidades microbianas rizosféricas en suelos expuestos a sustancias contaminantes (Capítulo 15). Los dos últimos capítulos analizan el efecto de la contaminación con el metal pesado cadmio sobre las comunidades de rizobios tanto libres como en asociación con plantas leguminosas (Capítulo 16) y la micorrización como una alternativa para recuperar suelos contaminados por actividades mineras (Capitulo 17).

Este libro no es una revisión enciclopedista. Sin embargo, un énfasis internacional ha sido dedicado a las tendencias y probables futuros desarrollos. Los capítulos incluyen tanto aspectos teóricos como prácticos y seguramente podrán servir de base para el diseño de futuros trabajos de investigación a través de los cuales nuevos y significativos desarrollos pueden ser esperados. Esta obra será probablemente útil para asesores agronómicos, estudiantes, docentes, e investigadores tanto de universidades e institutos de investigación trabajando en áreas vinculadas a la microbiología agrícola y ambiental, salud y calidad del suelo como pilar de la agricultura sustentable.

En base a lo expresado hasta aquí, con gran placer y satisfacción quisiera expresar mi inmensa gratitud a todos los autores por sus contribuciones y por su paciencia sin límites, así como, también por su apoyo y comprensión constante durante el proceso de generación de este libro. Además, quisiera agradecer el apoyo de la Asociación Argentina de Microbiología (AAM) y a los miembros del comité editor de la División de Microbiología Agrícola y Ambiental (DIMAYA-AAM) por facilitar y gestionar los medios económicos y administrativos para la concreción de este libro que ha sido titulado: **Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable.**

Inés Eugenia García de Salamone

Ing. Agr., M.Sc., Ph.D.

Responsable del Comité Editor

Capítulo 1

Efecto de las prácticas agronómicas sobre las bacterias deletéreas rizosféricas y endofitas

Effect of agronomic practices on deleterious rhizosphere and endophytic bacteria

Marleny Burkett-Cadena ^{a,1}, Camilo A. Ramirez ^b, Mark R. Liles^c, Joseph W. Kloepper^a

^aDepartment of Entomology and Plant Pathology, Auburn University, Auburn, AL 36849 USA.

^bInstituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ^cDepartment of Biological Sciences, Auburn University, Auburn, AL 36849 USA. ¹Corresponding author.

E-mail: cadenma@auburn.edu

Introduction

Agronomic practices are well known to affect soil microorganisms (Lupwayi et al. 1998). The effects of tillage (Ceja-Navarro et al. 2010), cover crops (Carrera et al. 2007), crop rotation (Buyer et al. 2010), and applications of pesticides (Allison et al. 2007), fertilizers (Jangid et al. 2008), and soil disinfectants (Roux-Michollet et al. 2008) on soil microorganisms have been documented on many crops. For example, positive effects have been shown in agricultural systems with reduced tillage, cover crops or crop rotation, indicating that these practices increased soil microbial diversity and activity (Ceja-Navarro et al. 2010; Yin et al. 2010; Lupwayi et al. 1998). Likewise, green manures and crop rotations can enhance soil bacterial population density and reduce plant disease incidence through stimulation of antagonists (Wiggins, Kinkel, 2005). Soil amended with poultry litter has higher bacterial diversity than inorganically fertilized soils (Carrera et al. 2007). The effect of some agronomic practices on soil microorganisms can also have negative consequences for plant growth. Deleterious rhizobacteria (DRB), for instance, have been linked with reduced plant growth in systems with continuous pesticide use and for monoculture crops (Schippers et al. 1987; Stroo et al. 1988). Rhizosphere and root-colonizing microorganisms represent a highly diverse microbial assemblage that metabolizes the nutrients exuded by roots and interacts closely with plants (Kluepfel, 1993). Only a minority of rhizosphere microbes have been examined thoroughly for their relative importance in mediating beneficial plant-microbial interactions (Compant et al. 2010). Several rhizobacterial isolates are used as biological control agents or plant growth promoters (Raaijmakers et al. 2009). However, the plant-rhizobacteria interaction does not always result in enhanced plant growth or health, as some rhizobacteria cause deleterious effects on plant growth (Kremer, 2007).

Given the importance of soil microorganisms for soil health, quality, and nutrient cycling, it is important to determine the effect of agronomic practices on soil microbial ecology. This manuscript reviews literature and presents new data on the response of the rhizosphere and endophytic bacteria to two common agronomic practices used to manage pathogens: the application of systemic fungicides and soil steaming.

Rhizosphere bacteria: deleterious and beneficial

The concept of deleterious rhizobacteria (DRB) initially emerged as a way to explain possible mechanisms of growth promotion by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). The original concept was that plant growth is promoted by PGPR and reduced by DRB, and it is the balance between the two that affects the overall plant growth. PGPR and DRB are both described as non-infective rhizobacteria, because they do not parasitize plants nor colonize vascular tissues at high populations, but are aggressive root colonizers able to antagonize other rhizosphere microorganisms (Kremer, 2007).

DRB have been isolated from a variety of crops such chrysanthemum (Burkett-Cadena et al. unpublished data), potatoes (Sturz et al. 2000), carrots (Surette et al. 2003), citrus (Gardner et al. 1985), peas (Berggren et al. 2001), and peach (Benizri et al. 2005). These crops exhibited detrimental responses associated with the presence of specific bacterial strains, while no other explanation such as disease symptoms, presence of pathogens, or nutritional deficiency could be identified. Several bacterial groups have the potential to induce deleterious plant effects, and among soil bacteria the fluorescent pseudomonads are the most commonly reported DRB in the literature (Kremer, 2007).

The positive effects of PGPR on plants occur through multiple mechanisms (Bottini et al. 2004; Compant et al. 2010; Patten, Glick, 2002; Rodríguez, Fraga, 1999). Similarly, multiple mechanisms are involved in the inhibition of plant growth by DRB. Production of cyanide, plant growth regulators (auxins), antibiotics, and/or phytotoxic metabolites by DRB can induce detrimental effects in plants (Bakker, Schippers, 1987; Boel et al. 1993; Kremer, Souissi, 2001). For example, indole acetic acid (IAA) is a metabolite involved in mediating the deleterious effect(s) of DRB. IAA is a phytohormone that can be synthesized by different bacterial groups, including plant pathogenic and beneficial bacteria (Omer et al. 2004). The effect of IAA on root growth is highly dependent on the concentration to which roots are exposed. Promotion of root growth occurred at low IAA levels (i.e., 5 µg/ml), whereas inhibition of root growth occurred when IAA levels were high (i.e., 72 µg/ml) (Barazani, Friedman, 1999). In another study, inhibition of sugar beet root growth was correlated with IAA concentrations produced by *P. fluorescens* and *P. putida* rhizobacteria (Loper and Schroth, 1986). Similarly, studies by Sarwar and Kremer (1995) and Xie et al. (1996) found a correlation between concentration of IAA produced by rhizobacteria and root growth in different plant models, with high levels resulting in deleterious effects on plant growth.

Soil steaming and its effects on soil and rhizosphere bacteria

Soil steaming is a disinfection method to reduce soil-borne pathogens and weeds in open fields and greenhouses. Steaming was developed in Germany in the early 1800s and in 1890s it was first commercially used in the United States. Baker and Olsen (1960) conducted some of the first research on pasteurization via soil steaming for the elimination of soil-borne plant pathogens (Baker, 1962). Their studies included using steamed soil in combination with a «retarding organism» (antagonist) to prevent damping off of bedding plants caused by *Rhizoctonia solani*.

The temporal dynamics of soil microbial communities following steam disinfection have been studied. Roux-Michollet et al. (2008) showed that over a 60-day period steaming caused significant decreases in the activity and culturable counts of the bulk soil microbial community, and induced changes in its composition with nitrifying bacteria being the most negatively affected (Roux-Michollet et al. 2008). A study of DRB in a commercial flower monoculture in Colombia found that the primary bacterial groups associated with a reduction in chrysanthemum growth in a steamed soil were the fluorescent pseudomonads. Steaming was used to disinfest the soil prior to cultivation and, therefore, to manage soil-borne pathogen populations. In addition, tests in a greenhouse pot assay revealed that consecutive steaming reduces the microbial populations post-steaming, and that after planting the populations of fluorescent pseudomonads increase rapidly in the chrysanthemum rhizosphere (Burkett-Cadena et al. unpublished data).

Effects of fungicide application on rhizosphere and endophytic bacteria- A field study case

Leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*) is an important commodity used in flower arrangements because fronds are highly symmetrical and have a long shelf-life after harvest. Distortions in frond shapes were reported in Florida during the 1980s, coinciding with widespread use of the systemic fungicide Benlate DF (Mills et al. 1996). Benlate was also reported to increase populations of phytotoxic fluorescent pseudomonads in the leatherleaf fern rhizosphere (Kremer et al. 1996). The name «fern distortion syndrome (FDS)» was proposed in 2010 for the problem of distorted fronds (Kloepper et al. 2010).

FDS was found to be present in farms where leatherleaf fern was successively cultivated in the same field, which is in agreement with Schippers et al. (1987) who pointed out that allelopathic bacteria may arise in areas where one crop is grown successively. In addition, the incidence and severity of FDS in Costa Rica were found to relate to endophytic populations of fluorescent pseudomonads inside fern rhizomes (Kloepper et al. 2010). These results and observations made in Costa Rica suggested «a model of latent infections of allelopathic or deleterious bacteria that induce damage when a threshold population is reached» (Kloepper et al. 2010). Those deleterious or allelopathic bacteria

could reduce or alter normal plant growth via production of allelochemicals such as IAA, which was reported by Barazani and Friedman, (1999) to be related to allelopathic effects of some rhizosphere bacteria. The strong association between FDS and fluorescent pseudomonads observed in Costa Rican ferns suggested that future work should characterize these fluorescent pseudomonads for production of IAA and other allelopathic effects in a plant bioassay.

The overall aim of the current study was to examine the relationship of Benlate to FDS and to its effect on pseudomonad populations. The objectives of the study were 1) to determine if leatherleaf fern grown in Florida with a history of Benlate use had greater populations of fluorescent pseudomonads than ferns grown without Benlate use; 2) if Benlate treatment of rhizomes affects fluorescent pseudomonad populations; and 3) if the fluorescent pseudomonads associated with FDS produce IAA and exhibit allelopathic effects in a cucumber seed bioassay.

Ratings of FDS, and sampling for fluorescent pseudomonads

Two ferneries were selected for the study, KHD with a history of Benlate use and Floricrops without Benlate use (Mills et al. 1996). Both ferneries were near Deland, Florida and were less than 500 m apart. In October of 2005 each fernery was rated to determine the incidence and severity of FDS using the 4-point rating system developed in Costa Rica (Kloepper et al. 2010). The results of FDS ratings (Table 1) indicated that all four quadrants at Floricrops had significantly lower fern deformation incidence and severity than all four blocks of KHD. The average incidence at Floricrops was 11%, while it was 90.25% at KHD.

Table 1.
Incidence and severity of fern deformation at KHD and Floricrops.

Fernery	History of Benlate use	Quadrant Location	Incidence	Mean Severity*
Floricrops	No	Southeast	21%	0.21 ^c
		Northeast	7%	0.07 ^c
		Northwest	9%	0.10 ^c
		Southwest	7%	0.07 ^c
KHD	Yes	Northwest	86%	1.34 ^b
		Southwest	92%	1.58 ^a
		Southeast	90%	1.79 ^a
		Northeast	93%	1.40 ^b
LSD _{0.01}				0.22

*Means followed by different letters are significantly different at $P = 0.01$.

Bacterial populations were determined in the rhizosphere, rhizomes, and petioles from asymptomatic plants at Floricrops and from asymptomatic and damaged plants at KHD. Results from these isolations in 2005 during the months of September (Table 2) and October (Table 3) generally indicated higher populations of total bacteria and fluorescent pseudomonads (FPs) from ferns with damage in the Benlate-treated fernery (KHD) than from healthy ferns in the control fernery (Floricrops). Total culturable bacteria counts (on 10% TSA) from the rhizosphere of plants from Floricrops were significantly lower than those from plants from KHD. Similarly, total bacteria within the rhizomes or petioles of plants at Floricrops were significantly lower than those from at least one of the treatments from KHD. Populations of fluorescent pseudomonads (on King's B) followed the same trend as the total bacterial populations. At the 95% probability level, the population in the rhizosphere was highest in deformed plants from KHD, next highest in normal-appearing plants at KHD, and lowest with plants from Floricrops. Within rhizomes and petioles the population of fluorescent pseudomonads was significantly lower (99% probability) in plants from Floricrops than from KHD.

Table 2.

Bacterial populations from Floricrops and KHD ferneries, September, 2005*.

Sample no.	Rhizosphere		Intra-rhizome		Intra-petiole	
	Total bacteria (log cfu/g)	Fl. Pseudo. (log cfu/g)	Total bacteria (log cfu/g)	Fl. Pseudo. (log cfu/g)	Total bacteria (log cfu/g)	Fl. Pseudo. (log cfu/g)
1. Floricrops asymptomatic	6.16 B	5.25 B,c	4.15 b	0.14 B	4.58 b	0.00 b
2. KHD asymptomatic	6.66 A	5.75 A,b	4.50 a	2.25 A	5.45 a	0.91 a
3. KHD deformed	6.93 A	6.03 A,a	4.27 ab	2.02 A	4.43 b	1.32 a
LSD _{0.01}	0.45	0.32	0.31	0.37	1.06	0.93
LSD _{0.05}	0.33	0.24	0.23	0.27	0.79	0.69

* Means followed by different letters are significantly different. Capital letters indicate significance at $P \leq 0.01$; lower case letters indicate significance at $P \leq 0.05$.

Table 3.

Bacterial populations from Floricrops and KHD ferneries, October, 2005*.

Sample no.	Rhizosphere		Surface of rhizomes	
	Total bacteria (log cfu/g)	Fl. Pseudo. (log cfu/g)	Total bacteria (log cfu/g)	Fl. Pseudo. (log cfu/g)
1. Floricrops asymptomatic	6.31 B*	5.12 B	2.81 B	1.35 B
2. KHD asymptomatic	6.64 A	6.08 A	3.33 A	2.33 A
3. KHD deformed	6.72 A	6.19 A	3.36 A	2.53 A
LSD _{0.01}	0.45	0.32	0.31	0.37

* Means followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$.

In addition to culturable bacterial counts, culture-independent PCR-DGGE analysis was conducted using DNA extracted from rhizosphere samples and from the surface of the rhizomes. Total community DNA was extracted using the Ultraclean™ Soil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, USA). Bacterial 16S rRNA gene amplicons were amplified using the primers 968-GC and 1401 R (Smalla et al. 2001). For amplification of *Pseudomonas* spp. the primer system 311Ps and R1459Ps described by Milling et al. (2004) was used. For amplification of *Bacillus* spp. and related taxa the primer BacF described by Garbeva et al. (2003) was used in combination with the universal bacterial primer 1401R. In all cases the recommended thermalcycling conditions for the respective primer sets was used, and equal amounts of genomic DNA template (50 ng) were added to each reaction. The presence of amplicons was verified by agarose gel electrophoresis prior to resolution on a DGGE gel. A 45% to 60% denaturing gradient within an 8% polyacrylamide gel was prepared. The DGGE was performed in 1X TAE at 60 °C and a constant voltage of 100 V for 16 h. Individual DGGE bands were quantified and compared by densitometry using SigmaStat program. The DGGE analyses generally supported the enumeration results, with no significant changes observed using bacteria domain-level or *Bacillus* genus-level primer sets (data not shown). In contrast, *Pseudomonas*-specific amplicons from KHD were increased 132% compared to samples from Floricrops (Figure 1), but there were no differences observed in *Pseudomonas* taxa composition based on DGGE (data not shown). This supports the conclusion that overall numbers of FPs were greater at KHD, but the relative abundance of different *Pseudomonas* spp. was not significantly altered.

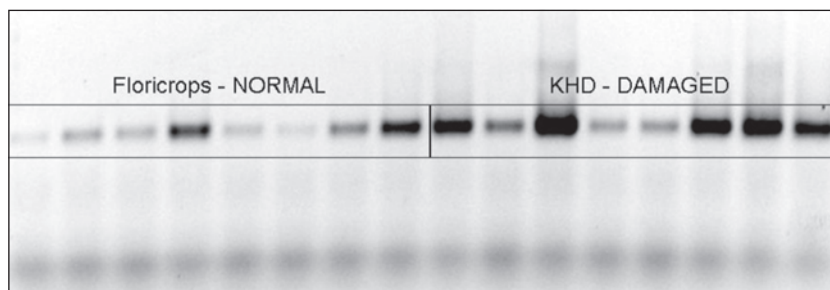


Figure 1: Intensity of *Pseudomonas* 16S rRNA amplicons in 8 replicate samples of rhizospheres from healthy plants at Floricrops (left) and from damaged plants at KHD (right).

Rhizome diameter, root weight, and microscopy of rhizomes checking for natural openings

It was previously reported that ferns with symptoms of FDS in Costa Rica had smaller rhizome diameters and reduced root weight (Kloepper et al. 2010). Results from sampling in Florida revealed the same trend (Table 4). The largest rhizome

diameters were observed in asymptomatic plants from Floricrops, with a mean rhizome diameter significantly greater than that of rhizomes from asymptomatic or deformed plants from KHD. Deformed plants at KHD had a significantly smaller rhizome diameter than asymptomatic plants at KHD (Figure 2). Asymptomatic plants at Floricrops had a much greater root weight compared to plants at KHD, especially deformed KHD plants that had rhizomes with irregularly shaped growing tips compared to rhizomes from asymptomatic plants (Figure 2).

Table 4.

Rhizome and Root effects in Florida Ferns sampled October, 2005.

Treatment	Rhizome diameter (mm) ^a	Root weight from a 5-cm section of rhizome
1. Floricrops asymptomatic	10.8 A*	10.39 A
2. KHD asymptomatic	9.5 B	4.54 B
3. KHD deformed	8.55 C	2.89 BC
LSD _{0.01}	0.75	1.81

*Means followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$.

^aDiameter was measured 3 cm from the growing tip of 20 samples from each treatment.

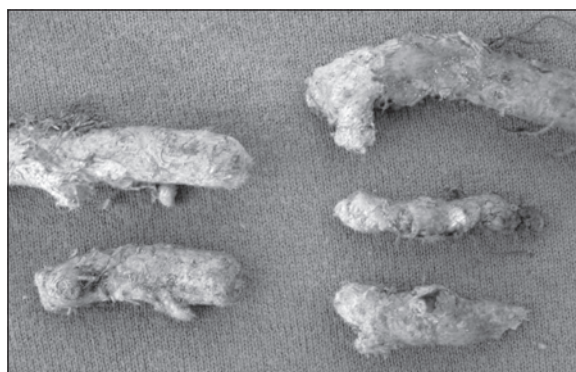


Figure 2: Rhizome diameter of asymptomatic plants from Floricrops (left) and deformed plants at KHD (right). Note the irregularly-shaped growing tips of rhizomes from KHD.

Microscopic analysis of rhizomes revealed the presence of natural openings in all rhizome tips. The growing tip of the rhizome was not observed to have the «scales» that cover mature parts of the rhizome (Figure 3). A series of photographs with increasing magnification of the rhizome tip is shown in Figure 3. Here, one can clearly see the presence of uncovered regions of the rhizome that would allow bacteria in the root zone to enter and establish endophytically during normal rhizome development (Figure 3).

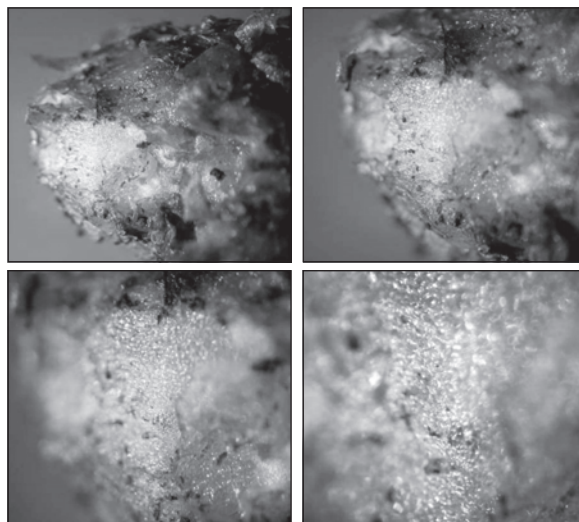


Figure 3: Photomicrograph of a growing tip of a typical rhizome of an asymptomatic fern plant. Lowest magnification (10x) is in the upper left panel and the highest magnification (63x) is in the lower right panel. Note the presence of unprotected cells (not covered by scales) at the rhizome tip that allows bacterial access to the inside of the growing rhizome.

Effects of fungicide application on rhizosphere pseudomonads: A greenhouse study

Greenhouse experiments were designed to determine the effect of Benlate on populations of fluorescent pseudomonads. Rhizomes, collected from asymptomatic plants at Floricrops fernery, were dipped into water (control), Benlate DF, or Benlate WP at the label rate of 1 lb/100 gal (1.2 g/L) and were then planted in field soil in a greenhouse. Ferns were grown at 23°C and artificially shaded with polypropylene shade fabric. Ferns were watered daily and fertilized with 20-10-20 twice per week. Eight replicate pots (plants) were used for each treatment. Genomic DNA extraction and PCR-DGGE analyses were conducted from rhizosphere soil at 6 weeks after treatment, as described above. Based on the previous results with PCR-DGGE from field samples, the analysis was performed using primers for total bacteria, *Bacillus* spp., and *Pseudomonas* spp.

PCR-DGGE analyses indicated that Benlate altered the composition of the rhizosphere community, including the pseudomonads. With the bacterial domain-level primer set, 5 ribotypes (bands) were significantly more abundant (greater gel densitometry reading) with Benlate treatment (Figure 4). An analysis of the *Bacillus* community indicated that one ribotype significantly increased with Benlate treatment (Figure 5). Using a *Pseudomonas*-specific primer set, three ribotypes exhibited a significant increase with Benlate treatment (Figure 6).

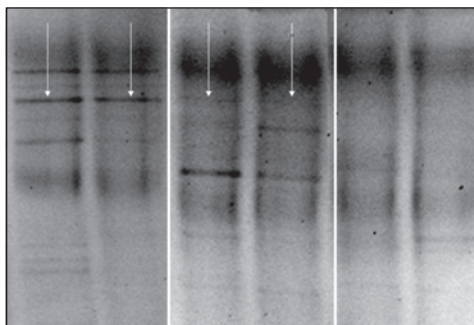


Figure 4: PCR-DGGE analysis of the rhizosphere total bacteria community 6 weeks after dipping rhizomes in Benlate DF (left), Benlate WP (center), or water (right). Arrows indicate bands present in the Benlate treatment but not in control samples.

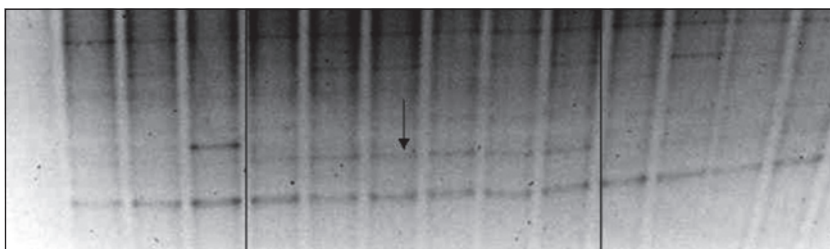


Figure 5: CR-DGGE analysis of *Bacillus* spp. from rhizosphere samples 6 weeks after dipping rhizomes in Benlate DF (left), Benlate WP (center), or water (right). The arrow indicates a band not present (or abundant) in the control samples.

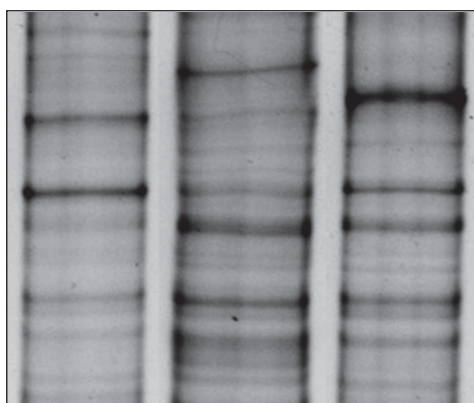


Figure 6: PCR-DGGE analysis of *Pseudomonas* spp. from rhizosphere samples 6 weeks after dipping rhizomes in Benlate DF (center), Benlate WP (right), or water (left). Note the increased number of bands with both formulations of Benlate.

Production of IAA by fluorescent pseudomonads isolated from fern's rhizosphere and from Benlate-treated ferns

A collection of 100 strains of fluorescent pseudomonads isolated in September of 2005 from the rhizosphere of asymptomatic ferns at Floricrops and 100 strains from the rhizosphere of deformed ferns at KHD were examined for IAA production. Development of a red color within 5 min after adding Reagent A was scored as ++ (and equated to an IAA standard of 20-40 µg/ml), while development of a pink color by 30 min was scored as + (and equated to an IAA standard of 10-20 µg/ml).

Two experiments were conducted to determine if Benlate treatment affects IAA production by fluorescent pseudomonads colonizing leatherleaf fern. Rhizomes containing fronds were collected from asymptomatic plants at Floricrops fernery and were then planted in field soil in the greenhouse. In the first experiment, Benlate was applied as a foliar spray while the second experiment used rhizome dips. Treatments in both experiments included Benlate DF and Benlate WP at the label rate of 1 lb/100 gal (1.2 g/L) and a water control. Eight replicate pots (plants) were used for each treatment. In the foliar spray experiment, at four weeks after treatment endophytic fluorescent pseudomonads were isolated and 50 strains per treatment were tested for IAA. In the rhizome dip experiment, rhizosphere pseudomonads were isolated at four weeks after treatment and 50 strains per treatment were examined for IAA production.

A marked difference in the frequency of IAA production by fluorescent pseudomonad strains from the rhizosphere of deformed plants at KHD and asymptomatic plants at Floricrops was observed (Table 6). There were 6-fold more isolates from deformed plants at KHD that were capable of producing IAA compared to the isolates from asymptomatic plants. The IAA reaction developed rapidly for strains isolated from KHD, with 30% having a red color within 5 min. Based on IAA standards, this rapid color change indicates a high IAA concentration of >20 µg/ml. Hence, while 30% of the KHD strains were high producers of IAA, none of the strains from Floricrops were observed to have high IAA producers.

Table 6.

IAA production frequency of *Pseudomonas* isolates from rhizospheres of deformed ferns at KHD and asymptomatic ferns at Floricrops*.

Fernery and appearance of ferns	% of strains ++ for IAA ^a	% of strains + for IAA ^b	% of strains + or ++ for IAA	% of strains negative for IAA
Floricrops, asymptomatic	0	8	8	92
KHD, deformed	30	19	49	51

* 100 isolates from each fernery were tested.

^a Development of red or pink color within 5 min on nitrocellulose membrane (Bric et al., 1991).

^b Development of red or pink color by 30 min on nitrocellulose membrane.

These results indicated a functional change within the population of rhizosphere fluorescent pseudomonads that is related to the use of Benlate, and this change persists long after Benlate applications have ceased.

Results of Benlate applications to fern on the frequency of IAA production by fluorescent pseudomonads indicated a profound shift in the percentage of endophytic bacteria inside the rhizomes capable of producing IAA (Table 7). The frequency of strains that strongly produced IAA (red color in 5 min) after spray with Benlate DF was 70% compared to 6% from the control. Benlate WP did not change the frequency of IAA production, relative to the control. An increase in the frequency of IAA production by rhizosphere fluorescent pseudomonads was observed in the rhizome-dip test (Table 8). The percentage of strains producing high levels of IAA increased 4- to 6-fold, with both formulations of Benlate stimulating this trait.

Table 7.

Effect of foliar sprays of Benlate on the frequency of IAA production by endophytic fluorescent pseudomonads within rhizomes.

Treatment (Foliar spray)	% of strains ++ for IAA	% of strains + for IAA	% of strains + or ++ for IAA	% of strains negative for IAA
Benlate DF	70	10	80	20
Benlate WP	6	18	24	76
Water control	6	19	25	75

* 50 isolates from each fernery were tested.

^a Development of red or pink color within 5 min on nitrocellulose membrane (Bric et al. 1991).

^b Development of red or pink color by 30 min on nitrocellulose membrane.

Table 8.

Effect of rhizome dips in Benlate on the frequency of IAA production by fluorescent pseudomonads in the rhizosphere.

Treatment (Rhizome dip)	% of strains ++ for IAA	% of strains + for IAA	% of strains + or ++ for IAA	% of strains negative for IAA
Benlate DF	43	22	65	35
Benlate WP	32	26	58	42
Water control	7	17	24	76

* 50 isolates from each fernery were tested.

^a Development of red or pink color within 5 min on nitrocellulose membrane (Bric et al. 1991).

^b Development of red or pink color by 30 min on nitrocellulose membrane.

Allelopathic effects in cucumber seed bioassays

Two cucumber seed bioassays were developed to evaluate allelopathic or deleterious potential of fluorescent pseudomonads isolated from fern rhizospheres. The assays were modifications of a lettuce seed bioassay that was used in previous studies of deleterious rhizobacteria (Alström et al. 1989; Barazani, Friedman 1999; Kremer, 2007; Kremer et al. 1996).

The first bioassay was a whole-cell assay in which bacterial isolates were plated onto 50% King's B agar and incubated at 28°C for 24 hr. One small loopful of each strain was agitated in 9 ml sterile water, and two 10-fold serial dilutions were prepared. Three replicate cucumber seeds were placed onto a water agar plate, and 50 µl of a 10⁻² dilution for each tested strain was applied to each cucumber seed, resulting in an average inoculum density of log 4.3 cfu/seed. We estimated that since populations enumerated from damaged ferns in the field were observed as high as log 5.5 cfu/g in the rhizosphere, the inoculum density used in the cucumber assay would be conservative. After inoculation, seeds were placed at room temperature in the light for 4 days. Plates with bacterial inoculations were compared visually to control plates and rated as + (better root growth than the control), - (less root growth than the control), or 0 (no change from the control). In addition, the length of each radical was measured, and the mean length for each bacterial treatment was calculated and compared to the mean length of the controls.

The second bioassay was a cell-free metabolite assay in which bacterial isolates were grown 48 hr in 9 ml tryptic soy broth. The resulting suspension was filter-sterilized through a 0.45 µm filter, and 50 µl of the sterile filtrate containing bacterial metabolites was inoculated onto each of 3 cucumber seeds per plate. Controls were inoculated with 50 µl of sterile tryptic soy broth. After inoculation, seeds were grown and roots were measured as in the first bioassay.

A collection of 100 fluorescent pseudomonad strains was isolated in September of 2005 from the rhizosphere of asymptomatic ferns at Floricrops and an additional 100 strains were isolated from the rhizosphere of deformed ferns at KHD. All isolates were tested in both bioassays.

Visual differences in the root systems of inoculated and control cucumber were apparent with some bacteria and some metabolites in all tests. A higher percentage of fluorescent pseudomonads from deformed ferns at KHD induced damage in both bioassays than did strains from asymptomatic ferns at Floricrops (Table 9). Hence, more pseudomonad isolates from deformed ferns at KHD with a history of Benlate use demonstrated allelopathic potential than did pseudomonads from ferns at Floricrops without a history of Benlate use. Some representative examples of reduced cucumber root growth in response to pseudomonad metabolites is presented in Figure 7.

Table 9.

Phytotoxic potential of fluorescent pseudomonads from rhizospheres of ferns at KHD and Floricrops.*

Effect in cucumber bioassay	% of strains exhibiting indicated effect		
	Fernery and appearance of ferns	Whole-cell bioassay	Cell-free metabolite bioassay
Reduced overall growth of cucumber roots compared to control ^a	KHD, deformed	44	22
	Floricrops, asymptomatic	7	7
Increased overall growth of cucumber roots compared to control ^a	KHD, deformed	0	0
	Floricrops, asymptomatic	5	16
Decreased average root length by over 50% compared to control	KHD, deformed	13	3
	Floricrops, asymptomatic	0	0

* A collection of 100 strains from normal-appearing ferns at Floricrops and 100 strains from damaged plants at KHD was tested in two separate bioassays on cucumber.

^a Based on visual comparison of cucumber seeds inoculated with cells or supernatants compared to controls treated with water.

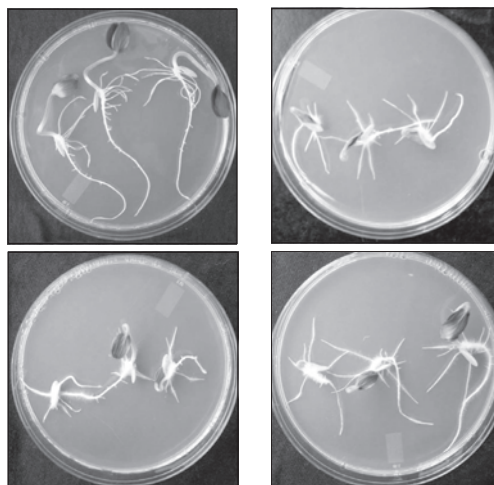


Figure 7: Representative negative visual ratings (reduced growth of cucumber root systems) with inoculation with fluorescent pseudomonads in whole cell bioassay. Upper left = control; other three images are different strains from the rhizosphere of deformed ferns at KHD nursery with a history of Benlate use.

In this study we determined the effect of Benlate® application on populations of fluorescent pseudomonads in ferns. Previously a strong correlation was observed between fern distortion and fungicide application. Areas with a history of routine Benlate application had a higher incidence and severity of frond growth distortion. The results of this study indicated that bacterial population densities in different fern microhabitats were increased due to Benlate application. Greater total bacterial populations and especially fluorescent pseudomonads associated with Leatherleaf fern increased following Benlate application. Increases in pseudomonads were observed by culture-based and DNA-based methods, and were still detected in soils years after the last Benlate application. The finding that higher endophytic populations of fluorescent pseudomonads are associated with symptomatic plants in the Benlate-treated fernery suggests that fluorescent pseudomonads contribute to fern deformation following a shift in the endophytic micro flora caused by the systemic fungicide. Additionally, Benlate application is not only related to changes in bacterial populations but also with functional traits. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonad strains from symptomatic ferns indicated that Benlate application resulted in a higher frequency of IAA producing strains and deleterious effects in cucumber seedlings. These findings are relevant because they show that agronomic practices can adversely change the dynamics of the bacterial populations inside and outside the plant host. Those changes are associated with alteration in the production of bacterial metabolites and ultimately those metabolites can be deleterious for the plant.

Conclusions and remarks

In this manuscript the effects of agronomic practices on plant-bacterial interactions were investigated. We show that fern growth distortion is correlated with changes in bacterial populations, specifically with increased populations of fluorescent pseudomonads. The alteration of the bacterial community structure in relation to agronomic practices can be of particular interest in perennial crops like fern and vegetatively propagated crops like chrysanthemum. To maintain the commercial value and productivity ferns and chrysanthemums are cultivated in high density and continuously in the same field. Thus residues from the previous crops provide resources for the survival of DRB, which will persist as a consequence of little modifications in their habitat. The application of products such as Benlate, which can cause changes in bacterial populations and their associated functional traits, can have profound effects on plant health, through a cascade of ecological interactions in the rhizosphere. Changes in the microbial community lead to the over-production of bacterial metabolites, which are ultimately deleterious for the plant.

It is important to consider that common mechanisms can be shared by beneficial and deleterious microorganisms, for example in the plant-microbe

interactions that exist in rhizobia-legume and plant-pathogens. In the same way, similar strategies may be used by plant growth promoting rhizobacteria and by allelopathic bacteria. Consequently, agricultural practices may fundamentally alter soil microbial communities, leading to increases in populations of certain functional bacterial groups. Those bacterial groups such as the fluorescent pseudomonads and their metabolites are integral to the processes that result in detrimental effects in cultivated plants. The role of microorganisms in the soil agro ecosystem has been very well documented. Now the tripartite interaction, including the plant host, should be further addressed.

References

- Allison V., Rajaniemi T., Goldberg D., Zak D. 2007. Quantifying direct and indirect effects of fungicide on an old-field plant community: an experimental null-community approach. *Plant Ecol.* 190:53-69.
- Alstrom S., Burns R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol Fert Soils.* 7:232-238.
- Baker K. 1962. Principles of heat treatment of soil and planting material. *J Aust Agr Sci.* 28:118-126.
- Baker K., Olsen C. 1960. Aerated steam for soil treatment. *Phytopathology.* 50:82.
- Bakker A.W., Schippers B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol and Biochem.* 19:451-457.
- Barazani O., Friedman J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant growth-mediating bacteria? *J Chem Ecol.* 25:2397-2406.
- Benizri E., Piutti S., Verger S., Pagès L., Vercambre G., Poessel J.L., Michelot P., 2005. Replant diseases: Bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biol Biochem.* 37:1738-1746.
- Berggren I., Alström S., Mårtensson A.M. 2001. Deleterious properties of certain rhizosphere bacteria on field pea (*Pisum sativum*) under gnotobiotic and non-sterile conditions. *Appl Soil Ecol.* 16:169-177.
- Boel Å., Annika G., Gerhardson B. 1993. Characteristics of a plant deleterious rhizosphere pseudomonad and its inhibitory metabolite(s). *J Appl Microbiol.* 74:20-28.
- Bottini R., Cassán F., Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:497-503.

- Buyer J.S., Teasdale J.R., Roberts D.P., Zasada I.A., Maul J.E. 2010. Factors affecting soil microbial community structure in tomato cropping systems. *Soil Biol Biochem.* 42:831-841.
- Carrera L.M., Buyer J.S., Vinyard B., Abdul-Baki A.A., Sikora L.J., Teasdale J.R. 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *Appl Soil Ecol.* 37:247-255.
- Ceja-Navarro J.A., Rivera-Orduna F.N., Patino-Zuniga L., Vila-Sanjurjo A., Crossa, J., Govaerts B., Dendooven L., 2010. Phylogenetic and Multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 76:3685-3691.
- Compant S., Clément C., Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol and Biochem.* 42:669-678.
- Garbeva P., van Veen J.A., van Elsas J.D. 2003. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol.* 45:302-316.
- Gardner J., Chandler J., Feldman A. 1985. Growth responses and vascular plugging of citrus inoculated with rhizobacteria and xylem-resident bacteria. *Plant and Soil.* 86:333-345.
- Jangid K., Williams M.A., Franzluebbers A.J., Sanderlin J.S., Reeves J.H., Jenkins M.B., Endale D.M., Coleman D.C., Whitman W.B. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biol and Biochem.* 40:2843-2853.
- Kloepper J.W., Saborío F., Bustamante E., Polston J.E., Sánchez E., and Umaña G. 2010. Fern distortion syndrome of leatherleaf fern in Costa Rica: symptoms, incidence, and severity. *Plant Dis.* 94:940-951.
- Cluepfel D.A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann Rev Phytopathol.* 31:441-472.
- Kremer R. 2007. Deleterious rhizobacteria, pp. 712. *in* S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-associated bacteria*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kremer R.J., Sasseville D.N., Mills H.A. 1996. Promotion of phytotoxic bacteria in rhizospheres of leatherleaf fern by Benlate DF. *J Plant Nutr.* 19:939-935.
- Kremer R.J., Souissi T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Curr Microbiol.* 43:182-186.

- Loper J.E., Schroth M. 1986. Influence of bacteria sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*. 76:386-389.
- Lupwayi N.Z., Rice W.A., Clayton G.W. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol and Biochem*. 30:1733-1741.
- Milling A., Smalla K., Maidl F., Schloter M., Munch J. 2004. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil*. 266:23-39.
- Mills H.A., Sasseville D.N., and Kremer R.J. 1996. Effects of Benlate on leatherleaf fern growth, root morphology and rhizosphere bacteria. *J Plant Nutr*. 19:917-937.
- Omer Z.S., Tombolini R., Broberg A., Gerhardson B. 2004. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. *Plant Growth Reg*. 43:93-96.
- Patten C.L., Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 68:3795-3801.
- Raaijmakers J., Paulitz T., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil-borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*. 321:341-361.
- Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechn Adv*. 17:319-339.
- Roux-Michollet D., Czarnes S., Adam B., Berry D., Commeaux C., Guillaumaud N., Le Roux X., Clays-Josserand A. 2008. Effects of steam disinfection on community structure, abundance and activity of heterotrophic, denitrifying and nitrifying bacteria in an organic farming soil. *Soil Biol and Biochem*. 40:1836-1845.
- Sarwar M., Kremer R.J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett Appl Microbiol*. 20:282-285.
- Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann Rev Phytopathol*. 25:339-358.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol*. 67:4742-4751.
- Stroo H.F., Elliott L.F., Papendick R.I. 1988. Growth, survival and toxin production of root-inhibitory pseudomonads on crop residues. *Soil Biol Biochem*. 20:201-207.

- Sturz, A.V., Christie, B.R., Nowak, J. 2000. Bacterial Endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci.* 19:1-30.
- Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R., Nowak, J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil.* 253:381-390.
- Wiggins B.E., Kinkel L.L., 2005. Green manures and crop sequences influence potato diseases and pathogen inhibitory activity of indigenous *Streptomyces*. *Phytopathology.* 95: 178-185.
- Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R. 1996. Isolation and Characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol.* 32:67-71.
- Yin C., Jones K.L., Peterson D.E., Garrett K.A., Hulbert S.H., Paulitz T.C. 2010. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biol and Biochem.* 42:2111-2118.

Capítulo 2

Interacciones entre fitopatógenos y microorganismos benéficos en la rizosfera

Interactions among plant pathogens and beneficial rhizosphere microorganisms

Marta C. Rivera¹, Eduardo R. Wright²

^{1,2} Facultad de Agronomía. UBA. Av. San Martín 4453 (1417). Ciudad de Buenos Aires. Argentina.
E-mail: mrivera@agro.uba.ar

Introducción

El término rizosfera fue introducido por Hiltner en 1904 (Hartman 2005), quien lo definió como la parte del suelo que es influenciada por el sistema radical. Es un sitio de interacciones únicas entre microorganismos benéficos y patógenos, que son atraídos por los exudados de las raíces, que pueden tener un altísimo impacto sobre la nutrición y salud de las plantas. Constituye un nicho rico en nutrientes como resultado de tales secreciones orgánicas constituidos por monómeros como glucosa y aminoácidos, polímeros como polisacáridos y proteínas, y restos de raíces (Hawes et al. 2003) y excreciones (Uren 2007). Como consecuencia, se pueden detectar niveles elevados de poblaciones de ácaros, nematodos y microorganismos (Bazin et al. 1990). Protozoos (Darbyshire Greaves 1973; Griffiths et al. 2007) y algas (Shran Nehra, 2011) también forman parte de la biota de la rizosfera, que presenta actividad muy variada. El acceso continuo de la población microbiana de la rizosfera al flujo de sustratos de alto y bajo peso molecular derivados de las raíces, junto con factores físicos, químicos y biológicos específicos, pueden afectar en forma marcada la actividad y estructura de la comunidad microbiana (Sørensen 1997; Brimecombe et al. 2001). Esta puede resultar perjudicial o mortal para la vida vegetal debido a la manifestación de diversas patologías, así como beneficiosa, mediante actividades de promoción del crecimiento de las plantas y prevención de las enfermedades parasitarias o no parasitarias que las afectan. Desde que se acuñó el término rizosfera, se han logrado importantísimos avances que permiten una mejor comprensión de los numerosos procesos bióticos y abióticos que ocurren allí. El estudio de las interacciones raíz-suelo-microorganismo se considera actualmente central en numerosas ciencias relacionadas con la nutrición y salud vegetal (Hinsinger Marshner 2006). En este capítulo se describen aspectos generales de microorganismos benéficos y patógenos que pueden estar presentes en

ese hábitat y de algunas interacciones entre sus poblaciones, con efectos directos o indirectos sobre la sanidad vegetal.

Desarrollo

La rizosfera como nicho microbiano

Se conoce que el suelo, y en especial la rizosfera, son los ambientes donde existe la mayor biodiversidad, debido a que es una región altamente favorable para la proliferación y actividad metabólica de numerosos microorganismos (Nannipieri et al. 2003). Alrededor del 15% del área de las raíces se considera cubierta por microorganismos específicos (Sylvia et al. 2005). La composición y los roles de las comunidades microbianas rizosféricas no están totalmente comprendidos aún. El estudio de componentes individuales ha dado lugar a la identificación de numerosos organismos, que presentan un rango de interacciones desde simbióticas hasta patogénicas. En la biota benéfica se encuentran microorganismos que solubilizan y fijan nutrientes, producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal, inducen la resistencia de las plantas a enfermedades o se comportan como antagonistas de agentes fitopatógenos. En un sentido amplio, los microorganismos benéficos de la rizosfera incluyen simbiosistas (ciertos Actinomycetes y hongos micorrízicos) y saprófitos de vida libre (Schippers et al. 1987).

Las bacterias constituyen el grupo microbiano más numeroso, con un promedio de 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico (Jurkevitch et al. 1992). Sin embargo, participan de una pequeña proporción de la biomasa del suelo debido a su tamaño. Bacilos no esporulantes, *Pseudomonas* y Actinomycetes son las bacterias más frecuentes.

También se encuentran hongos patógenos y simbióticos asociados a la rizosfera, en concentraciones de alrededor de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico. Especies de Zygomycetes e Hyphomycetes son las que se establecen con mayor facilidad, dada su capacidad de metabolizar azúcares simples (Sylvia et al. 2005). Los hongos juegan un papel importante en la rizosfera. Intervienen en numerosos procesos ecológicos, el crecimiento y la sanidad vegetal (Hawksworth Rosmann 1997). La diversidad y la composición de las comunidades fúngicas permanecen relativamente desconocidas en muchos ecosistemas (Becklin et al. 2012).

La población microbiana de la rizosfera puede ser estudiada a través de técnicas culturales y bioquímicas. Entre las primeras, las más utilizadas son la dilución seriada y recuento en placas o el análisis del número más probable; se pueden utilizar medios selectivos para cuantificar ciertos grupos. Sin embargo, estas técnicas pueden llegar a subestimar la población microbiana hasta un 90% (Bakken 1997). Las bioquímicas pueden ser de utilidad para detectar y cuantificar alteraciones causadas por las plantas o la microflora. Diferentes técnicas como PFLA (*phospholipid fatty-acid analysis*) (Lynch et al.

2004) y la extracción de ácidos nucleicos del suelo han permitido estudiar la estructura de las comunidades. Mediante el uso de técnicas moleculares se ha podido determinar microorganismos no cultivables (Nannipieri et al. 2003).

La microflora de la rizosfera es dinámica, y presenta variación temporal y espacial (Shivanna Vasanthakumari 2011). Su estructura puede variar según las características del suelo, el tipo de fertilización, la especie vegetal y el área de la raíz considerada (Marschner et al. 2004, Berg et al. 2005). Es creciente el desarrollo de técnicas moleculares útiles para analizar la estructura de las comunidades asociadas a la rizosfera en distintas especies silvestres y cultivadas tales como trigo (*Triticum aestivum* L.) (Smit et al. 1999), maíz (*Zea mays* L.) (Gomes et al. 2003), falsa avena (*Arrhenatherum elatius* L.) (P.Beauv. ex J.Presl & C.Presl) (Vandenkoornhuyse et al. 2002), *Senecio jacobaea* (Kowalchuk et al. 2006), *Taraxacum ceratophorum*, *Taraxacum officinale* and *Polemonium viscosum* (Becklin et al. 2012), etc. La diversidad química de los exudados de la raíces no ha sido suficientemente explorada aún (Walker et al. 2003).

Microorganismos patógenos de plantas

Entre los fitopatógenos, se encuentran numerosas especies de protozoos, cromistas, hongos y bacterias. Se destacan los géneros *Plasmodiophora* (Cercozoa, Protozoa); *Pythium* y *Phytophthora* (Oomycota, Chromista); *Sclerotinia* y *Gaeumannomyces* (Ascomycota, Fungi); *Sclerotium* (Incertae sedis, Fungi); *Fusarium*, *Verticillium*, *Cylindrocladium* y *Cylindrocarpon* (Hyphomycetes, Fungi); *Armillaria* (Basidiomycota, Fungi); *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Clavibacter* y *Streptomyces* (Protista). Otros géneros de mucha menor prevalencia como fitopatógenos son *Labyrinthula* (Labyrinthista, Chromista), *Chytridium* (Chytridiomycota, Fungi) y *Botrytis* (Ascomycota, Fungi) (Agrios 2005, ISF 2011). En todos los casos en los cuales causan enfermedades, las plantas manifiestan una sintomatología secundaria (clorosis, muerte de hojas y ramas, pérdida de turgencia) asociada a síntomas primarios causados en el lugar de infección de los patógenos, tales como necrosis del xilema, agallas o pudrición basal) (Rivera Wright 2008).

Si bien no diferenció entre suelo y rizosfera, Lockwood (1988) trabajó sobre 4 conceptos: (i) existen 2 grupos ecológicos diferentes (habitantes del suelo e invasores del suelo) que pueden infectar a las plantas, (ii) el potencial de inóculo, que incluye como componente la estimulación de los patógenos por medio de exudados de las raíces, (iii) el hospedante, que puede volverse más susceptible debido a stress ambiental, (iv) los microorganismos del suelo, que pueden influenciar la sobrevivencia y desarrollo de los patógenos. Describió la secuencia evolutiva de dos tipos contrastantes de comportamiento de los microorganismos de suelo, en base a las interpretaciones de Garret (1956). Los parásitos «habitantes del suelo» son primitivos, no especializados, y pueden infectar plántulas y tejidos juveniles. Residen en el suelo y presentan comportamiento saprófito, dado que se alimentan de materia orgánica (White 2003). Poseen un rango amplio de

hospedantes y una gran distribución en los suelos (Blair 1943). *Rhizoctonia solani* es un ejemplo típico de habitante del suelo (Koike et al 2007). Por el contrario, los parásitos «habitantes de la raíz» son más especializados, a menudo específicos y de una existencia más transitoria en el suelo, por ello se los considera invasores del suelo. Sus esporas son normalmente depositadas en el suelo, pero sólo germinan y crecen ante la presencia de alguna planta hospedante cercana. Muchos son patógenos, dado que son capaces de crecer en forma parasítica sobre de la planta hospedante (White 2003). No pueden sobrevivir en el suelo en forma saprofítica, pero sí formar estructuras de resistencia que permanecen allí. *Verticillium dahliae* es un ejemplo típico de invasor de suelo (Ogawa English 1991). Su presencia en ese hábitat es muy dependiente de los tejidos de plantas hospedantes (Blair 1943). Los parásitos obligados se encuentran últimos en la secuencia evolutiva (Lockwood, 1988).

Los fitopatógenos se pueden encontrar en los suelos en general, y en la rizosfera en particular, en forma latente (clamidosporas, esclerocios, estructuras de origen sexual, esporas de reposo). En forma activa, se nutren de la materia orgánica en descomposición o de las plantas. En general se comportan ocasionando enfermedades de tipo monocíclico, es decir, siguen un ciclo patogénico (sobrevivencia-infección-sobrevivencia) por ciclo de cultivo. Penetran los tejidos vegetales en forma directa mediante acción mecánica y enzimática, o a través de heridas ocasionadas por laboreos o plagas animales (Agrios 2005). La adhesión a las plantas hospedantes implica la atracción específica de propágulos por las superficies vegetales, y un encaje perfecto entre los ligantes (adhesinas) y los receptores. El producto de esta interacción activa una cascada compleja de transducción de señales que es movilizada en el proceso de reconocimiento patógeno-hospedante. La infección continúa con la colonización de los tejidos vegetales.

Microorganismos benéficos y su efecto sobre las enfermedades de las plantas

Entre las numerosas interacciones entre organismos benéficos y fitopatógenos en la rizosfera, se encuentran las que se establecen entre éstos últimos y sus antagonistas, fenómeno enmarcado en lo que se denomina control biológico, que según la definición clásica enunciada por Cook y Baker (1983) es la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad del patógeno capaz de producir enfermedad, obtenida por acción de uno o más organismos, distintos del hombre.

Los microorganismos constituyen un enorme reservorio natural aún no totalmente explotado para el control de enfermedades de las plantas. Aunque la exploración inicial en el área del control biológico se inició a comienzos del siglo XX, la investigación tecnológica comenzó a desarrollarse más intensivamente recién en los últimos 30 a 40 años. Diferentes hongos filamentosos, levaduras y bacterias han sido citados y utilizados como antagonistas. Los mecanismos de antagonismo primeramente detectados en la rizosfera son antibiosis,

hiperparasitismo y competencia (Cook Baker 1983). Son altamente dependientes de los organismos involucrados y del medio abiótico. En muchos casos, los organismos presentan más de un tipo de interacción.

El término antibiosis (antibiótico; del gr. βίος: opuesto, βίος: vida, ΤΙΚÓ: relativo a) (Real Academia Española, 2012) describe situaciones en que un microorganismo produce una sustancia química que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento o de destruir bacterias u otros organismos. Los antibióticos son productos del metabolismo secundario, con bajo peso molecular, volátiles o solubles, activos a bajas concentraciones. Un ejemplo típico de antibiosis es la inhibición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* por el antibiótico Agrocina 84 producido por *A. radiobacter* (Zoina et al. 2001). Antibióticos producidos por ejemplo por cepas de los géneros bacterianos *Pseudomonas* (Howell Stipanovic 1980, James-Jr Gutterson, 1986, Thomashow Meller 1988, Maurhofer et al. 1992, Paulsen et al. 2005) o *Bacillus* (Silo-Suh et al. 1994, Bernal et al. 2002, Araújo et al. 2005, Athukorala Fernando, 2009) y el género fúngico *Trichoderma* (Dennis Webster 1971; Faramak-Almassi et al. 1991; Degenkolb et al. 2006; Eziashi et al. 2006) han sido caracterizados y ampliamente estudiados. En general, la producción de antibióticos se detecta *in vitro* con facilidad, mediante la visualización de áreas de inhibición del crecimiento de los patógenos en cultivos duales con antagonistas.

Los hiperparásitos (del gr. ὑπερ, superioridad o exceso; del lat. parasítus, y este del gr. παράσιτος, comensal) son parásitos de parásitos (Real Academia Española, 2012). Numerosas especies del género *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. asperellum*, etc.) han sido citadas como hiperparásitos muy activos. Son capaces de parasitar micelio de fitopatógenos a través de crecimiento alrededor de las hifas y formación de haustorios (Thornton Gilligan 1999) o esclerocios (Ferguson 1953). Estas interacciones son fácilmente visibles al microscopio óptico y también han sido caracterizadas mediante microscopía electrónica (Elad et al. 2009). Numerosos microorganismos (hongos y bacterias) producen quitinasas (Ihrmark et al. 2010), glucanasas (Lisboa-de-Marco Felix 2007) y proteasas (Kedrics et al. 2005) capaces de hidrolizar los constituyentes de las paredes celulares de hongos fitopatógenos, desintegrando así sus hifas.

La competencia (del lat. *competent-a*; cf. *competir*) (Real Academia Española, 2012) por nutrientes, espacio, etc. resulta de una interacción sin acción directa del antagonista sobre el patógeno. La capacidad de utilización de exudados radicales y de colonización de raíces otorga una ventaja adaptativa a numerosos microorganismos, entre ellos las rizobacterias. Cepas del género *Trichoderma* presentan ventajas adaptativas por su velocidad de colonización de sustratos. Aquellos aislamientos que son altamente competentes en la rizosfera pueden colonizar la totalidad de la superficie de las raíces (Harman 2000). La producción de sideróforos (moléculas de bajo peso molecular capaces de quelar iones férricos y transportarlos al interior de las células)

es un ejemplo típico de competencia por nutrientes en sustratos con baja disponibilidad. Algunas especies, por ejemplo *Pseudomonas* fluorescentes, presentan la capacidad de producir estos compuestos de gran afinidad con el hierro (Rachid Ahmed 2005), que como consecuencia queda poco disponible para otros microorganismos. Los beneficios de la interacción planta-microorganismo benéfico pueden depender de una población importante del biocontrolador (Bull et al. 1991) y de una competencia y colonización de las raíces (Schippers et al. 1987).

Cepas hipovirulentas o no virulentas, por su capacidad de ocupar el mismo nicho ecológico que las patógenas, pueden ser consideradas potenciales antagonistas para proteger a las plantas hospedantes (Brandy Tavantzis 1999). Así también, la gran variabilidad existente en las poblaciones de especies benéficas determina que su eficiencia en el control dependa de la cepa presente. Por otra parte, las interacciones entre microorganismos pueden ser específicas de los hospedantes (Kloepper, 1996).

Numerosos microorganismos asociados a las plantas, que han resultado ser eficientes antagonistas para el control de patógenos, han demostrado estimular el crecimiento de una gran variedad de hospedantes. Tal es el caso de cepas de los géneros *Trichoderma* (hongos promotores del crecimiento vegetal; en inglés: PGPF). Entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (en inglés: PGPR) los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* han sido reportados (Saharan Nehra 2011). A modo de ejemplo, se puede citar el trabajo de Campbell y Greaves (1990), quienes obtuvieron 150 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes de suelos cultivados con trigo, inocularon semillas de esa especie y comprobaron que el 40% de los aislamientos estimulaban el crecimiento de la raíces. Las rizobacterias han sido muy estudiadas. Colonizan fuertemente las raíces y promocionan el crecimiento vegetal, aumentando la biomasa subterránea y aérea (Kloepper et al. 1980, Saharan Nehra 2011). Sintetizan factores de crecimiento y aumentan la disponibilidad de minerales en el suelo. Se ha detectado efecto de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre la nodulación (Polenko et al. 1987). Mediante el mejoramiento del estado nutricional de las plantas, podrían ejercer un efecto indirecto en la sanidad.

Si bien se encuentra entre los últimos mecanismos relacionados con el control biológico descubiertos, la resistencia sistémica inducida es estudiada hace décadas (Kloepper et al. 1980; Hammerschmidt et al. 1982; Loon et al. 1998). La invasión de células externas de las raíces por micelio de distintas cepas de *Trichoderma* puede desencadenar mecanismos de resistencia sistémica inducida (Yedidia et al. 2003). Las PGPR activan sistemas de defensa de las plantas a patógenos foliares o sistémicos (van Peer R et al. 1991; Wei et al. 1991).

Las micorrizas confieren una ventaja adaptativa sobre su hospedante haciendo disponibles algunos nutrientes, representando un desafío para varios organismos patógenos e influenciando en la composición de la

microflora de la rizosfera (Kothamashi et al. 2001).

¿Cuál es el rol de cada microorganismo en la rizosfera? Tanto los microorganismos promotores del crecimiento vegetal como los agentes de control biológico presentan efectos benéficos adicionales, además de sus funciones primarias. *Rhizobium* y *Glomus* spp. son promotores del crecimiento y productividad vegetal (efecto primario) y juegan un rol en la reducción de enfermedades (efecto secundario). Por otra parte, biocontroladores tales como *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. pueden controlar enfermedades (efecto primario) y, como se ha demostrado, pueden estimular el crecimiento de las plantas (Avis et al. 2008).

Un suelo puede ser categorizado como supresor de enfermedades, cuando el daño producido por algunos organismos perjudiciales es reducido por la actividad de otros benéficos, o sea aquel donde ciertos microorganismos patógenos no crecen o no se desarrollan lo suficiente (Hornby 1983). Hiltner destacó el papel de la microflora de la rizosfera en el fenómeno de la supresión inducida en el suelo, luego de varios años de monocultivo (Hinsinger Marshner 2006). La supresión puede estar basada en la presencia y actividades de bacterias, hongos, o bien en una estimulación general de las actividades microbianas del suelo. La investigación sobre suelos supresivos de enfermedades ha dado lugar a la identificación de numerosos microorganismos que han sido utilizados en el control biológico inundativo de fitopatógenos, con mayor o menor éxito, atribuible a la extrema variabilidad de comportamiento de los sistemas biológicos complejos, altamente dependiente de las condiciones ambientales.

En general, se observa en ecosistemas naturales una importante biomasa microbiana total que decrece a medida que los sistemas se utilizan en agricultura tradicional. Como consecuencia, en ecosistemas inalterados existe una mayor probabilidad de ocurrencia de interacciones –conocidas o no– que permitan el control biológico de fitopatógenos. Es por ello que existen corrientes de investigación que priorizan la capacidad supresora general en los ecosistemas, a través del manejo de comunidades microbianas completas o fracciones específicas de las mismas. Es lo que se lleva a cabo en forma más o menos empírica con la incorporación de algunos sustratos orgánicos, como por ejemplo los *composts* termofílicos o *composts* de lombriz (McKellar Nelson 2003; Ascitutto et al. 2006; Rivera Wright 2009) ampliamente utilizados en ciertos planteos agrícolas, como por ejemplo la producción orgánica o agroecológica. Metodologías de reciente desarrollo para la detección de comunidades rizosféricas complejas permitirán aprovechar la capacidad buffer de estas comunidades para el manejo de la salud vegetal.

Los patólogos vegetales han estudiado la dinámica de la coevolución hospedante-patógeno. El concepto de coevolución ofrece un marco similar para el estudio de interacciones microbianas y su relación con la supresión de enfermedades en el suelo (Kinkel et al. 2011). Allí, los cambios evolutivos dentro de las comunidades microbianas ocurren en escalas de tiempo

relativamente cortas y en respuesta a prácticas de manejo de los cultivos (Bakker et al. 2010).

Conclusiones

Es muy importante el avance logrado en el conocimiento de algunos patosistemas, entendiendo como tales a la interacción entre un fitopatógeno y su hospedante sumada a las interacciones que ocurren entre ambos con el ambiente biótico y abiótico de suelo y rizosfera. Sin embargo, mucho queda por entender. Es de esperar que el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías permitan ampliar la comprensión de estos sistemas tan complejos, con el objetivo último de mejorar la sanidad de los cultivos.

Bibliografía

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. London. pp. 922.
- Araújo F.F., Henning A.A., Hungria M. 2005. Phytohormones and Antibiotics Produced by *Bacillus subtilis* and their Effects on Seed Pathogenic Fungi and on Soybean Root Development. World J. Microbiol Biotechnol. 21:1639-1645.
- Asciutto, K., Rivera M.C, Wright E.R., Morisigue D., López M.V. 2006. Effect of vermicompost on the growth and health of *Impatiens wallerana*. Phytom - Int J. Ex Bot. 75:115-123.
- Athukorala S.N.P., Fernando W.G.D. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. Can J. Microbiol. 55:1021-1032.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil Biol Biochem. 40:1733-1740.
- Bakken L.R. 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil. van Elsas JD, JT Trevors, EMH Wellington (Editors). Modern Soil Microbiology. Marcel Dekker. New York. pp. 47-61.
- Bakker M.G., Glower J.D., Mai J.G., Kinkel L.L. 2010. Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil streptomycetes. Appl Soil Ecol. 46:35-42.
- Bazin M.J., Markham P., Scott E.M., Lynch J.M. 1990. *Population dynamics and rhizosphere interactions*. Lynch JM (Editor). *The Rhizosphere*. Wiley & Sons. Chichester. pp. 99-127.

- Becklin K.M., Hertweck K.L., Jumpponen A. 2012. Host identity impacts rhizosphere fungal communities associated with three alpine plant species. *Microb Ecol.* 63:682-693.
- Berg G., Zachow C., Lottmann J., Götz M., Costa R., Smalla K. 2005. Impact of plant specie and site on rhizosphere-asociated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl Environ Microbiol.* 71:4203-4213.
- Bernal G., Illanes A., Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Elect J Biotechnol* 5. (<http://www.ejb.org/content/vol5/issue1/full/4>).
- Blair I.D. 1943. Behaviour of the fungus *Rhizoctonia solani* Kühn in the soil. *Ann Appl Biol.* 30:118-127.
- Brandy B.R., Tavantzis S.M. 1999. Effect of hypovirulent *Rhizoctonia solani* on *Rhizoctonia* disease, growth, and development of potato plants. *Am J Potato Res.* 76:189-199.
- Brimecombe M.J., De Lelj F.A., Lynch J.M. 2001. The Rhizosphere. The Effect of Root Exudates on Rhizosphere Microbial Populations. Pinton R, Z Varanini, P Nannipieri (Editors) *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.* Marcel Dekker. New York. pp. 95-140.
- Bull C.T., Weller D.M., Thomashow L.S. 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology.* 81:954–959.
- Campbell R., Greaves M.P. 1990. *Anatomy and community structure of the rhizosphere.* Lynch JM (Editor). *The Rhizosphere.* Wiley & Sons. Chichester. pp. 11–34.
- Cook R.S., Baker K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul. pp. 539.
- Darbyshire J.F., Greaves M.P. 1973. Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pesticide Sc.* 4:349–360.
- Degenkolb T., Gräfenhan T., Berg A., Nirenberg H.I., Gams W., Brückner H. 2006. Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chem Biodiv.* 3:593-610.
- Dennis C., Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *T Brit Mycol Soc.* 57:25-39.
- Elad Y., Sadowski Z., Chet I. 2009. Scanning electron microscopical observations of early stages of infection of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transactions of the British Mycological Society.* 88:259-263.
- Eziashi E.I., Uma N.U., Adekunle A.A., Airede C.C. 2006. Effects of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *Afr J Biotechnol.* 5-703-706.

- Faramak Almassi E.L., Ghisalberti E.L., Narbey M.J., Sivasithamparam K. 1991. New antibiotics from strain of *Trichoderma harzianum*. J Nat Prod. 54:396-402.
- Ferguson J. 1953. Factors in colonization of sclerotia by soil microorganisms. Phytopathology. 43:471.
- Garrett S.D. 1956. Biology of root-infecting fungi. Cambridge University Pres. London and New York. pp. 293.
- Gomes N.C., Fagbola O., Costa R., Rumjanek R.G., Buchner A., Mendonça Hagler L., Smalla K. 2003. Dynamics of fungal communities in fulk and maize: rhizosphere soil in the tropics. Appl Environ Microb. 69:3758-3766.
- Griffiths B.S., Christensen S., Bonkowski M. 2007. Microfaunal interactions in the rhizosphere, how nematodes and protozoa link above and below ground processes. Cardon Z.G., Whitbeck J.L. (Editors).The rhizosphere. An ecological perspective. Elsevier. Oxford. pp. 57-71.
- Hammerschmidt R., Nuckles E., Kuæ J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiol Plant Patol. 20:73-82.
- Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*. Plant Dis. 84:377-393.
- Hartman A. 2005. Prof. Dr. Lorenz Hiltner, a Pioneer in soil bacteriology and rhizosphere research. Hartman A, M. Schmid, WW Wenzel, P Hinsinger (Editors). Rhizosphere 2004: perspectives and challenges – a tribute to Lorenz Hiltner. GSF-Forschungszentrum, Bericht. Neurenberg. pp. 1-4.
- Hawes M.C., Bengough G., Cassab G., Ponce G.. 2003. Root caps and rhizosphere. J Plant Growth Reg. 21: 352-367.
- Hawksworth D.L., Rossssmann A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? Phytopathology. 87:888-891.
- Hinsinger P., Marshner P. 2006. Rhizosphere. Perspectives and challenges. A tribute to Lorenz Hiltner. 12-17 September 2004. Munich. Germany. Plant Soil. 283:vii-viii.
- Hornby D. 1983. Suppressive soils. Ann Rev Phytopathol. 21:65-85.
- Howell C.R., Stipanovic R.D. 1980. Suppression of *PytiHum ultimum* - induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic Pyoluteorin. Phytopathology. 70:712-715.
- Ihrmark K., Asmail N., Ubhayasekera W., Melin P., Stenlid J., Karlsson M. 2010. Comparative Molecular Evolution of *Trichoderma* Chitinases in Response to Mycoparasitic Interactions. Evol Bioinf. 6: 1-26.
- ISF (International Foundation for Science). 2011. Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>

- James-Jr D.W., Gutterson N.I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl Environ Microbiol.* 52:1183-1189.
- Jurkevithc E., Hadar Y., Chen Y. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 58:119-124.
- Kinkel L.L., Bakker M.G., Schlatter D.C. 2011. A coevolutionary framework for managing disease suppressive soils. *Ann Rev Phytopathol.* 49:47-67.
- Kloepper J. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience.* 46:406-409.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores induced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature.* 286:885-886.
- Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology.* 70:1078-1082.
- Koike S.T., Gladders P., Paulus A.O. 2007. Vegetable diseases. A color handbook. Academic Press. New York. pp. 451.
- Kowalchuk G.A., Hol W.H.G., Van Veen J.A. 2006. Rhizosphere fungal communities are influenced by *Senecio jacobaea* pyrrolizidine alkaloid content and composition. *Soil Biol Biochem.* 38:2852-2859.
- Kothamashi D., Kuhad R.C, Babu C.R. 2001. Arbuscular mycorrhizae in plant survival strategies. *Tropical Ecol.* 42:1-13.
- Kredics L., Antal Z., Szekeres A., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C., Nagy E. 2005. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 52:169-84.
- Lisboa de Marco J., Felix C.R. 2007. Purification and characterization of a α -Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. *Braz Arch Biol Biotechnol.* 50:21-29.
- Lockwood J.L. 1988. Evolution of Concepts associated with soilborne plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol.* 26: 93-121.
- Loon L.C.,van, Bakker P.A.H., Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Rev Phytopathol.* 36:453-483.
- Marschner P., Crowley D., Yang CH. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil.* 261: 199–208.

- Maurhofer M., Keel C., Schnider U., Voisard C., Haas D., Défago G. 1992. Influence of Enhanced Antibiotic Production in *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 on its Disease Suppressive Capacity. *Phytopathology*. 82:190-195.
- McKellar M.E., Nelson E.B. 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty acid metabolizing seed colonizing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 69(1): 452-460.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci*. 54: 655-670.
- Ogawa J.M., English H. Diseases of temperate zone. Tree fruit and nut crop. *Verticillium* wilt of fruit and nut trees. University of California. California. pp. 486.
- Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol*. 23:873-878.
- Polenko D.R., Scher F.M., Kloepper J.W., Singleton C.A., Laliberte M., Zalesksa I. 1987. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can J Microbiol*. 33:498-503.
- Rachid D., Ahmed B. 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production of *Pseudomonas fluorescens*. *Afr J Biotechnol*. 4:697-702.
- Real Academia Española. 2012. Diccionario de la lengua española. <http://buscon.rae.es/drae/>
- Rivera M.C., Wright E.R. 2008. Las enfermedades de las plantas. Sintomatología, biología y manejo. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. pp. 128.
- Rivera, M.C., Wright E.R. 2009. Research on vermicompost as growth promoter and disease suppressive substrate in Latinamerica. *Dynamic Soil, Dynamic Plant 3 (Special Issue 2)*: 32-40.
- Saharan B.S., Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*. 21:1-30.
- Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann Rev Phytopathol*. 25: 339–358.
- Shivanna M.B., Vasanthakumari M.M. 2011. Temporal and spatial variability of rhizosphere and rhizoplane fungal communities in grase of the subfamily Chloridoideae in the Lakkavalli region of the Western Ghats in India. *Mycosphere*. 2:255-271.
- Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., Clardy H.H.J., Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol*. 60: 2023–2030.

- Smit E., Leeflang P., Glandorf B., van Elsas J.D., Wernars K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 65:2614-2621.
- Sørensen J. 1997. The rhizosphere as habitat for soil microorganisms. Van Elsas J.D., Trevors J.T., Wellington E.M.H. (Editors). *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker. New York. pp. 21-45.
- Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P., Zuberer D. 2005. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Pearson Education. New Jersey. pp 640.
- Thomashow L., Weller D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol.* 170: 3499-3508.
- Thornton C.R., Gilligan C.A. 1999. Quantification of the effect of the hyperparasite *Trichoderma harzianum* on the saprotrophic growth dynamics of *Rhizoctonia solani* in compost using a monoclonal antibody-based ELISA. *Mycol Res.* 103:443-448.
- Uren N.C. 2007. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. Pinton R, Z Varanini, P Nannipieri (Editors). *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil Plant Interface*. Taylor and Francis. Boca Raton. pp. 1-21.
- Vandenkoornhuysen P., Baldauf S.L., Leyval C., Straczek J., Young J.P.W. 2002. Extensive fungal diversity in plant roots. *Science.* 15:5562-2051.
- van Peer R., Niemann G.J., Schippers B. 1991. Induced systemic resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology.* 81: 728-734.
- Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44:51.
- Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* 81:1508-1512.
- White RE. 2003. *Principles and practice of soil science*. Blackwell Science. Oxford. pp 351.
- Yedidia I., Shoshani M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol.* 69:7343-7353.
- Zoina A., Raio A., Peluso R., Spasiano A. 2001. Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficus benjamina*). *Plant Pathol.* 50:620-627.

Capítulo 3

Hongos formadores de micorrizas arbusculares: Influencia de las prácticas agronómicas sobre su diversidad y dinámica de colonización

Arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of agronomic practices on diversity and dynamics of colonization

Santiago Schalamuk¹, Magdalena Druille², Marta N. Cabello^{3,4*}

¹Centro de Investigaciones Fitopatológicas (CIDEFI), (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP) 60 y 119, (CP 1900) La Plata. ²Cátedra de Forrajicultura, (Facultad de Agronomía; UBA) Av. San Martín 4453 (CP 1417), Capital Federal; ³Instituto Spegazzini, (FCNyM, UNLP) Av. 53 N° 477, (CP1900) La Plata; ⁴CICPBA. E-mail: mcabello@netverk.com.ar

Introducción

El suelo es un sistema vivo, dinámico, que constituye un recurso esencial para la producción de alimento y fibra y para el balance global y el funcionamiento de los ecosistemas (Doran et al. 1996). Un vasto número de microorganismos residen en el suelo y llevan a cabo un amplio rango de funciones. Entre estos microorganismos se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), los cuales forman simbiosis mutualistas con las raíces de la mayoría de las especies vegetales (Smith, Read 2008). En estas asociaciones simbióticas se genera un movimiento bidireccional de nutrientes donde el carbono fluye hacia el hongo y los nutrientes inorgánicos se mueven hacia la planta. Los hongos que forman estas asociaciones son biótrofos obligados y se encuentran ubicados dentro del phylum *Glomeromycota* (Schubler et al. 2001). Las micorrizas son las asociaciones más frecuentes en la naturaleza debido a su rango de hospedantes y su distribución cosmopolita (Harley, Smith 1983), y por ello los *Glomeromycota* son usualmente considerados «generalistas» dada su baja especificidad (Smith, Read 2008). También es importante destacar que los HFMA colonizan la mayoría de las plantas cultivables y presentan un impacto sustancial en la productividad de muchos cultivos (Johnson 1993).

El efecto positivo más significativo de las micorrizas arbusculares consiste en el mejoramiento de la nutrición de las plantas, ya que las hifas de estos hongos se extienden en el suelo y pueden absorber y transferir macro y

micronutrientes hacia las raíces. En ese sentido, la mayor captación de nutrientes, particularmente los poco móviles como el P, se logra ampliando el volumen de suelo explorado y alcanzando zonas donde los nutrientes se encuentran disponibles, es la característica más conocida de estas asociaciones (Sieverding 1991). Desde el punto de vista nutricional es pertinente aclarar que, teniendo en cuenta que los HFMA consumen C de los hospedantes, el efecto de la micorrización sobre las plantas depende de la relación costo-beneficio de la simbiosis (Johnson et al. 1997; Grimoldi et al. 2005). Por lo tanto, si bien se asume que las micorrizas arbusculares constituyen asociaciones mutualistas, el rango de respuesta es afectado por numerosos factores, entre ellos el estado y especie de planta hospedante, la especie de *Glomeromycota* y las condiciones del ambiente rizosférico.

Los hongos micorrízico-arbusculares poseen múltiples roles en los ecosistemas naturales y agroecosistemas. Entre otros beneficios de estas asociaciones micorrícicas se pueden mencionar los incrementos en la resistencia a parásitos de raíces (Borowicz 2001), los aumentos en la tolerancia a la sequía (Augé 2001) y las reducciones del impacto de estreses ambientales como por ejemplo la salinidad (Ruiz-Lozano et al. 1996). Los HFMA también tienen una función importante en el mantenimiento de la fertilidad física del suelo, al producir una glicoproteína específica recalcitrante, denominada glomalina (Wright et al. 1996) que aumenta la agregación (Wright, Upadhyaya 1998; Wright et al. 1999; Rillig et al. 2001) y promueve disminuciones de la erodabilidad los suelos (Rillig et al. 2002). Por otra parte, también se ha demostrado que estos hongos simbioses pueden redistribuir los recursos energéticos en las comunidades vegetales a través de redes fúngicas que se extienden tridimensionalmente en el suelo y conectan diferentes plantas entre sí (Read 1997). El mecanismo de formación de esas redes está relacionado con capacidad de las hifas de *Glomeromycota* para generar anastomosis con otras hifas de individuos fúngicos compatibles, creando así redes de longitud indefinida (Giovannetti et al. 2004).

Los HFMA se encuentran agrupados en 14 géneros que incluyen más de 210 especies descritas hasta la fecha, y los efectos que tiene sobre los hospedantes, o «eficiencia», difieren ampliamente entre especies y cepas (Miller et al. 1985; Modjo, Hendrix 1986).

Teniendo en cuenta los cambios favorables que promueven las micorrizas arbusculares en agroecosistemas, los hongos que constituyen este tipo de simbiosis poseen gran importancia económica potencial dentro de la agricultura, y su estudio es relevante tanto para posibilitar el manejo de HFMA indígenas a campo a través de prácticas agrícolas apropiadas como para el logro de inoculaciones exitosas.

El presente capítulo tiene como objetivos señalar los principales efectos de prácticas agrícolas habituales en los cultivos extensivos de Argentina, tales como las rotaciones, las labranzas, la fertilización y las aplicaciones de plaguicidas sobre las asociaciones micorrícicas arbusculares, y mencionar los

resultados de algunas investigaciones efectuadas en agroecosistemas de nuestro país.

Prácticas agrícolas y micorrizas

La agricultura argentina ha sobrellevado grandes procesos de transformación. El cambio más importante en los últimos 20 años ha consistido en el predominio de la soja como el principal cultivo de la región pampeana (Solbrig 2005), en la cual actualmente este cultivo, junto con el maíz, el trigo y el girasol ocupa la mayor superficie. El área sembrada con soja ha crecido junto con un paquete tecnológico que incluye la siembra directa o labranza cero y material genéticamente modificado que facilita el control de malezas con herbicidas totales. La soja transgénica resistente al glifosato facilitó enormemente la siembra directa, permitiendo simplificar el control químico de malezas durante el ciclo del cultivo. Por otra parte, se introdujo el barbecho químico, es decir el control de las malezas previo a la siembra exclusivamente a través de herbicidas. La siembra directa ha sido incorporada como una herramienta que, mediante el mantenimiento de los residuos de cultivo, permite la disminución de la erosión del suelo, la reducción en las pérdidas de materia orgánica, y también una mejor economía del agua (Satorre 2005). Estos aspectos han posibilitado la expansión de la frontera agrícola hacia zonas que eran mayormente destinadas a la ganadería, como también la intensificación de la agricultura mediante el doble cultivo trigo-soja en un mismo año.

El cambio tecnológico mencionado afecta profundamente a las comunidades de *Glomeromycota*. Las asociaciones micorrízicas, debido fundamentalmente a su carácter de simbioses obligados, reflejan interacciones entre la planta hospedante, los hongos y el ambiente (Brundrett et al. 1996). Por este motivo, los efectos de cada práctica agronómica son complejos, ya que pueden afectar directamente a los HFMA como indirectamente a través de los hospedantes de los que obtienen sus recursos o en el ambiente suelo donde se propagan. Por lo tanto, las prácticas agrícolas constituyen disturbios que afectan tanto la dinámica como la diversidad de estos hongos. Mientras que en ecosistemas naturales existen plantas de diversas especies en diferentes estados fenológicos y estacionalidad hospedando los *Glomeromycota*, en sistemas agrícolas con cultivos anuales, se presentan dos periodos con diferencias muy marcadas: una parte del año donde se registra una gran densidad de plantas hospedantes coetáneas y pertenecientes a la misma especie, es decir el cultivo, y luego de la cosecha un periodo de barbecho con ausencia de hospedantes o en algunos casos con presencia escasa de vegetación espontánea de distintas especies. Las tecnologías que se aplican en los principales cultivos de Argentina difieren notablemente de las utilizadas en otras regiones agrícolas, donde la siembra directa se encuentra menos difundida. La ausencia de labranza a través de

ésta técnica conservacionista permite que el grado de disturbio en los suelos se reduzca, sin embargo es importante destacar que la mayor utilización de elementos externos como herbicidas y otros plaguicidas, fertilizantes, así como intensificación de las rotaciones generan disturbios de diferente naturaleza que impactan de diversas maneras a las comunidades de *Glomeromycota*. El manejo adecuado de los HFMA, teniendo en cuenta los beneficios que promueven en los cultivos y en el suelo, debe ser considerado para mejorar la eficiencia, productividad y sostenibilidad de los sistemas agrícolas.

Cultivos y rotaciones

Las especies y la secuencia de cultivos que se desarrollan en un lote pueden alterar significativamente la estructura de las comunidades de *Glomeromycota*. Como hemos señalado, en Argentina los principales cultivos que se desarrollan son soja, trigo, maíz y girasol. Todas estas especies cultivables poseen la capacidad de formar asociaciones micorrícicas, aunque difieren en su grado de dependencia. El trigo y la soja son consideradas medianamente dependientes mientras que maíz y girasol son escasamente dependientes (Jeffries, Dodd 1991). Entre los cultivos extensivos en la región pampeana se está difundiendo la colza o canola (*Brassica napus* L.), con gran potencialidad de desarrollo para el ambiente edafoclimático de la zona. Esta especie pertenece a la familia *Brassicaceae* y por lo tanto no se asocia a los *Glomeromycota*. Gavito, Miller (1998) han hallado retrasos en la colonización de maíz sembrado después de colza, cuando se comparaba con plantas de maíz que se cultivaban en lotes con especies antecesoras micotróficas. Teniendo en cuenta la significancia de la colonización temprana para la absorción de P, dicho retraso puede tener consecuencias negativas. Por ello, en situaciones donde la disponibilidad de P es limitante, las características relacionadas con las asociaciones micorrícicas del cultivo antecesor pueden tener importantes efectos sobre el crecimiento y la absorción de P del cultivo siguiente a través de cambios en el potencial inoculo del suelo y la consecuente colonización (Gavito, Miller 1998; Karasawa et al. 2001). A pesar de esto, existe la posibilidad de que las comunidades de HFMA puedan reestablecer del efecto inhibitorio de un cultivo no hospedante a través de la inclusión de especies micotróficas (Gavito, Miller 1998).

Asimismo, la secuencia de cultivos que se desarrollan dentro de una rotación parece cambiar la composición de especies de las comunidades fúngicas e impactar en su diversidad, aunque los impactos de esos cambios no han sido evaluados extensamente (Hendrix et al. 1995). Es importante destacar que, a pesar de la ausencia de especificidad en las asociaciones micorrícicas, dado que los principales cultivos en Argentina se desarrollan en distintas épocas del año, y que además poseen diferente estructura, cada cultivo genera diferentes condiciones en el ambiente suelo que modifican las comunidades de *Glomeromycota*.

Sistemas de labranza: Siembra directa

En Argentina, los sistemas de labranza reducida, especialmente la siembra directa, se han difundido ampliamente en los últimos años, ocupando actualmente alrededor del 70 % de la superficie dedicada a cultivos anuales (Fertilizar 2010). Estos sistemas han sido incorporados con el fin de mantener los suelos cubiertos con residuos vegetales durante la siembra y crecimiento de los cultivos, y así reducir la erosión hídrica y eólica (Satorre 2005).

En suelos de la región pampeana numerosos trabajos han hallado que los sistemas de labranza generan diversos cambios de naturaleza física, química y biológica en los suelos de Argentina, (i.e. Alvarez, Steinbach 2009; Diosma et al. 2006; Ferreras et al. 2000; Aon et al 2001), y es de esperar que dichas transformaciones influyan en las comunidades de *Glomeromycota* a través de modificaciones en el ambiente suelo y el estado fisiológico de los hospedantes. Sin embargo, es importante aclarar que la acción mecánica sobre el suelo genera cambios cuali y cuantitativos que impactan en forma directa a los propágulos de *Glomeromycota* (McGonigle, Miller 1996a). La colonización de raíces por HFMA puede generarse a partir de tres fuentes distintas de inóculo: esporas, hifas pertenecientes a la red de micelio externo y fragmentos de raíces colonizadas. Estas estructuras, que forman el denominado «banco de propágulos» de *Glomeromycota* capaz de germinar, crecer y colonizar raíces cuando se dan las condiciones adecuadas (Öpik 2004; Schalamuk, Cabello 2010a), sufren alteraciones directas por el laboreo del suelo. Se ha propuesto que todos los tipos de propágulos de HFMA son afectados, en mayor o menor medida, a través de diversos mecanismos que actúan en forma conjunta: i) la disrupción de la red hifal por los implementos de labranza ii) la «dilución» del suelo derivada de la mezcla de porciones superiores de suelo con mayor infectividad micorrízica con otras mas pobres en propágulos iii) la descomposición acelerada de las raíces colonizadas (Schalamuk, Cabello 2010a). En consecuencia, las labranzas reducen la actividad de todos los propágulos y esto se refleja en disminuciones en la capacidad de los suelos para inducir colonización, es decir lo que denomina infectividad micorrízica del suelo. En ese sentido, Schalamuk et al. (2004) hallaron mayores niveles de infectividad micorrízica en el suelo en siembra directa que en sistemas labrados.

Diversos trabajos han registrado mayor presencia o actividad de *Glomeromycota* en suelos bajo siembra directa que en otros previamente labrados (Douds et al. 1995; McGonigle, Miller 1996a; Mozafar et al. 2000, Schalamuk et al. 2004). Es de esperar que en un suelo bajo siembra directa se encuentre una red de micelio externo desarrollada, teniendo en cuenta que las hifas extraradicales pueden ser severamente afectadas por la labranza (McGonigle, Miller 1996b; Wright, Upadhyaya 1998). Estudios realizados en Argentina han hallado valores superiores de colonización micorrízica y porcentajes de arbusculos en siembra directa con respecto a sistemas bajo labranza convencional en los estados iniciales de los cultivos (Schalamuk et

al. 2003, 2004). El hecho que los eventos y procesos necesarios para iniciar la colonización hayan sido más rápidos en sistemas de siembra directa se relacionó con los mayores niveles registrados de infectividad del suelo. La expresión gráfica de la colonización micorrícica en raíces a través del tiempo presenta una curva de tipo sigmoidea, en la cual se reconocen tres etapas: fase de latencia, fase exponencial y fase de plateau (Sieverding 1991). Una mayor infectividad micorrícica del suelo debería reducir la longitud de la fase de latencia, y así por lo tanto acelerar el proceso de colonización micorrícica (Smith, Read 2008).

Mientras que en los primeros estados fenológicos de los cultivos existe una gran influencia de la infectividad micorrícica de los suelos, en los estados fenológicos más avanzados, otros factores adquieren mayor importancia. Luego de la colonización primaria, la longitud de raíz colonizada se incrementa durante el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Land et al. 1993, Mozafar et al. 2000), y en momentos cercanos a la madurez se determina el valor máximo, fase de estabilización o plateau, que es resultado de la colonización secundaria, es decir la expansión de las hifas desde los puntos de entrada primarios hacia otras porciones de la raíz. El nivel de plateau es muy variable, y varios factores que afectan las tasas de crecimiento relativo del hongo y el hospedante pueden cambiar esta situación de equilibrio (Sieverding 1991). Wilson, Tommerup (1992) afirman que la colonización secundaria está en gran medida regulada por el flujo de carbohidratos desde la raíz hacia el componente fúngico de la simbiosis. Por todo esto, es posible que en los estados avanzados del cultivo variaciones en el ambiente físico-químico del suelo, el estado nutricional y crecimiento de las plantas hospedantes, que pueden determinarse por distintos sistemas de labranza, tengan incidencia en los porcentajes de colonización, arbuscúlos y vesículas relacionados con la colonización secundaria. Por otra parte, Schalamuk et al. (2003, 2004) en un cultivo de trigo observaron que las diferencias entre los porcentajes de colonización entre siembra directa y labranza convencional tienden a reducirse a medida que avanza el desarrollo del cultivo, y se hacen mínimas en las últimas etapas donde se determinan los niveles de plateau (i.e. llenado de granos).

Es importante aclarar que, tal como ocurre con la colonización, las diferencias en la abundancia de esporas dependen del momento donde se efectúan los muestreos. En agroecosistemas con cultivos anuales, el número de esporas generalmente se incrementa a lo largo del ciclo del cultivo (Cabello 1987) y por lo tanto la esporulación está frecuentemente ligada a la fenología del hospedante en el campo (i.e. la producción máxima de esporas ocurre a mediados o finales del ciclo de cultivo) (Morton et al. 2004). Varios estudios han hallado mayores densidades de esporas en siembra directa que en labranza convencional. (Crovetto 1985; Jansa et al. 2002; Schalamuk et al. 2003). Sin embargo, mientras que en los estados tempranos de los cultivos, generalmente se encuentran mayores densidades de esporas en los suelos no labrados, en estados fenológicos más avanzados las diferencias entre sistemas de labranza

se reducen (Schalamuk et al. 2003). Es bien conocido que las esporas pueden sobrevivir varios años en el suelo (Sieverding 1991). Por lo tanto, el número de esporas refleja tanto la esporulación como la acción de diferentes factores que afectan su supervivencia y acumulación. Consecuentemente, la densidad de esporas es el resultado de un complejo balance, y mientras la esporulación está relacionada con la actividad reciente de los HFMA, el número de esporas incluye estructuras formadas en momentos anteriores. Por otra parte, mientras que en sistemas naturales el banco de esporas en los suelos puede decrecer por causas tan variadas como predatorismo, parasitismo, germinación, entre otros factores, (ver Schalamuk, Cabello 2008), en sistemas agrícolas otro efecto que reduce directamente el número de esporas en el suelo es la dilución del suelo rico en esporas con las partes subsuperficiales más pobres en estas estructuras, ocasionada por la acción mecánica de las labranzas. Por estas razones, la supervivencia y acumulación tienen una gran influencia en el número de esporas, y las mayores densidades de estas estructuras halladas en siembra directa en los estados más tempranos del cultivo pueden ser el resultado tanto de una mayor o más rápida esporulación como de la presencia de esporas residuales producidas durante el barbecho o el cultivo antecesor. Teniendo en cuenta que la presencia de esporas no siempre implica la actividad reciente de los HFMA, y que los disturbios mecánicos pueden cambiar su distribución espacial en el perfil del suelo, el número de esporas puede ser considerado como un valioso indicador de utilidad de la presencia de HFMA *in situ*, sin embargo debido a que no refleja la actividad reciente de estos hongos, esta información debe ser tomada en cuenta con cautela.

En relación a la diversidad de *Glomeromycota*, la cantidad de estudios realizados sobre la temática en agroecosistemas de Argentina son escasos. En un ensayo de siembra directa y labranza convencional en la provincia de Buenos Aires se hallaron 24 taxa de ese *phylum*, lo que representa un número de especies alto en comparación con los registrados en otros sistemas agrícolas (Schalamuk et al. 2006). Asimismo, se observó que los cambios en la composición del banco de propágulos de *Glomeromycota* pueden influir en su diversidad. Como se ha señalado, los disturbios relacionados con el laboreo pueden afectar a cada uno de los tipos de propágulos de distinta manera, y por otra parte, se conoce que las esporas e hifas externas e internas poseen distinta capacidad para producir nuevas unidades de infección (Klironomos, Hart 2002). Se considera que en muchos hábitats, fundamentalmente los no disturbados, las redes de hifas en el suelo junto con fragmentos de raíces son el principal medio por los cuales las plantas se colonizan, incluso en las situaciones donde existen poblaciones altas de esporas (Hepper 1981; Tommerup, Abbott 1981; Jasper et al. 1992). En los experimentos a campo mencionados se registraron contribuciones mayores de especies pertenecientes a la familia *Glomeraceae* sobre otras familias de *Glomeromycota* (Acaulosporaceae y Gigasporaceae) en suelos manejados con siembra directa con respecto a otros previamente laboreados (Schalamuk et al. 2006). A partir de material proveniente de esos experimentos, se efectuaron plantas trampa utilizando diferentes tipos de propágulos para observar las

especies y géneros de esporas que se formaban utilizando las distintas fuentes de inóculo (Schalamuk, Cabello, 2010b). Mientras que en los suelos de siembra directa y labranza convencional se registraban proporciones de esporas pertenecientes a la familia *Glomeraceae* de 69.9% y 54.4% respectivamente, los porcentajes de *Glomeraceae* encontrados en las plantas trampa que contenían propágulos compuestos de micelio intra o extra radical provenientes de ambos sistemas de labranza resultaron mayores al 90 %. Dichos resultados indican que los miembros de la familia *Glomeraceae* presentan ventajas en el uso de ese tipo de propágulos (hifas intra y extraradicales) sobre las especies pertenecientes a Acaulosporaceae y Gigasporaceae. Por lo tanto, se ha sugerido que la mayores contribuciones de *Glomeraceae* halladas en sistemas de siembra directa podrían ser explicadas, al menos en parte, por la falta de disrupción de la red de hifas en ese sistema y una diferente composición del banco de propágulos en los suelos que favorecen a especies pertenecientes a *Glomus spp.*

Fertilidad y Fertilización

En la agricultura argentina, el uso de fertilizantes se ha incrementado notablemente en los últimos años, aunque sigue siendo relativamente bajo cuando se la compara con el de los países europeos. Los productos más empleados son los que proveen nitrógeno (57%) y fósforo (36%) y se aplican fundamentalmente en cultivos de trigo y maíz (Satorre 2005).

Es ampliamente conocido que en suelos pobres en nutrientes los valores de colonización micorrícica suelen ser altos (Vivekanandan, Fixen 1991; Hayman 1975). Una de las hipótesis más aceptadas para explicar este hecho es la que señala que las plantas invierten y transfieren más C a los hongos micorrícicos en los suelos donde nutrientes, como el N o el P, son limitantes (Mosse, Phillips 1971). Consecuentemente, cuando la disponibilidad de estos nutrientes aumenta, se esperaran disminuciones en la abundancia de micorrizas relacionadas con la partición de carbohidratos hacia otros destinos de las plantas que no son las raíces y subsiguientes limitaciones en el crecimiento del componente fúngico de la simbiosis, relacionadas con el menor suministro de C (Read 1991). Este comportamiento ha sido denominado «autorregulación de la colonización» (Vierheilig et al. 2000; Vierheilig, Piché 2002; Vierheilig 2004a, b), debido a que muestra similitud con la autorregulación de la nodulación en las interacciones rizobios-leguminosas. El mecanismo de autorregulación propone que una vez que la colonización llega a cierto nivel, se suprimen posteriores aumentos en este parámetro (Vierheilig, Piché 2002; Vierheilig 2004a, b). Si bien los mecanismos de autorregulación no han sido completamente dilucidados, se cree que las strigolactonas, un grupo de apocarotenoides exudados por las raíces en la rizósfera, cumplen un rol fundamental en esta regulación actuando como factores de ramificación en las etapas de pre-simbiosis (García Garrido et al. 2009).

Diversos estudios en condiciones controladas, con sustratos estériles, elementos marcados, inhibidores de la nitrificación, entre otros, han

confirmado los efectos negativos del agregado de P o N sobre los porcentajes de colonización y otros parámetros relacionados con la actividad de las micorrizas (Hawkins, George 2001). En ensayos a campo, los efectos de las adiciones de fertilizantes suelen ser más complejos, teniendo en cuenta que las respuestas en el crecimiento y el rendimiento de los cultivos y en la eficiencia de aplicación y absorción por la planta están influenciadas por numerosas variables, entre ellas la disponibilidad inicial del nutriente y de otros elementos que puedan interactuar en el suelo y en la nutrición de las plantas, las dosis de fertilizante aplicadas, las características edafoclimáticas de la zona que determinan el grado de mineralización de los nutrientes y sus pérdidas hacia zonas que están fuera del alcance de las raíces, el tipo de labranza, las fuentes de fertilizante utilizadas, su tecnología de aplicación, etc.

En la región pampeana argentina, la producción agrícola se encuentra limitada por una deficiencia generalizada de P, por lo tanto la fertilización con este nutriente constituye una práctica común (Echeverría, García 1998). Es ampliamente conocido que la formación de micorrizas se reduce en suelos con altas concentraciones de P (Jensen, Jakobsen 1980; Hicks, Loynachan 1987), por lo tanto varios mecanismos han sido propuestos con el objeto de explicar la modulación de la colonización micorrízica por el P del suelo, entre ellos: i) disminuciones en los exudados de la raíz (Kurle, Pfleger 1994) que afectan el desarrollo de la simbiosis entre los cuales se limitan los exudados de strigolactonas (García Garrido et al. 2009) y ii) efectos directos de altas concentraciones de P sobre el desarrollo de hifas externas de *Glomeromycota* (Miranda, Harris 1994). En Argentina, en ensayos a campo efectuados en la localidad de Balcarce, se registraron reducciones en la colonización micorrízica espontánea en cultivos de trigo en respuesta al agregado de fósforo, y se halló que aplicación de dosis crecientes de P en línea afectaron negativamente la micorrización en mayor medida que la aplicación de P al voleo en cultivos de trigo tanto bajo labranza convencional (Covacevich et al. 2005) como en siembra directa (Covacevich et al. 2008). Por otra parte, se encontró que la fuente de fertilizante fosfatada influye notablemente en la reducción de la colonización, ya que la colonización micorrízica de HFMA indígenas disminuyó con la aplicación de superfosfato soluble, mientras que cuando se utilizaba roca fosfórica como fertilizante la colonización no se reducía (Covacevich et al. 2006).

El incremento en la utilización de fertilizantes nitrogenados en Argentina está relacionado con la adopción generalizada de la siembra directa, que requiere de la adición de N para sostener los rendimientos de los cultivos, fundamentalmente de gramíneas (Alvarez, Steinbach 2009). Diversos estudios han hallado reducciones en la colonización micorrízica arbuscular con aplicaciones de nitrógeno (Hayman 1970; Kruckelmann, 1975; Jensen, Jakobsen 1980; Land et al. 1993). Treseder (2004), utilizando la metodología de meta-análisis, comparó los efectos de la adición de N y P sobre la colonización micorrízica obtenidos en estudios a campo y halló que las reducciones en la colonización relacionadas con la aplicación de N son menos consistentes que

las relacionadas con la fertilización con P. Numerosos factores pueden explicar la variabilidad de los efectos del N en comparación con los del P. Se conoce que el nitrato es más móvil en el suelo que el fosfato, por lo tanto cuando el N se encuentra en esta forma, la difusión o flujo masal suele abastecer a las plantas de N en tasas adecuadas y entonces en esos casos la inversión de la planta en la simbiosis micorrízica puede reducirse. Por otra parte, si bien existe abundante información que confirma que las asociaciones micorrízicas contribuyen a la captación de N, es posible que éstas no sean tan efectivas en facilitar la absorción de N inorgánico en comparación con el P inorgánico (Mosse, Phillips 1971; Smith, Read 2008). Es importante considerar que, ante la presencia de N en forma amoniacal, los resultados suelen presentar diferencias. Chambers et al. (1980) sostienen que el ión NH_4^+ tiene un efecto más deletéreo sobre la colonización micorrízica que el NO_3 . El mecanismo no es conocido completamente, pero Hawkins, George (2001) afirman que el NH_4^+ afecta el crecimiento de las hifas en forma directa.

En suelos de la región pampeana, en un ensayo a campo (Schalamuk et al. 2004) y en un bioensayo en macetas (Schalamuk et al. 2011) observaron que la fertilización nitrogenada generó efectos negativos sobre los porcentajes de colonización, arbuscúlos y vesículas en suelos provenientes de siembra directa. Las reducciones en sistemas de labranza convencional fueron mínimas, atribuyéndose este hecho a los escasos valores de potencial inóculo micorrízico en los sistemas laboreados. Por otra parte, la variabilidad de los efectos del nitrógeno sobre la colonización mencionada por Treseder (2004) ha sido también registrada en nuestro país, teniendo en cuenta que en un mismo ensayo, ante años con condiciones hídricas muy diferentes, los niveles de colonización se redujeron en menor medida en un año que presentó precipitaciones excesivas que favorecieron las pérdidas de nitrógeno (Schalamuk et al. 2003) que en otro año en el que se registraron normales para la zona (Schalamuk et al. 2004).

Barbecho químico, malezas y herbicidas

El sistema de siembra directa, ampliamente difundido en Argentina, implica la imposibilidad de controlar mecánicamente a las malezas, y por lo tanto se requiere la realización de un barbecho químico. Para el barbecho químico se utilizan herbicidas totales que afectan las malezas del lote. Cuando se utiliza la labranza convencional, En otros sistemas agrícolas se deja el suelo desnudo y disturbado. En siembra directa se eliminan las malezas, que son hospedantes de HFMA, pero el suelo no es disturbado físicamente. La presencia o ausencia de vegetación impacta fuertemente en las comunidades de *Glomeromycota*, debido fundamentalmente a sus características de simbiontes obligados. Las comunidades de malezas, a pesar de presentar diversas interacciones negativas con los cultivos, son también capaces de actuar como hospedantes de *Glomeromycota*. En efecto, existe evidencia que sugiere que la presencia de

malezas hospedantes en agroecosistemas puede mantener comunidades diversas de *Glomeromycota*, promover simbiosis efectivas con los cultivos y así compensar los efectos de la competencia (Feldman, Boyle 1998). Por lo tanto, las malezas hospedantes pueden constituir un puente efectivo para los HFMA entre distintas estaciones de cultivo (Gosling et al. 2006). En ese sentido, Kabir, Koide (2000) compararon los efectos de la utilización de un cultivo de cobertura de trigo y los relacionados con la presencia de *Taraxacum officinale* previo a un cultivo de maíz, y encontraron que los lotes enmalezados con esta especie generaban mayores porcentajes de colonización, absorción de fósforo y rendimiento en el maíz que los no enmalezados. En nuestro país, la mayoría de las especies que se presentan como malezas son hospedantes de *Glomeromycota*, a excepción de algunas pocas pertenecientes a las familias *Brassicaceae* (*Diplotaxis tenuifolia*, *Raphanus sativus*, *Brassica campestris*, *Rapistrum rugosum*), *Chenopodiaceae* (*Chenopodium spp.*, *Kochia scoparia*), *Caryophyllaceae* (*Stellaria media*) *Amarantaceae* (*Amaranthus spp.*) y *Polygonaceae* (*Polygonum convolvulus*). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la mayoría de las especies de malezas son micotróficas, la utilización de herbicidas puede afectar negativamente las comunidades de HFMA. De hecho, Kurle, Pflieger (1994) hallaron un menor número de esporas en áreas de rotación maíz-soja donde el manejo pasado había reducido las poblaciones de malezas, y parte de la disminución en el número de esporas fue atribuida a la reducción de malezas hospedantes causada por los herbicidas.

Además de la eliminación de plantas hospedantes, los herbicidas pueden tener efectos directos sobre las estructuras externas de los HFMA o indirectos relacionados con cambios en la fisiología del hospedante. Estos aspectos, junto con otros como la diversidad de principios activos de herbicidas que se utilizan, formulaciones, dosis y momentos de aplicación, generan dificultades para señalar tendencias relacionadas con sus efectos sobre las asociaciones micorrícicas. Entre los distintos herbicidas que se utilizan en Argentina, el glifosato es en la actualidad el más difundido. Existen resultados dispares en cuanto a sus efectos sobre la colonización micorrízica. Varios estudios han hallado que el glifosato no afecta la colonización (Powell et al. 2009, Mujica et al. 1999, dos Santos Malty et al. 2006, Savin et al. 2009), mientras que otros señalan que la reduce (Ronco et al. 2008) o la incrementa (Morandi 1989). En medio agarizado, también se han encontrado diferencias entre los resultados de distintos estudios: mientras que dos Santos Malty et al. (2006) hallaron que el glifosato redujo el porcentaje de germinación de esporas y el tamaño de los tubos germinativos, Giovannetti et al. (2006) encontraron que este compuesto no afectó este parámetro, incluso cuando se lo aplicó a altas dosis. Sin embargo, ambos trabajos citados registraron inhibiciones relacionadas con el glifosato en el crecimiento de tubos germinativos. Por otra parte, Ronco et al. (2008) no han hallado efectos negativos del glifosato sobre la viabilidad de hifas de *Glomus mosseae*.

En cuanto a otros herbicidas, por ejemplo la atrazina, producto ampliamente utilizado para control de latifoliadas en presembrado y

preemergencia en maíz, los estudios reportan que la aplicación de este compuesto no posee efecto sobre la simbiosis micorrícica o incluso puede favorecerla (Trappe et al. 1984). Los herbicidas del grupo de las amidas, como el alaclor y acetoclor, que se encuentran muy difundidos para el control de gramíneas en presiembra y preemergencia en maíz, como también los pertenecientes al grupo de los hormonales, como el 2.4D o MCPA, que son utilizados para el control de malezas latifoliadas en trigo, pueden inducir a reducciones significativas en la colonización cuando se aplican dosis altas (Trappe et al. 1984; Ocampo, Barea 1985). Sin embargo, no se han hallado efectos negativos de herbicidas hormonales, como MCPA, sobre la germinación de esporas in vitro, inclusive a altas dosis (Giovannetti et al. 2006). Los estudios relacionados con el efecto del herbicida diclofop metil, utilizado en trigo para el control de gramíneas anuales, no han mostrado concordancia. Mientras que Rejon et al. (1997) halló reducciones en el porcentaje de colonización relacionadas con dosis muy bajas de diclofop metil, Ryan et al. (1994) no encontró diferencias en este parámetro utilizando este compuesto. Los efectos sobre las asociaciones micorrícicas de los herbicidas de contacto, como el paraquat, el bromoxinil y el bentazon, presentan también resultados dispares. Existen estudios que reportan reducciones en el porcentaje de colonización relacionadas con aplicaciones de paraquat en dosis recomendadas a campo (Abd-Alla et al. 2000), mientras que otros no encontraron efectos negativos luego de la aplicación del producto de contacto bentazon (Bethlenfalvay et al. 1996). En relación al número de esporas, se registraron disminuciones luego de la aplicación de bromoxinil y paraquat (Abd-Alla et al. 2000).

Enfermedades y fungicidas

Las enfermedades de los cultivos y su control mediante la utilización de agroquímicos pueden generar múltiples efectos sobre las comunidades de *Glomeromycota*. Gran diversidad de organismos patógenos afectan las raíces de los cultivos, alteran el transporte, interfieren en los procesos fotosintéticos, producen un uso anormal de carbohidratos, entre otros efectos. Por lo tanto, reducciones en los niveles de enfermedad a través de la utilización de fungicidas provocan cambios en la fisiología de los hospedantes que impactan en su capacidad para asociarse con HFMA, principalmente teniendo en cuenta que la colonización es dependiente del flujo de carbohidratos desde la raíz hacia el componente fúngico de la simbiosis (Wilson, Tommerup 1992). Entre los plaguicidas que se utilizan para el control de adversidades bióticas, los fungicidas son lógicamente los que deberían presentar mayor efecto directo sobre los hongos pertenecientes a *Glomeromycota*. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que los fungicidas pueden afectar a las asociaciones micorrícicas de manera negativa, neutral o incluso positiva (Samarbakhsh et al. 2009). Los fungicidas incluyen una enorme variedad de compuestos que difieren en su efecto sobre la fisiología de los hospedantes, modo de acción, espectro de control, mecanismo de acción, métodos de aplicación y formulación.

Consecuentemente, es difícil de generalizar sobre un grupo de compuestos, incluso sobre la aplicación de un compuesto en particular. En lo que respecta a la utilización de fungicida, es importante diferenciar fundamentalmente las aplicaciones al follaje, las que se destinan al suelo, o la que realizan sobre las semillas. En los cultivos extensivos de la región pampeana no es una práctica usual la aplicación de fungicidas al suelo. Sin embargo los productos en los denominados «curasemillas» toman contacto con ese medio. Del contacto con el suelo cabría esperar, además de efectos sobre aspectos fisiológicos y sanitarios en la planta hospedante, efectos directos sobre las hifas externas y/o esporas, que impactarán tanto en la funcionalidad de las asociaciones para explorar los recursos del suelo como también sobre el desarrollo de las fases presimbióticas que posibilitan la colonización de las raíces.

Entre los fungicidas clásicos que se utilizan como curasemillas se encuentra el thiram, perteneciente al grupo de los dithiocarbamatos, de acción preventiva y de contacto. Efectos inhibitorios sobre la colonización de las raíces y la producción de esporas de dithiocarbamatos aplicados al suelo o como curasemillas han sido ampliamente reportados en la literatura (Vijayalakshimi 1993; Sreenivasa, Bagyaraj 1989, Giovannetti et al. 2006, Hernández-Dorrego, Mestre Parés 2010).

Los triazoles constituyen un grupo más moderno de fungicidas sistémicos. Dentro de este grupo se encuentra el triadimenol, ampliamente utilizado como curasemillas en trigo. Los triazoles, como el triadimenol, actúan como inhibidores de la biosíntesis de ergosterol, un importante componente de las membranas fúngicas. Las cantidades relativas de ergosterol en los *Glomeromycota* son escasas en comparación con otros grupos de hongos, por lo tanto su efecto negativo sobre la micorrización es generalmente bajo o nulo (Schmitz et al. 1992, Frey et al. 1994). El metalaxyl es un principio activo sistémico ampliamente utilizado en curasemillas para soja. Se ha hallado que aplicaciones de metalaxyl incrementaron la colonización micorrícica y el crecimiento de las plantas (Groth, Martinson 1983, Sukarno et al. 1996). Este fungicida es específico en su control de fitopatógenos oomycetes, y no posee efectos sobre otros grupos de hongos. Por lo tanto, se ha sugerido que su efecto favorable para la colonización micorrícica es básicamente indirecto, a través de reducciones en las poblaciones de organismos antagonistas a los HFMA (Hetrick Wilson 1991) e incrementos en la disponibilidad de azúcares solubles en los hospedantes. Sin embargo, Giovannetti et al. (2006) documentaron efectos directos de este fungicida, ya que la aplicación de metalaxyl estimuló la germinación de esporas de *Glomeromycota* y el crecimiento hifal en la fase presimbiótica in vitro. Si bien estos estudios muestran tendencias interesantes, las condiciones de los medios de cultivos estériles son marcadamente diferentes a las que ocurren en suelos con raíces de plantas, a causa de una gran cantidad de factores, entre ellos la absorción de fungicidas por el suelo. Por otra parte, el fungicida fludioxonil, que es aplicado en curasemillas para soja en combinación con metalaxyl, parece promover la colonización a través la reducción de patógenos agresivos como

Rhizoctonia spp., organismos que son controlados por este fungicida (Murillo-Williams, Pedersen 2008).

Dentro de los fungicidas que se utilizan en aplicaciones foliares, tienen actualmente gran importancia los pertenecientes a los grupos de los triazoles y las estrubirulinas. Los triazoles y otros inhibidores de la biosíntesis del ergosterol constituyen un grupo de fungicidas que ha adquirido gran difusión en los cultivos de grano debido a su eficacia frente a patógenos foliares, y su efecto sistémico y persistente dentro de la planta. A pesar de su mecanismo de acción, a menudo se han encontrado efectos negativos de fungicidas triazoles a altas dosis o en aplicaciones repetidas (West et al. 1993; Kling, Jakobsen 1997; Schweiger, Jakobsen 1998). Sin embargo, en Argentina se ha hallado que la aplicación de triazoles a un cultivo de trigo no afectó negativamente los porcentajes de colonización micorrícica (Schalamuk et al. inédito). En la evaluación de los efectos de los fungicidas foliares sobre los HFMA debería tenerse en cuenta no sólo el efecto del compuesto *per se*, sino también la reducción en las enfermedades que genera, incrementando el área foliar verde y aumentando el suministro de fotoasimilados hacia las raíces. Otro grupo de fungicidas que está difundiendo rápidamente en la región agrícola argentina es el de las estrobilurinas, de acción translaminar o mesostémica. Los fungicidas de este grupo poseen un amplio espectro de acción al inhibir la respiración mitocondrial. Diedhiou et al. (2004) hallaron que las strobilurinas, a pesar de su amplio espectro, no afectan negativamente la micorrización de los cultivos cuando se aplican para el control de patógenos foliares a las dosis recomendadas. Schalamuk et al. (inédito), hallaron resultados similares en cultivos de trigo. Teniendo en cuenta que los fungicidas de este grupo se aplican en pulverización foliar y no son completamente sistémicos, es cuestionable que las aplicaciones de este grupo presenten algún efecto detrimental sobre los HFMA. Dentro de los fungicidas clásicos, que se reemplazan paulatinamente por los más modernos, se encuentran los pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, como los fungicidas sistémicos benomyl y carbendazim. Los benzimidazoles son eficaces en el control de numerosas enfermedades causadas por una amplia variedad de hongos. El benomyl y otros benzimidazoles se descomponen a metil benzimidazol carbamato (carbendazim), y este último compuesto interfiere en la división de los núcleos de los hongos sensibles. El efecto deletéreo del benomyl y su producto de descomposición, carbendazim, sobre los HFMA es ampliamente conocido; se sabe que se une específicamente a las beta-tubulinas, inhibiendo la función de las tubulinas, que son cruciales para el crecimiento fúngico (Boatman et al. 1978; Hale, Sanders 1982; Thingstrup, Rosendahl 1994; Schweiger, Jakobsen 1998; Kjølner, Rosendahl 2000). Venedikian et al. (1999) observaron que la colonización puede resultar menos inhibida por aplicaciones de carbendazim que la germinación de las esporas y el crecimiento de hifas en medio agarizado. Esto sugiere que las distintas fases de crecimiento de estos hongos pueden tolerar diferentes concentraciones de fungicidas (Dodds, Jeffries 1989; Ocampo 1993; Schreiner, Bethlenfalvay 1997).

En cuanto al efecto de la aplicación de fungicidas sobre la diversidad de *Glomeromycota*, la información sobre este tema es escasa, aunque se reconoce que existen diferencias en la sensibilidad a distintos grupos de fungicidas entre taxas o aislamientos de *Glomeromycota* (Dodd, Jeffries 1989; Schreiner, Bethlenfalvay 1996).

Insecticidas

Al igual que lo ocurrido con otros pesticidas, el efecto de los insecticidas sobre los HFMA varía en función del principio activo, las dosis utilizadas y las especies involucradas en la simbiosis.

Menendez et al. (1999) estudiaron el efecto de dimetoato, un insecticida organofosforado de acción sistémica, sobre el porcentaje de colonización radical en soja. Estos autores hallaron que la colonización no se vio afectada en ninguna de las dosis utilizadas, cuando la planta creció en un suelo inoculado con *Glomus mosseae*. Sin embargo, al utilizar la comunidad nativa de HFMA el porcentaje de colonización radical se redujo al aplicarse la dosis recomendada a campo. Con respecto al porcentaje de germinación de las esporas, el dimetoato disminuyó este porcentaje en *Racocetra castaneae* en dosis de 5 ml/L, lo aumentó en *Gigaspora roseae* en la dosis de 0,5 ml/L y no lo afectó en *G. mosseae*. Menendez et al. (1999) atribuyen esta respuesta diferencial a que algunos ácidos orgánicos y azúcares inhiben la germinación de esporas de algunas especies pero estimula el crecimiento hifal de otras.

La mayor tolerancia de *G. mosseae* a la aplicación de un insecticida organofosforado coincide con los resultados de Burpee, Cole (1978). Pavarthi et al. (1985) encontraron efectos negativos sobre esta especie fúngica al aplicar un insecticida organoclorado (Endosulfan) sobre la misma leguminosa. El uso de Carbaryl, correspondiente al grupo de los carbamatos, no afectó a la colonización por *G. mosseae*. Martínez et al. (1998) demostró que la aplicación de triflumurón, un insecticida del grupo de las benzoilfenilureas, tuvo un efecto nulo en la germinación de esporas de *G. mosseae*, *R. castanea* y *Gigaspora rosea* en las dos dosis evaluadas. Con respecto al porcentaje de colonización radical, estos autores encontraron una disminución de este parámetro con suelo no tinalizado, ya sea que estuvieran o no inoculadas con *G. mosseae*. Sin embargo, en suelo tinalizado e inoculado con *G. mosseae*, no se observó ningún efecto del Triflumurón sobre la micorrización, en ninguna de las concentraciones ensayadas.

Conclusión

Bajo condiciones naturales la mayoría de los cultivos agronómicos están colonizados con hongos micorrícico-arbusculares. Sin embargo es difícil demostrar sus funciones a campo. Las prácticas agronómicas implican cambios

complejos en los cuales no se conoce en que medida afectan las poblaciones de HFMA y su simbiosis. Son necesarios más estudios a campo para evaluar su efecto sobre la composición cuali-cuantitativa de HFMA en los diferentes agrosistemas. Comprender los diferentes factores que influyen la biología de las poblaciones de *Glomeromycota* es esencial para cualquier intento de conservación del ambiente, usos biotecnológicos o agricultura sustentable. Para ello: i) es necesario conocer las especies fúngicas nativas del sitio específico a cultivar; ii) establecer métodos rápidos y precisos para evaluar la densidad de propágulos del área y la efectividad de las poblaciones de HFMA nativas; iii) diseñar modelos que predigan el efecto de las prácticas agronómicas a implementar sobre las poblaciones de HFMA nativas.

Bibliografía

- Abd-Alla M.H., Omar S.A., Karanxha S. 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Appl Soil Ecol.* 14: 191–200.
- Alvarez R., Steinbach H.S. 2009. A review of the effects of tillage systems on some soil physical properties, water content, nitrate availability and crops yield in Argentine Pampas. *Soil Till Res.* 104: 1-15.
- Aon M.A., Sarena D.E., Burgos J.L., Cortassa S. 2001. (Micro)biological, chemical and physical properties of soils subjected to conventional or no-tillage management, and assessment of their quality status. *Soil Till Res.* 60:173-186.
- Augé R.M. 2001. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza.* 11, 3–42.
- Bethlenfalvai G.J., Mihara K.L., Schreiner R.P., McDaniel H. 1996. Mycorrhizae, biocides, and biocontrol. 1. Herbicide-mycorrhiza interactions in soybean and cocklebur treated with bentazon. *Appl Soil Ecol.* 3:197-204.
- Boatman N., Paget D., Hayman D.S., Mosse B. 1978. Effects of systemic fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and plant phosphate uptake. *Trans Br Mycol Soc.* 70: 443–450.
- Borowicz V.A. 2001. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant–pathogen relations? *Ecology.* 82: 3057–3068.
- Brundrett M.C., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizal in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra.
- Burpee L., Cole H. 1978. The influence of alachlor, trifluralin, and diazinon on the development of endogenous mycorrhizae in soybeans. *Bull Environ Contam Toxicol.* 19: 191-197.

- Cabello M.N. 1987. Micorrizas vesículo-arbusculares en un cultivo de girasol. Revista Facultad de Agronomía, La Plata. 63: 46–52.
- Covacevich F., Marino M.A., Echeverría H.E. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass. Eur J Soil Biol. 42:127-138.
- Covacevich F., Sainz Rozas H., Barbieri P., Echeverría H.E. 2005. Formas de colocación de fósforo sobre el crecimiento y la micorrización espontánea del cultivo de trigo. Ciencia del Suelo. 23: 39-45.
- Covacevich F., Sainz Rozas H., Barbieri P., Echeverría H.E. 2008. Crecimiento y micorrización arbuscular nativa de trigo en siembra directa bajo distintas formas de colocación de fósforo. Ciencia del Suelo. 26: 169-175.
- Crovetto C. 1985. Cero labranza, extraordinaria alternativa para el cultivo de cereales en suelos erosionados. VII International Conference of Soil Conservation, Maracaibo, Venezuela. IICA, Montevideo, Uruguay. pp. 461–472.
- Chambers C.A., Smith S.E., Smith F.A. 1980. Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. New Phytol. 85: 47-62.
- Diedhiou P.M., Oerke E.C., Dehne H.W. 2004. Effect of the strobilurin fungicides azoxystrobin and kresoximmethyl on arbuscular mycorrhizal. J Plant Dis Protect. 111: 545-556.
- Diosma G., Aulicino M., Chidichimo H., Balatti P.A. 2006. Effect of tillage and N fertilization on microbial physiological profile of soils cultivated with wheat. Soil Till Res. 91: 236-243.
- Dodd J.C., Jeffries P. 1989. Effect of fungicides on three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Biol Fertil Soils. 7:120-128.
- Doran J.W., Sarrantonio M., Liebig M.A. 1996. Soil Health and Sustainability. Advances in Agronomy. Vol. 56. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Dos Santos Maltz J., Siqueira O.J., Souza Moreira F.M. 2006. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. Pesq agropec bras Brasília. 41: 285-291.
- Douds D.D. Jr., Galvez L., Janke R.R., Wagoner P. 1995. Effect of tillage and farming systems upon populations and distribution of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. Agric Ecosyst Environ. 52: 111–118.
- Echeverría H.E., García F.O. 1998. Guía para la fertilización fosfatada de trigo, maíz y soja. Boletín Técnico 149, EEA INTA Balcarce. pp. 16.
- Feldman F., Boyle C. 1998. Weed-mediated stability of arbuscular mycorrhizal fungi effectiveness in maize monocultures. J Appl Bot. 73: 1-5.

- Ferreras L.A., Costa J.L., García F.O., Pecorari C. 2000. Effect of no tillage on some soils physical properties of a structured degraded petrocalcic paleudol of the southern «pampa» of Argentina. *Soil Till Res.* 54:31-39.
- Fertilizar. 2010. <http://www.fertilizar.org.ar/>
- Frey B., Valarino A., Schuepp H., Arines J. 1994. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biol Biochem.* 26: 711–717.
- García-Garrido J.M., Lenzemo V., Castellanos-Morales V., Steinkellner S., Vierheilig H. 2009. Strigolactones, signals for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 19: 449-459.
- Gavito M.E., Miller M.H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant Soil.* 198:185–192.
- Giovannetti M., Sbrana C., Avio L., Strani P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist.* 164: 175–181.
- Giovannetti M., Turrini A., Strani P., Sbrana C., Avio L., Pietrangeli B. 2006. Mycorrhizal fungi in ecotoxicological studies: Soil impact of fungicides, insecticides and herbicides. *Prevention Today.* 2: 47–61.
- Gosling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agric Ecosyst Environ.* 113:17–35.
- Grimoldi A.A., Kavanová M., Lattanzi F.A., Schnyder H. 2005. Phosphorus nutrition-mediated effects of arbuscular mycorrhiza on leaf morphology and carbon allocation in perennial ryegrass. *New Phytologist.* 168: 435–444.
- Groth D.E., Martinson C.A. 1983. Increased endomycorrhizal colonization of maize and soybeans after soil treatment with metalaxyl. *Plant Dis.* 67:1377–1378.
- Hale M.G., Sanders F.E. 1982. Effects of benomyl on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of red clover (*Trifolium pratense* L.) and consequences for phosphorus inflow. *J Plant Nutr.* 5: 1355-1367.
- Harley J.L., Smith S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Hawkins H.J., George E. 2001. Reduced 15N-nitrogen transport through Arbuscular Micorrizae hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Ann Bot.* 87: 303-311.
- Hayman D.S. 1970. Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Trans Brit Mycol Soc.* 54: 53-63.

- Hayman D.S. 1975. The occurrence of mycorrhiza in crops as affected by soil fertility. En: Sanders EF, B. Mosse, P.B. Tinker, editors. *Endomycorrhizas*. London: Academic Press. pp. 495-509.
- Hendrix J.W., Guo B.Z., An Z.Q. 1995. Divergence of mycorrhizal fungal communities in crop production systems. *Plant Soil*. 170:131-140.
- Hepper C.M. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist* 88. pp. 641-647.
- Hernández Dorrego A., Mestre Parés J. 2010. Evaluación del efecto de varios fungicidas sobre la simbiosis micorrícica entre dos especies de *Glomus* presentes en inóculos comerciales y plántulas de *Allium porrum* L. *Sp J Agric Res*. 8: 43-50.
- Hetrick B.A.D., Wilson G.W.T. 1991. Effects of mycorrhizal fungus species and metalaxyl application on microbial suppression of mycorrhizal symbiosis. *Mycol*. 83: 97-102.
- Hicks P.M., Loynachan T.E. 1987. Phosphorus fertilization reduces vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and changes nodule occupancy of field-grown soybeans *Agron J*. 79:841-844.
- Jansa J., Mozafar A., Anken T., Ruh R., Sanders I.R., Frossard E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza*. 12: 225-234.
- Jasper D.A., Abbott L.K., Robson A.D. 1992. Soil disturbance in native ecosystems – the decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi. En: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 151-155.
- Jeffries P., Dodd J.C. 1991. The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. En: *Handbook of applied Mycology*, vol.1 Soil and Plants. Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudsen, GR. (eds) Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Hong Kong. pp. 155-185.
- Jensen A., Jacobsen A. 1980. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in barley and wheat grown in some Danish soils with different fertilizer treatments. *Plant Soil*. 55: 403-414.
- Johnson N.C. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecol Appl*. 3: 749-757.
- Johnson N.C., Graham J.H., Smith F.A. 1997 Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*. 135: 575-585.
- Kabir Z., Koide R.T. 2000. The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize *Agric Ecosyst Environ*. 78: 167-174.

- Karasawa T., Kasahara Y., Takebe M. 2001. Variable response of growth and arbuscular mycorrhizal colonization of maize plants to preceding crops in various types of soils. *Biol Fertil Soils*. 33: 286-293.
- Kjøller R., Rosendahl S. 2000. Effects of fungicides in arbuscular mycorrhizal fungi: Differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biol Fertil Soils*. 31:361-365.
- Kling M., Jakobsen I. 1997. Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungal species: effect on ³²P transport and succinate dehydrogenase activity. *Mycorrhiza*. 7:33–37.
- Klironomos J.N., Hart M.M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12. pp. 181–184.
- Kruckelmann H.W. 1975 Effect of fertilizers, soils, soil tillage and plant species on the frequency of *Endogone* chlamidospores and mycorrhizal infections in arable soils. En: Sanders FE, B Mosse, PB Tinker, (eds.) *Endomycorrhizas*. Academic Press, New York. pp. 511.
- Kurle J.E., Pfleger F.L. 1994. The effects of cultural practices and pesticides on VAM fungi. En: Pfleger FL, Linderman RG (eds) *Mycorrhizae and plant health*. APS, St. Paul, Minn. pp. 101–132.
- Land S., von Alten H., Schonbeck F. 1993. The influence of host plant, nitrogen fertilization and fungicide application on the abundance and seasonal dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils of northern Germany. *Mycorrhiza* 2. pp. 157-166.
- Martinez A.E., Menendez A.B., Venedikian N., Chiocchio V., Godeas A. 1998. Influencia del insecticida Triflururón sobre la germinación de esporas de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares y la colonización de las raíces de las plantas de soja (*Glycine max* var. sojae). *Rev Fac Agron; La Plata*. 103: 135-140.
- McGonigle T.P., Miller M.H. 1996a. Mycorrhizae, phosphorus absorption, and yield of maize in response to tillage. *Soil Sci Soc Am J*. 60: 1856–1861.
- McGonigle T.P., Miller M.H. 1996b. Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed soils. *Soil Biol Biochem* 28. pp. 263–269.
- Menendez A., Martínez A., Chiocchio V., Venedikian N., Ocampo J.A., Godeas A. 1999. Influence of the insecticide dimethoate on arbuscular mycorrhizal colonization and growth in soybean plants. *Inter. Microbiol*. 2: 43-45.
- Miller D.D., Domoto P.A., Walker C. 1985. Mycorrhizal fungi at eighteen apple rootstock plantings in the United States. *New Phytologist* 100. pp. 379–391.

- Miranda J.C.C., Harris P.J. 1994. The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. *Plant Soil* 166. pp. 271–280.
- Modjo H.S., Hendrix J.W. 1986 The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology*. 76: 688–691.
- Morandi D. 1989. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiol Biochem*. 27: 697–701.
- Morton J.B., Koske R.E., Sturmer S.L., Bentivenga S.P. 2004. Mutualistic arbuscular endomycorrhizal fungi. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS. (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, Washington, DC. pp. 313–332.
- Mosse B., Phillips J.M. 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. *J Gen Microbiol*. 1971: 157–166.
- Mozafar A., Anken T., Ruh R., Frossard E. 2000. Tillage intensity, mycorrhizal and non-mycorrhizal fungi, and nutrient concentrations in maize, wheat, and canola. *Agronomy J*. 92: 1117–1124.
- Mujica M.T., Fracchia S., Ocampo J.A., Godeas A. 1999. Influence of the herbicides chlorsulfuron and glyphosate on mycorrhizal soybean intercropped with the weeds *Brassica campestris* or *Sorghum halepensis*. *Symbiosis*. 27: 73–81.
- Murillo-Williams A., Pedersen P. 2008. Arbuscular Mycorrhizal Colonization Response to Three Seed-Applied Fungicides. *Agron J*. 100: 795–800.
- Ocampo J.A. 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhiza. En: «Pesticide-plant pathogen interactions in crop production: Beneficial and deleterious effects». (Ed. J. Altman), pp 213–216. CRC Press, Boca-Raton Florida.
- Ocampo J.A., Barea J.M. 1985. Effect of carbamate herbicide on VA mycorrhizal infection and plant growth. *Plant Soil*. 85:375– 383.
- Õpik M. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of perennial plants and their effect on plant performance. PhD thesis, Faculty of Biology and Geography, University of Tartu, Estonia.
- Parvathi K., Venkateswarlu K., Rao A.S. 1985. Effects of pesticides on development of *Glomus mosseae* in groundnut. *Tran Br Mycol Soc*. 84:29–33.
- Powell J.R., Campbell R.G., Dunfield K.E., Gulden R.H., Hart M.M., Levy-Booth D.J., Klironomos J.N., Pauls K.P., Swanton C.J., Trevors J.T., Antunes P.M. 2009. Effect of glyphosate on the tripartite symbiosis formed by *Glomus intraradices*, *Bradyrhizobium japonicum*, and genetically modified soybean. *Appl Soil Ecol*. 41: 128–136.

- Read D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems – Nature’s response to the ‘Law of the minimum’ In: Hawksworth DL, eds. *Frontiers in mycology*. Regensburg, Germany: CAB International. pp. 101–130.
- Read D.J. 1997. The ties that bind. *Nature*. 388:517-518.
- Rejon A., Garcia-Romera I., Ocampo J.A., Bethlenfalvay G.J. 1997. Mycorrhizal fungi influence competition in a wheat-ryegrass association treated with the herbicide diclofop. *Appl Soil Ecol*. 7: 51-57.
- Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil*. 238: 325–333.
- Rillig M.C., Wright S.F., Torn M.S. 2001. Unusually large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil organic matter pools in tropical forest soils. *Plant Soil*. 233: 167-177.
- Ronco M.G., Ruscitti M.F., Arango M.C., Beltrano J. 2008. Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *J Horticult Sci Biotech*. 83: 497-505.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcón R., Palma J.M. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist* 134. pp. 327–333.
- Ryan M.H., Chilvers G.A., Dumaresq D.C. 1994. Colonisation of wheat by VA-mycorrhizal fungi was found to be higher on a farm managed in an organic manner than on a conventional neighbour. *Plant Soil*. 160: 33-40.
- Samarbakhsh S., Rejali F., Ardakani M.R., Paknejad F., Miransari M. 2009. The combined effects of fungicides and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.). Growth and yield under field conditions *J Biol Sci*. 9: 372-376.
- Satorre E.H. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 87. pp. 24-31
- Savin M.C., Purcell L.C., Daigh A., Manfredini A. 2009. Response of mycorrhizal infection to glyphosate applications and P fertilization in glyphosate-tolerant soybean, maize, and cotton. *J Plant Nut*. 32: 1702-1717.
- Schalamuk S., Cabello M. 2008. Efecto de la labranza sobre la diversidad de *Glomeromycota*. En: *Tópicos sobre diversidad, ecología y biotecnología de los hongos microscópicos*. Heredia Abarca, G. (ed.). Red Iberoamericana sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos (REDEMIC). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). PP. 196-216.
- Schalamuk S., Cabello M. 2010a. Effect of tillage systems on the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) propagule bank in soils. En: *Management of*

- Fugal Plant Pathogens: Current Trends and Progress. Arya A, Perelló A. (eds.) CABI Publishers. Gran Bretaña. pp. 162-170.
- Schalamuk S., Cabello M. 2010b. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible impacts on *Glomeromycota* diversity. *Mycologia*. 102: 261-268.
- Schalamuk S., Golik S., Chidichimo H., Cabello M. 2011. Effects of inoculation with *Glomus mosseae* in conventional tilled and non-tilled soils with different levels of nitrogen fertilization on wheat growth, arbuscular mycorrhizal colonization and nitrogen nutrition. *Com Soil Sci Plant Anal*. 42: 586-548.
- Schalamuk S., Velázquez S., Chidichimo H., Cabello M. 2003. Efecto de diferentes sistemas de labranza y fertilización sobre la simbiosis micorrizica arbuscular en cultivo de trigo. *Boletín micológico*. Valparaíso, Chile 18. pp. 15–19.
- Schalamuk S, S Velázquez, H Chidichimo, M Cabello, 2004 Effect of no-till and conventional tillage on mycorrhizal colonization in spring wheat. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39, 13–20.
- Schalamuk S., Velázquez S., Chidichimo H., Cabello M. 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effect of tillage. *Mycologia* 98. pp. 22–28.
- Schmitz O., Danneberg G., Hundeshagen B., Klingner A., Bothe H. 1992. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters. *J. Plant Physiol*. 139:106–114.
- Schreiner R.P., Bethlenfalvay G.J. 1996. Mycorrhizae, biocides, and biocontrol. 4. Response of a mixed culture of arbuscular mycorrhizal fungi and host plant to three fungicides. *Biol Fertil Soils*. 23:189–195.
- Schriener R.P., Bethlenfalvay G.J. 1997. Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stresses. *Appl Soil Ecol*. 7:93-102.
- Schubler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res*. 105: 1413-1421.
- Schweiger P.F., Jakobsen I. 1998. Dose-response relationships between four pesticides and phosphorus uptake by hyphae of arbuscular mycorrhizas. *Soil Biol Biochem*. pp. 1415-1422.
- Sieverding E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ No 224, Eschborn.
- Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Third Edition. Academic Press, London.

- Solbrig O.T. 2005. La historia del concepto de paradigma en la ciencia y la agricultura. En: El Futuro y los Cambios de Paradigmas. Proceeding del XIII Congreso Anual de AAPRESID. Rosario. pp. 11-13.
- Sreenivasa M.N., Bagyaraj D.J. 1989. Use of pesticides for mass production of vesicular–arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Soil* 119, 127–132.
- Sukarno N., Smith S.E., Scott E.S. 1996. The effect of fungicide on vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. II. The effects on area of interface and efficiency of P uptake and transfer to plant. *New Phytologist*. 132: 583-592.
- Thingstrup I., Rosendahl S. 1994. Quantification of fungal activity in arbuscular mycorrhizal symbiosis by polyacrylamide gel electrophoresis and densitometry of malate dehydrogenase. *Soil Biol Biochem*. 26: 1483–1489.
- Tommerup I.C., Abbott L.K. 1981. Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol Biochem*. 13: 431–433.
- Trappe J.M., Molina R., Castellano M. 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Ann Rev Phytopathol*. 22: 331-359.
- Treseder K.K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytol*. 164: 347-355.
- Venedikian N., Chiocchio V., Martinez A., Menendez A., Ocampo J.A., Godeas A. 1999. Influence of the fungicides carbendazim and chlorothalonil on spore germination, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean plants. *Agrochimica* 43. pp. 105–109.
- Vierheilig H., Garcia-Garrido J.M., Wyss U., Piché Y. 2000. Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol Biochem*. 32:589–595.
- Vierheilig H., Piché Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. En: Buslig B, Manthey JA (eds) *Flavonoids in cell function*. Kluwer Academic, New York. pp. 23–39.
- Vierheilig H. 2004a. Regulatory mechanisms during the plant–arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Can J Bot*. 82: 1166–1176.
- Vierheilig H. 2004b. Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants is suppressed after a critical level of root colonization. *J Plant Physiol*. 161:339–341.
- Vijayalakshmi M., Rao A.S. 1993. Influence of fungicides on vesicular–arbuscular mycorrhizae in *Sesamum indicum* L. *Microbiol Res*. 148: 483-486.

- Vivekanandan M., Fixen P. 1991. Cropping systems effects on mycorrhizal colonization, early growth, and phosphorus uptake of corn. *Soil Sci Soc Am J.* 55: 136- 140.
- Wilson J.M., Tommerup I.C. 1992. Interactions between fungal symbionts: VA mycorrhizae. En: Allen MF (ed) *Mycorrhizal functioning, an integrated plant-fungal process*. Chapman and Hall, New York. pp. 199–248.
- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil.* 181: 193–203.
- Wright S.F., Starr J.L., Paltineanu I.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. *Soil Sci Soc Am J.* 63: 1825-1829.
- Wright S.F., Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* 198: 97–107.

Capítulo 4

Huellas de la simbiosis pasto-endofito en el agroecosistema

Footprints of grass-endophyte symbiosis in agroecosystems

Marina Omacini, Pedro E. Gundel, María Semmartin

Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, Departamento de Recursos Naturales. Av San Martín 4453 (C1417DSE), Buenos Aires, Argentina.
E-mail: omacini@agro.uba.ar

Introducción

La mayoría de las especies vegetales establecen relaciones simbióticas con una gran variedad de microorganismos y, si bien estos simbiosiontes frecuentemente son inadvertidos, al alojarse en sus tejidos modifican a su hospedante y su interacción con el ambiente (Rodríguez et al. 2008, Hartley, Gange 2009, Douglas 2010). Estos efectos pueden tener un gran impacto en la estructura y el funcionamiento de las comunidades vegetales y de sus organismos asociados (Clay, Holah 1999, Omacini et al. 2001, Clay, Schardl 2002). Las interacciones simbióticas más estudiadas, particularmente en contextos productivos, son las asociaciones de plantas con microorganismos edáficos que confieren ventajas a la planta hospedante frente a una baja disponibilidad de nutrientes (van der Heijden, Sanders 2002, Douglas 2010). Por ejemplo, una recopilación basada en la base Scopus, de los trabajos publicados desde la primera descripción del fenómeno de simbiosis como dos organismos que viven juntos (De Bary 1879) demuestra que las tres cuartas partes de los trabajos realizados con plantas que incluyen el término «simbiosis» en su título, resumen o palabras clave, consideran la asociación de plantas con bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Rizobium*, o con distintas especies de hongos formadores de micorrizas.

Otros simbiosiontes que han sido notablemente menos estudiados son los hongos endofitos asexuales del género *Neotyphodium* (Clavicipitaceae: Balansieae) (Figura 1). El interés por estos organismos comenzó alrededor de la década de los ochenta, cuando se descubrió que su presencia en los pastos estaba asociada a intoxicaciones en el ganado con síntomas similares a los del ergotismo, ocasionando grandes pérdidas económicas en los Estados Unidos y Nueva Zelanda (Bove 1970, Bacon, Hill 1997, Fletcher, Easton 1997, Fletcher 2005). Recién durante los últimos 10 años se generó un volumen de información equivalente al que se tenía para

Rizobium en la década del sesenta (Figura 1). Estos hongos se encuentran en los tejidos aéreos vegetativos y en las semillas de un gran número de gramíneas (Clay, Schardl 2002, Iannone et al. 2010). Además de los fenómenos de toxicidad inicialmente investigados, se identificaron otros efectos importantes de los endofitos tales como otorgarles a sus hospedantes resistencia a diversos factores de estrés (Malinowski, Belesky 2000, Rodríguez et al. 2008, Hartley, Gange 2009). De esta manera, la comprensión del impacto de la interacción entre pastos y hongos endofitos sobre procesos fundamentales del ecosistema se transformó en una meta relevante de la investigación ecológica y agronómica en los últimos años ya que las plantas conforman la base de la pirámide trófica en la mayoría de los agroecosistemas (es decir que representan la fuente de energía y nutrientes disponibles para el resto de los organismos). Recientemente se ha considerado que los endófitos así como otros organismos heterótrofos (herbívoros domésticos y los patógenos foliares), tienen la capacidad de afectar no sólo la magnitud de la fijación de carbono por las plantas (McNaughton 1983) sino también de modificar la tasa a la cual se mineralizan el carbono y los nutrientes depositados en el suelo en forma de residuos (Omacini et al. 2004). Estos efectos involucrarían modificaciones en la estructura y el funcionamiento de las comunidades bióticas del suelo mediadas por la respuesta de las plantas al simbiote, lo que a su vez repercutiría en la composición, diversidad y dinámica de la vegetación (Bever 1994, Omacini et al. 2005).

En este capítulo, en primer lugar describiremos los aspectos biológicos, ecológicos y agronómicos más salientes de la simbiosis entre pastos y hongos endofitos asexuales. En segundo lugar sintetizaremos el conocimiento actual acerca de las vías por las cuales estos endofitos pueden modificar las relaciones que establecen las plantas hospedantes con la biota del suelo, a corto plazo, es decir sin que medie un cambio en la composición de la comunidad vegetal, y a largo plazo, una vez que se moduló la estructura y el funcionamiento de las comunidades. A lo largo del trabajo, identificaremos los vacíos de conocimiento acerca de las implicancias de esta simbiosis para el manejo del agroecosistema y en qué medida existen alternativas para manipularla de manera tal que redunden en una menor utilización de insumos (Tikhonovich, Provorov 2007).

Desarrollo

La simbiosis pasto-endofito

Muchas especies de pastos de estación templado-fría forman simbiosis con hongos asexuales de la familia Clavicipitaceae (Ascomycota) del género *Neotyphodium* (antes conocido como *Acremonium* sect. *Albolanosa* Morgan-Jones; Glenn et al. 1996). De acuerdo con estudios filogenéticos, las diferentes especies de *Neotyphodium* surgieron de forma independiente a

partir de ancestros sexuales del género *Epichloë* y, en general, a partir de hibridaciones inter-específicas (Cabral et al. 1999, Moon et al. 2000, Clay, Schardl 2002, Iannone et al. 2009). Las hifas de estos hongos crecen de forma sistémica entre las células de las hojas, los tallos y los órganos reproductivos del hospedante sin causar ningún síntoma de enfermedad (Rodríguez et al. 2009) (ver Fotos en Figura 2). A diferencia de sus ancestros patógenos, los endofitos *Neotyphodium* carecen de reproducción sexual y transmisión horizontal, lo que significa que se reproducen exclusivamente de forma asexual y vertical a través de las semillas de los pastos (estrategia Tipo III, *sensu*, White 1987 o clase I *sensu*, Rodríguez et al. 2009) (Figura 2). De esta manera, la simbiosis pasto-endofito es obligada para los hongos, mientras que para las plantas es facultativa ya que pueden vivir sin ellos. La teoría evolutiva predice que una interacción con tales características debería resultar en mutualista: mientras que la planta le proporciona al endofito nutrición, protección y medio de multiplicación y dispersión, el endofito confiere a la planta resistencia a la herbivoría (mediada por alcaloides) y tolerancia al estrés oxidativo (Malinowski, Belesky 2000, Clay, Schardl 2002, Rodríguez et al. 2009, White, Torres 2010). No obstante, las poblaciones en la naturaleza presentan una frecuencia de infección variable, lo que indica que también existiría variabilidad en la efectividad del mutualismo y/o en la eficiencia de transmisión del endofito (Clay, Schardl 2002, Saikkonen et al. 2004, Gundel et al. 2008a)

La adecuada comprensión del proceso de transmisión del endofito y los factores que lo controlan resulta clave para poder predecir y, eventualmente, manejar la frecuencia de infección en las poblaciones de pastos nativos o introducidos en pasturas. Si bien este proceso ha sido percibido como altamente eficiente (Clay, Schardl 2002), en los últimos tiempos esta percepción comenzó a ser cuestionada (Gundel et al. 2008b). Así, se encontró que la eficiencia de transmisión vertical del endofito puede ser variable, en especial cuando se consideran los distintos estadios del ciclo de vida del pasto hospedante en un contexto poblacional (Gundel et al. 2008b). Cuando una semilla infectada germina, las hifas ubicadas en los espacios intercelulares del embrión pueden luego ser observadas en los meristemas y en la base de las hojas de la plántula emergida (Figura 2). Dado que las hifas se asocian de manera muy estrecha a los meristemas, el endofito alcanza los macollos, las hojas o las flores muy tempranamente en la diferenciación (Clay, Schardl 2002, Saikkonen et al. 2004). Por lo tanto, en las especies perennes el endofito puede mantenerse a través de la reproducción vegetativa (Ejemplo, macollaje), pero en las especies anuales la semilla es la única unidad de multiplicación y de dispersión de los dos socios de la simbiosis. La transmisión puede presentar ineficiencias parciales a causa de la muerte anticipada del endofito en las semillas, y por la producción de macollos, espigas y semillas no infectadas (Figura 2). Estas variaciones en las tasas parciales de transmisión, que han sido detectadas en poblaciones tanto de especies nativas como de introducidas

(Afkhami, Rudgers 2008; Gundel et al. 2009), parecen depender de factores abióticos como bióticos. Sin embargo, hasta el presente prácticamente no existe información acerca de cómo operan los distintos factores ecológicos (Ejemplo; disponibilidad de agua y nutrientes, herbivoría, etc.) sobre el proceso de transmisión, un conocimiento ineludible para posibilitar el manejo de la simbiosis en contextos productivos.

Los pastos hospedantes suelen experimentar cambios químicos, fisiológicos y morfológicos importantes a causa de los endofitos (Clay, Schardl 2002). Aunque la presencia del endofito puede cambiar el perfil metabólico completo del pasto (Malinowski, Belesky 2000; Rasmussen et al. 2008), se supone que los principales beneficios que el pasto obtiene se deben a los alcaloides tóxicos que se acumulan en sus tejidos (Bush et al. 1997, White, Torres 2010). Si bien el micelio del endofito está restringido a la parte aérea de la planta, la acción de los alcaloides puede alcanzar incluso la parte subterránea (Bush et al. 1993, Malinowski, Beleski 2000). Existen cuatro grupos de alcaloides, lolinas, peraminas, ergopeptínicos y lolitrenos, a los que se le conoce la función que desempeña en cuanto a la protección de los hospedantes contra herbívoros vertebrados e invertebrados (Siegel et al. 1990; Bush et al. 1993; 1997; Popay, Bonos 2005). Las concentraciones de los diversos alcaloides varían entre genotipos de hongos y pastos (Faeth et al. 2002) y, también, entre ambientes (Bultman, Bell 2003; Rasmussen et al. 2008). En particular, las lolinas sólo están presentes en los pastos infectados con este tipo de endofitos; poseen una actividad insecticida de amplio espectro y, en general, no son tóxicas para los mamíferos (Bush et al. 1997; Wilkinson et al. 2000). También se ha observado que otros metabolitos secundarios (e.g., compuestos fenólicos) pueden aumentar su concentración en los tejidos de los pastos infectados. Estos metabolitos secundarios se exudan por las raíces de las plantas infectadas (Malinowski et al. 1998), por lo que podrían ejercer efectos importantes sobre las condiciones químicas y la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera tanto de la planta infectada como de sus vecinas (Omacini et al. 2005).

Si bien la mayor parte del conocimiento de la simbiosis pasto-endofito ha surgido de estudios en *F. arundinacea* y *L. perenne* (Saikonen et al. 2006, Rudgers, Clay 2007), algunos autores sugieren que entre un 20 y un 30% de las gramíneas pueden estar infectadas con endofitos sistémicos (Leuchtman 1992; Clay, Schardl 2002). Constantemente se describen nuevas asociaciones en diversas regiones del mundo (White et al. 2001; Cabral et al. 1999; Moon et al. 2000; Rolston et al. 2002; Iannone et al. 2010). En nuestro país, estos hongos endofitos se asocian con varias especies de pastos de regiones áridas y semiáridas, templadas (Cabral et al. 1999; White et al. 2001; Torres et al. 2004). Una revisión reciente permitió establecer que de un total de 80 especies coleccionadas, 34 estaban asociadas a endofitos, en un total 205 sitios del territorio argentino (Iannone et al. 2010). De todas estas especies,

cuatro resultan tóxicas para el ganado: *Poa huecu*, *Festuca argentina*, *F. hieronymi* y *F. dissitiflora*. Ya en 1950, Parodi había señalado que las tres primeras eran muy tóxicas para los herbívoros. Recién 49 años después de tal observación, Cabral y colaboradores (1999) determinaron que esa toxicidad se debía a la infección con hongos endofitos de la especie *N. tembladeraae*. En el caso de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne*, estas especies están ampliamente difundidas en las regiones templado-húmedas de la Argentina y su asociación con los endofitos *N. coenophialum* y *N. lolii*, respectivamente, también tiene consecuencias negativas sobre el ganado, si bien su incidencia es menor que la documentada en otros países (de Battista 2005; Gundel et al. 2009).

El significado ecológico de la simbiosis en el suelo

El impacto de la presencia de los hongos endofitos se puede estudiar en una jerarquía de dominios ecológicos que van desde la planta hospedante hasta la comunidad biológica que la circunda, y de la que forma parte, tanto aérea como subterránea (Wardle et al. 2004; Omacini et al. 2005; van der Putten et al. 2009) (Figura 3). De esta manera, los cambios inducidos en la morfología, fisiología o química del hospedante se pueden propagar hacia los organismos y procesos que determinan atributos de las comunidades tales como la diversidad, la estructura de la cadena trófica o la resistencia a la invasión por nuevas especies. Estos cambios, además de guardar una relación entre la porción aérea y la subterránea, pueden ocurrir en tiempos cortos, y fundamentalmente ligados a respuestas ecofisiológicas de los individuos infectados, o bien en tiempos más prolongados, en los que medien cambios en la composición de la vegetación debido a sus efectos indirectos en las interacciones entre las especies presentes en el ecosistema (Figura 3). En definitiva, el resultado de lo que ocurre en el tiempo ecológico y en el evolutivo determina el éxito tanto de la simbiosis como del pasto hospedante en la comunidad (Figura 3) (Gundel et al. 2010).

Los cambios en la actividad de la microbiota del suelo debidos a la simbiosis pasto-endofito se pueden observar en tiempos cortos, antes de que se detecten modificaciones en la composición y en la diversidad de la vegetación (Clay, Holah 1999). Un ejemplo de esto es la estimulación de la respiración microbiana del suelo frente al agregado de rizodeposiciones de plantas de *Festuca arundinacea* infectadas con *Neotyphodium coenophialum*, con respecto a sus equivalentes no infectadas (Van Hecke et al. 2005). Otro ejemplo similar lo constituye la mayor capacidad de reducir el Fe^{3+} en el ambiente rizosférico de plantas infectadas de la misma especie (Malinowski et al. 1998). Recientemente, en un ensayo bajo condiciones controladas encontramos que la presencia de *N. occultans* en el pasto anual *Lolium multiflorum*, alteró la capacidad funcional de los microorganismos del suelo con respecto a sus congéneres sin endofito, luego de una estación de crecimiento del pasto (Casas et al. 2010). Ese lapso de 26 semanas resultó suficiente para apreciar un cambio en la respuesta del suelo al agregado

de diferentes fuentes carbonadas de distinta complejidad (perfil catabólico), y un aumento en la contribución relativa de los hongos a la actividad del suelo (Casas et al. 2010). En ese mismo estudio, también se observaron cambios pequeños en la estructura de la comunidad bacteriana, pero no se detectaron modificaciones en su actividad. Si bien la medición de las rizodeposiciones en el suelo enfrenta serias restricciones metodológicas, en plantas de *L. multiflorum* creciendo en medio de cultivo se observó que la presencia del endofito les confería una mayor capacidad de acidificar el medio externo (Vila Aiub et al. 2003).

No todos los hongos del suelo responden de la misma manera a la presencia del endofito, e incluso existen algunas evidencias que sugieren que una misma asociación pasto-endofito puede comportarse de diferentes maneras según si el hongo es de vida libre o si coloniza un tejido del pasto hospedante. Se ha demostrado que la presencia del endofito en los tejidos aéreos de ciertas forrajeras como *F. arundinacea*, *L. perenne* y *L. multiflorum*, puede disminuir la colonización de hongos formadores de micorrizas (Guo et al. 1992; Müller 2003; Omacini et al. 2006; Mack, Rudgers 2008). En el caso particular de *L. multiflorum*, las raíces de las plantas infectadas con endofitos presentaron entre 10 y 16% de colonización, lo que representa un tercio del nivel de colonización alcanzado por las plantas no infectadas (36-47%) (Omacini et al. 2006). Sin embargo, en experimentos realizados a campo con pastos nativos de la Argentina (*Poa bonariensis* y *Bromus setifolius*) se ha observado una mayor colonización de hongos micorríticos en las raíces de plantas infectadas con respecto a sus congéneres no infectadas (Novas et al. 2009). Si bien estos estudios no incluyeron el estudio de los mecanismos que regulan el nivel de colonización micorrítica entre plantas infectadas y no infectadas con endofitos, existen evidencias de que pueden mediar complejas interacciones con otros niveles tróficos. Por ejemplo, Vicari et al. (2002) detectaron que el endofito puede reducir el crecimiento de las larvas de lepidópteros en ausencia de micorrizas, pero no cuando ambos simbiosntes están presentes en el mismo hospedante. Por lo tanto, ignorar la presencia del endofito como componente del ecosistema puede llevar a interpretaciones erróneas, ya que estos hongos modifican el funcionamiento de las micorrizas y también a otras interacciones.

Existen relativamente pocos estudios en los que se haya evaluado el impacto de los endofitos sobre otros organismos del suelo en el corto plazo, y sus resultados también son muy variables. Por un lado, se ha detectado que la infección puede reducir el daño por herbívoros de raíz (Popay, Bonos 2005). Pedersen y colaboradores et al. (1988), trabajando con *F. arundinacea*, encontraron que la densidad de nemátodos fitófagos puede ser más alta en las raíces y en la rizósfera de las plantas con bajo nivel de infección endofítica que en la rizósfera de las plantas con alto nivel de infección. Por su parte, Chu-chou y colaboradores et al. (1992) observaron que la abundancia de los nemátodos parásitos *Helicotylencus* spp. y *Tylenchus* spp. disminuyó en parcelas experimentales sembradas con plantas de *F. arundinacea* infectadas con

endofito, mientras que los nemátodos no parasíticos no fueron afectados. En el pasto *Festuca pratensis*, Popay y colaboradores (2003) observaron que la presencia del endofito promovía tanto una disminución en la densidad de larvas de *Costelytra zealandica* como un menor nivel de daño en las raíces. Por otro lado, existen algunas evidencias de que la presencia de plantas infectadas con endofito podría reducir la capacidad de fijar nitrógeno en pasturas. Esto sucedería a través de la reducción del éxito de las leguminosas en las pasturas sembradas con la simbiosis *L. perenne*-*N. lolii* (Sutherland, Hoglund 1989) y *F. arundinacea*-*N. coenophialum* (Clay, Holah 1999). En experimentos realizados en invernáculo también se observó que la supresión de la leguminosa *Trifolium repens* depende del cultivar de pasto sembrado dado que estos efectos negativos aumentan con en aquellos cultivares en los que la producción de alcaloides es mayor. Por esta razón, algunos investigadores sugieren que la alelopatía es uno de los mecanismos involucrados en ese efecto (Malinowski et al. 1999, Sutherland et al. 1999). Aún son necesarios estudios en los que se evalúe en qué medida la supresión de las leguminosas frente a la presencia del endofito se debe un aumento en la habilidad competitiva del pasto hospedante y/o a un efecto indirecto sobre la capacidad de nodular y la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Ejemplo *Rhizobium*).

También en el corto plazo, una vez finalizado el ciclo de crecimiento del pasto hospedante, el endofito que queda en sus tejidos puede alterar procesos clave del suelo a través de varios caminos (Omacini et al. 2004) (Figura 4). En primer lugar, las plantas infectadas que son naturalmente poco palatables para muchos herbívoros (Clay 1990; Bush et al. 1997) pueden constituir un sustrato de baja calidad para los organismos detritívoros y ‘por lo tanto descomponerse más lentamente que las los materiales depositados por as plantas no infectadas. Los cambios en la química de la planta hospedante, algunos de ellos desconocidos, podrían persistir en las hojas senescentes y determinar cambios en la tasa de descomposición (Bush et al. 1997; Siegrist et al. 2010). En segundo lugar, la presencia de *Neotyphodium* puede alterar el microambiente edáfico y la descomposición de otros sustratos al cambiar la cantidad y calidad de la broza sobre la superficie del suelo, o la broza subterránea producida por la muerte de raíces. En este sentido, evidencias empíricas mostraron menores tasas de descomposición del mantillo producido por plantas de *L. multiflorum* y de *F. arundinacea* infectadas con respecto a sus congéneres no infectadas (Omacini et al. 2004; Lemons et al. 2005; Siegrist et al. 2010) y una menor tasa de descomposición de la broza de pastos no infectados depositados en ambientes donde antes crecieron plantas con alto nivel de infección (Omacini et al. 2004). Sin duda, los efectos del endofito en la calidad de la broza y en su persistencia podrían, a su vez, alterar la disponibilidad de nutrientes para las especies presentes en el sitio (Franzluebbers et al. 1999) y la condiciones bióticas y abióticas para la germinación y el establecimiento de la próxima generación de plantas (Antunes et al. 2008, Omacini et al. 2009).

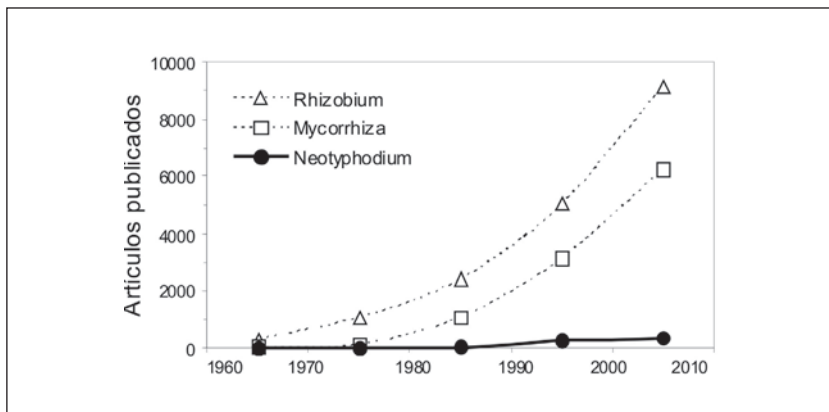


Figura 1: Dinámica temporal de la cantidad de artículos recopilados por la base de datos Scopus que incluyen en su título, resumen y/o palabras clave, cada uno de los tres tipos de simbiontes. La cantidad de artículos está agrupada por década, desde 1961 hasta 2010. Nótese que durante las décadas de los sesenta y setenta, no se registran artículos con el término *Neotyphodium* (o *Acremonium coenophialum* o *A. lolii*, como se lo denominó al endofito de *Festuca arundinaceae* y *Lolium perenne* inicialmente).

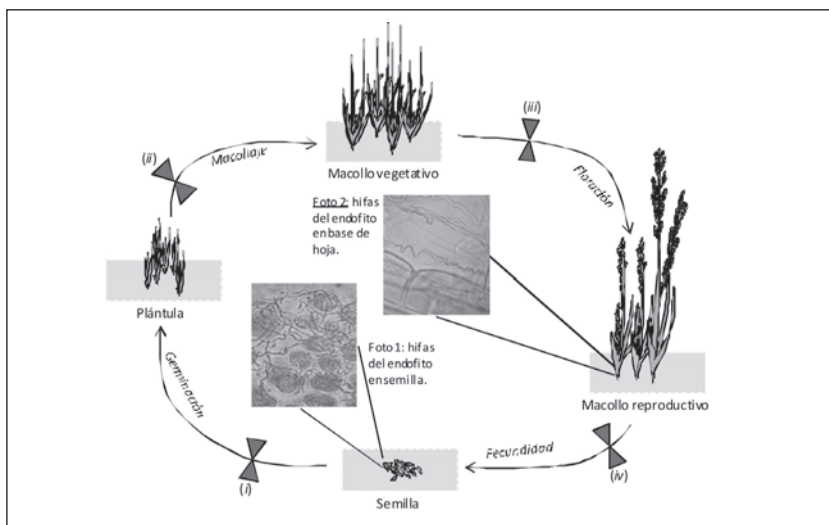


Figura 2: Ciclo de vida del hongo endófito *Neotyphodium* en relación al ciclo de vida del pasto hospedante. Se indican las tasas vitales en cada estadio del ciclo junto con las eficiencias parciales de transmisión del endofito (llaves de flojo): (i) de semilla a plántula, (ii) de plántula a macollo vegetativo, (iii) de macollo vegetativo a macollo reproductivo y (iv) de macollo vegetativo a las semillas. Las fotos fueron tomadas por Cecilia Casas y Luis Pérez muestran las hifas del endofito (teñidas con rosa de bengala) en distintos órganos de la planta (200x).

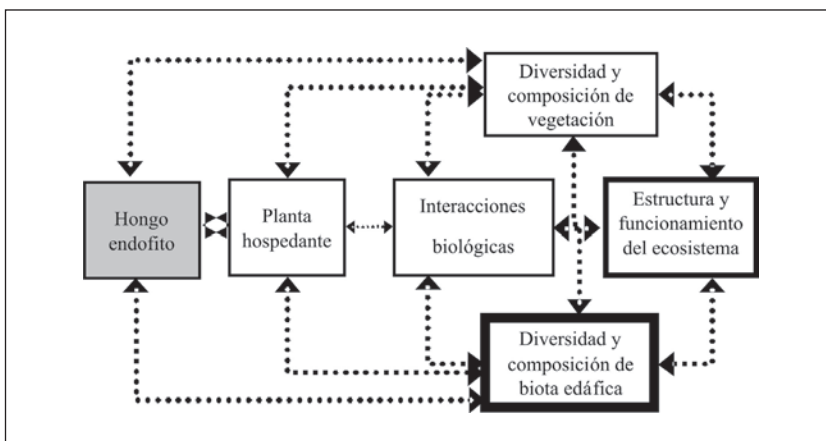


Figura 3: Esquema de los efectos que puede tener la infección con hongos endofitos sobre la estructura y el funcionamiento de los agroecosistemas. Las flechas en ambas direcciones indican que los efectos tanto en componentes aéreos como subterráneos de los ecosistemas pueden modificar, a su vez, el éxito tanto del pasto como del hongo simbiote.

Una cantidad de estudios de más largo plazo, realizados en pastizales han encontrado que la abundancia de individuos infectados aumenta con el paso del tiempo (Clay, Schardl 2002). Esto sugiere que los cambios en la dominancia de la simbiosis deberían ser acompañados por cambios en la estructura y la dinámica del resto de la comunidad pero son muy pocos los trabajos publicados en los que se compara la composición y la diversidad de especies entre sitios similares que sólo difieren en el nivel de infección por endofitos (Omacini et al. 2005). En particular, un experimento a campo realizado por Clay and Holah (1999) se destaca por haber demostrado que la presencia de *N. coenophialum* en *F. arundinacea* limita drásticamente tanto el número de especies vegetales como la tasa de entrada de especies arbóreas durante la sucesión (Clay, Schardl 2002). Recientemente, Rudgers and Orr (2009) realizaron un experimento en el que sembraron 9 especies arbóreas en los suelos de esas mismas parcelas experimentales; sus resultados mostraron que en el suelo condicionado por *F. arundinacea* infectada se redujo la biomasa de al menos tres especies y la supervivencia de una de ellas, en comparación con el suelo condicionado por *F. arundinacea* no infectada. Además, algunos de estos efectos de la presencia previa de la simbiosis pasto-endofito se borraban cuando el suelo había sido esterilizado. Estos resultados sugieren que en las primeras etapas de la sucesión, los efectos del endofito (tanto en el suelo como en la vegetación) pueden generar cambios en la dirección futura de la comunidad vegetal. Es evidente que solo estamos comenzando a entender en qué medida los efectos en el hospedante y luego en la comunidad vegetal pueden repercutir en el suelo y controlar la dinámica y el funcionamiento del ecosistema. Se necesitan experimentos manipulativos de largo plazo para saber si los efectos a nivel de la comunidad

están asociados a un cambio en el vigor y la tolerancia al estrés de las plantas infectadas, así como a mecanismos indirectos que involucran efectos del endofito sobre las condiciones ambientales y las comunidades del suelo (Matthews, Clay 2001).

Conclusiones

Las evidencias presentadas en este capítulo muestran que, si bien ciertas asociaciones de pastos con hongos endofitos afectan negativamente la producción pecuaria, esta simbiosis está ampliamente difundida en otras especies e impactan de maneras muy diversas, y muchas veces ignoradas, otros componentes del agroecosistema. En el componente subterráneo del ecosistema, durante los últimos años, se ha identificado la «huella» del endofito sobre la composición y el funcionamiento de la biota edáfica, en general, y de ciertos grupos, en particular, tales como los hongos formadores de micorrizas, las bacterias fijadoras de nitrógeno y los nematodos herbívoros. Sin embargo, resulta llamativo que hasta el presente los endofitos hayan sido prácticamente ignorados por los investigadores en esta red de conexiones entre los componentes aéreos y subterráneos de los ecosistemas (Wardle 2002).

El uso creciente de agroquímicos en los planteos productivos y el impacto ambiental y sobre la salud humana que acarrearán, ha estimulado a los científicos para encontrar alternativas más sustentables en el manejo de los agroecosistemas (Tikhonovich, Provorov 2007). Así, se ha generado conocimiento que permitió el desarrollo de herramientas de control biológico de plagas, de fijación simbiótica de nutrientes, de promotores del crecimiento y otros. En este sentido, la posibilidad de aprovechar los beneficios naturales de la presencia de los endofitos *Neotyphodium* parece ser una opción atractiva y posible en este mismo camino. En este momento, se están realizando grandes esfuerzos por encontrar genotipos, o modificar los preexistentes, para lograr, mediante el uso de endofitos no tóxicos, variedades forrajeras más persistentes y productivas (Panaccione et al. 2001; Colabelli et al. 2007). De manera similar, la existencia de variabilidad natural en el perfil de alcaloides producido por los endofitos según su genotipo, el del pasto hospedante y/o el ambiente, ha llevado a considerar la inclusión de este simbiote en los planes de mejoramiento de gramíneas ornamentales y para césped (Easton 2007). Si duda, se requiere mayor conocimiento de los factores que controlan los efectos deseables e indeseables de los endofitos y de aquellos que controlan la persistencia y abundancia de la simbiosis en el sistema.

Agradecimientos

Las ideas presentadas en este trabajo fueron desarrolladas gracias a nuestra interacción cotidiana con Claudio Ghera y con los estudiantes del

grupo de investigación, en particular Cecilia Casas, Luis Pérez y Pablo García Parisi. Agradecemos también a Pablo Roset por revisar versiones previas de este manuscrito. El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBA), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT).

Bibliografía

- Afkhami M., Rudgers J. 2008. Symbiosis Lost: Imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *Am Nat.* 175: 405-416.
- Antunes P., Miller J., Carvalho L., Klironomos J.N., Newman J. 2008. Even after death the endophytic fungus of *Schedonorus phoenix* reduces the arbuscular mycorrhizas of other plants. *Funct Ecol.* 22: 912-918.
- Bacon C.W., Hill N.S. 1997. *Neotyphodium*/grass interactions. Plenum, NY.
- Bever J.D. 1994. Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology.* 75: 1965-1977.
- Bove F. 1970. The story of Ergot. NY.
- Bultman T.L., Bell G.D. 2003. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. *Oikos.* 103: 182-190.
- Bush L.P., Fannin F.F., Siegel M.R., Dhlman D.L., Burton H.R. 1993. Lolitrems, peramine and paxiline: micotoxins of the ryegrass/endophyte interactions. *Agr Ecosyst Environ.* 44: 143-156.
- Bush L.P., Wilkinson H.H., Schardl C.L. 1997. Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbiosis. *Plant Physiol.* 114: 1-7.
- Cabral D., Cafaro M., Saidman B., Lugo M. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South american grasses. *Mycologia.* 91: 315-325.
- Casas C., Omacini M., Montecchia M., Correa O. 2011. Soil microbial community responses to the fungal endophyte *Neotyphodium* in Italian ryegrass. *Plant Soil* 340:347-355.
- Chu-Chou M., Guo B., An Z.Q., Hendrix J.W., Ferriss R., Siegel D.I., Dougherty C., Burrus P. 1992. Suppression of mycorrhizal fungi in fescue by the *Acremonium coenophialum* endophyte. *Soil Biol Biochem.* 24: 633-637.
- Clay K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Ann Rev Ecol Sys.* 21: 275-295.
- Clay K., Holah J. 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science.* 285: 1742-1744.

- Clay K., Schardl C.L. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Midl.Nat.* 160: 99-127.
- Colabelli M., Clausen A., De Battista J., Costa M.C., Torres M., Re A., Gonzalez Wetzel V., Peretti A., Pinget D., Medvescigh J. 2007. Incidencia de endofitos tipo *Neotyphodium* en forrajeras nativas y naturalizadas e impacto agronómico en *Lolium multiflorum* Lam. en la Argentina. En: PROCISUR (ed.) Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur. pp. 108.
- de Bary, H.A. 1879. Die Erscheinung der Symbiose. Verlag von Karl J. Trubner. Strassburg.
- de Battista J. 2005. *Neotyphodium* research and application: current trends in South America. En: Roberts C., West C.P., Spiers D. (eds.) *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses. Blackwell publishing. pp. 65-71.
- Douglas A. 2010. The symbiotic habit. Princeton University press, Princeton, New Jersey.
- Easton H. 2007. Grasses and *Neotyphodium* endophytes: co-adaptation and adaptative breeding. *Euphytica*. 154: 295-306.
- Fletcher L. 2005. Managing ryegrass-endophyte toxicoses. En: Roberts C., West.C.P., Spiers.D. (eds.) *Neotyphodium* in cool-season grasses, Ohio, USA. pp. 229-242.
- Fletcher L., Easton H. 1997. The evaluation and use of endophytes for pasture improvement. En: CW, B, Hill, N (eds.) *Neotyphodium/grass* interactions.
- Franzluebbers A.J., Nazih N., Stuedemann J.A., Fuhrmann J.J., Shomberg H.H., Hartel P.G. 1999. Soil carbon and nitrogen pools under low- and high-endophyte-infected tall fescue. *Soil Sci Soc Am J*. 63: 1687-1694.
- Glenn A., Bacon C., Price R., Hanlin R. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*. 88: 369-383.
- Gundel P., Batista W.B., Texeira M., Martinez-Ghersa M., Omacini M., Ghersa C.M. 2008. *Neotyphodium* endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proc R Soc Lond. B* 275: 897-905.
- Gundel P., Garibaldi L., Tognetti P., Aragon R., Ghersa C.M., Omacini M. 2009. Imperfect vertical transmission of the endophyte *Neotyphodium* in exotic grasses in grasslands of the Flooding Pampa. *Microb Ecol*. 57: 740-748.
- Gundel P., Omacini M., Martinez-Ghersa M., Ghersa C.M. 2008b. Herbivory mediates grass-endophyte relationships: comment. *Ecology*. 89: 3542-3545.
- Gundel P., Omacini M., Sadras V., Ghersa C.M. 2010. The interplay between the effectiveness of the grass-endophyte mutualism and the genetic variability of the host plant. *Evolutionary App*. 3: 538-546.

- Guo B., Hendrix J., An Z., Ferriss R. 1992. Role of *Acremonium* endophyte of *Fescue* on inhibition of colonization and reproduction of mycorrhizal fungi. *Mycologia*. 84: 882-885.
- Hartley S., Gange A.C. 2009. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Ann Rev Entomol*. 54: 323-342.
- Iannone L., Cabral D., Rossi M. 2009. Phylogenetic divergence, morphological and physiological differences distinguish a new *Neotyphodium* endophyte species in the grass *Bromus auleticus* from South America. *Mycologia*. 101: 340-351.
- Iannone L., White Jr J., Giussani L., Cabral D., Novas M.V. 2011. Diversity and distribution of *Neotyphodium*-infected grasses in Argentina. *Mycol Progr* 10:9-19.
- Lemons A., Clay K., Rudgers J.A. 2005. Connecting plant-microbial interactions above and belowground: a fungal endophyte affects decomposition. *Oecologia*. 145: 595-604.
- Leuchtmann A. 1992. Systematics, Distribution, and Host Specificity of Grass Endophytes. *Natural Toxins*. 1: 150-162.
- Mack K., Rudgers J. 2008. Balancing multiple mutualists: asymmetric interactions among plants, arbuscular mycorrhizal fungi and fungal endophytes. *Oikos*. 117: 310-320.
- Malinowski D., Alloush G., Belesky D. 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. *Plant Soil*. 227: 115-126.
- Malinowski D.A., Alloush G.A., Belesky D.P. 1998. Evidence for chemical changes on the root surface of tall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*. *Plant Soil*. 205: 1-12.
- Malinowski D.A., Belesky D.P. 1999. Endophyte infection enhances the ability of tall fescue to utilize sparingly available phosphorus. *J. Plant Nutr*. 22: 835-853.
- Matthews J.W., Clay K. 2001. Influence of fungal endophyte infection on plant/soil feedback and community interactions. *Ecology*. 82: 500-509.
- McNaughton, S.J. 1983. Compensatory growth as a response to herbivory. *Oikos*. 40:329-336.
- Moon C.D., Scott B., Schardl C.L., Christensen M.J. 2000. Evolutionary origins of *Epichloë* endophytes from annual ryegrasses. *Mycologia*. 92: 1103-1118.
- Müller J. 2003. Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonization of *Lolium perenne*. *Funct Plant Biol*. 30: 419-424.
- Novas M.V., Iannone L., Godeas A., Cabral D. 2009. Positive association between mycorrhiza and foliar endophytes in *Poa bonariensis*, a native grass. *Mycol Prog*. 8: 75-81.

- Omacini M., Chaneton E., Bush L., Ghersa C.M. 2009. A fungal endosymbiont affects host plant reruitment through seed- and litter-mediated mechanisms. *Funct Ecol.* 23: 1148-1156.
- Omacini M., Chaneton E., Ghersa C.M., Otero P. 2004. Do foliar endophytes affect grass litter decomposition? A microcosm approach using *Lolium multiflorum*. *Oikos.* 104: 581-590.
- Omacini M., Chaneton E.J., Ghersa C.M. 2005. A framework for understanding the ecosystem consequences of endophyte grass symbioses. In: Roberts B C., West C.P., Spiers D. (eds.) *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses Current Research & Applications. Blackwell publishing. pp. 141-161.
- Omacini M., Chaneton E.J., Ghersa C.M., Muller C.B. 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature.* 409: 78-81.
- Panaccione D., Johnson R., Wang J., Young C., Damrongkool P., Scott B., Schardl C. 2001. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98: 12820-12825.
- Parodi L. 1950. Las Gramíneas tóxicas para el ganado en la República Argentina. *Rev Arg Agr.* 17:163-227.
- Pedersen J., Rodriguez-kabana R., Shelby R. 1988. Ryegrass cultivars and endophyte in tall fescue affect nematodes in grass and succeeding soybean. *Agron J.* 80: 811-814.
- Popay A.I., Bonos S.A. 2005. Biotic responses in endophytic grasses. In: Roberts C., West C.P., Spiers D. (eds.) *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses Current Research & Applications. Blackwell publishing. pp. 163-185.
- Popay A.I., Townsend R.J., Fletcher L. 2003. The effect of endophyte (*Neotyphodium uncinatum*) in meadow fescue on grass grub larvae. *N. Z. Plant Protection.* 56: 123-128.
- Rasmussen S., Parsons A., Poppy A., Xue H., Newman J. 2008. Plant-endophyte-herbivore interactions: more than just alkaloids? *Plant Signaling & Behavior.* 3: 974-977.
- Rodriguez R., White J., Arnold A., Redman R. 2008. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314-330.
- Rolston M., Stewart A.V., Latch C.G.M., Hume D.E. 2002. Endophytes in New Zealand grass seeds: occurrence and implications for conservation of grass species. *New Zealand J Agr Res.* 40: 365-372.
- Rudgers J., Clay K. 2007. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? *Fungal Biol Rev.* 21: 107-124.
- Rudgers J., Orr S. 2009. Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *J Ecol.* 97: 247-255.

- Saikkonen K., Lehtonen P., Helander M., Koricheva J., Faeth S. 2006. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. *Trends Plant Sci.* 11: 428-433.
- Saikkonen K., Wali P., Helander M., Faeth S. 2004. Evolution of endophyte-pant symbioses. *Trends Plant Sci.* 9: 275-280.
- Siegel M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C. 1990. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J Chem Ecol.* 16: 3301-3315.
- Siegrist J., McCulley R., Bush L., Phillips T. 2010. Alkaloids may not be responsible for endophyte-associated reductions in tall fescue decomposition rates. *Funct Ecol.* 24: 460-468.
- Sutherland B.L., Hoglund J.H. 1989. Effect of ryegrass containing the endophyte *Acremonium lolii*, on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proc. NZ Grassl Assoc.* 50: 265-269.
- Sutherland B.L., Hume D.E., Tapper B.A. 1999. Allelopathic effects of endophyte-infected perennial ryegrass extracts on white clover seedlings. *New Zealand J Agr Res.* 42: 19/26.
- Tikhonovich I., Provorov N. 2007. Cooperation of plants and microorganisms: getting closer to the genetic construction of sustainable agr-systems. *Biotechnol.* 2: 833-848.
- Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R. 2002. Mycorrhizal Ecology: synthesis and perspectives. In: Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R.(eds.) *Mycorrhizal ecology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 441-456.
- van der Putten W.H., Bardgett R.D., De Ruiter P.C., Hol W., Meyer K., Bezemer T., Bradford M., Christensen S., Eppinga M., Fukami T., Hemerik L., Molofsky J., Schadler M., Scherber C., Strauss S.Y., Vos M., Wardle D.A. 2009. Empirical and theoretical challenges in aboveground-belowground ecology. *Oecologia.* 161: 1-14.
- van Hecke M., Treonis A., Kaufman J. 2005. How does the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* affect tall fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms? *Plant Soil.* 275: 101-109.
- Vicari M., Hatcher P., Ayres A. 2002. Combined effect of foliar and mycorrhizal endophytes on an insect herbivore. *Ecology.* 83:2452-2464.
- Vila Aiub M.M., Ghersa C.M., Carceller M. 2003. Effect of herbicide diclofop-methyl on proton extrusion from *Lolium multiflorum* seedlings differing in resistance and in fungal endophyte (*Neotyphodium* sp.) infection. *Phys Planta.* 119: 429-439.
- Wardle D. 2002. *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*. Princeton University Press.

- Wardle D., Bardgett R., Klironomos J., Setälä H., Van der Putten W.H., Ward D. 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*. 304: 1629-1633.
- White J.F., Sullivan R., Balady G., Gianfagna T., Yue Q., Meyer W., Cabral D. 2001. A fungal endophymbiont of the grass *Bromus setifolius*: distribution in some andean populations, identification and examination of beneficial properties. *Symbiosis*. 31: 241-257.
- White J.F. 1987. Widespread distribution of endophytes in the Poaceae. *Plant Dis.* 71: 340-342.
- White J.F., Torres M. 2009. Defensive mutualism in microbial symbiosis. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Wilkinson H.H., Siegel D.I., Blankenship J., Mallory A., Bush J.P., Schardl C.L. 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular plant-microbe interactions*. 13: 1027-1033.

Capítulo 5

***Bacillus thuringiensis* y su utilidad en el control de insectos asociados a la rizosfera**

Bacillus thuringiensis and their utility in the control of insects associated to the rhizosphere

Diego H. Sauka; Rodrigo H. Monella, Graciela B. Benintende

Insumos Bacterianos, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). De los Reseros y Las Cabañas s/nro. C.C. 25. C.P. 1712. Castelar, Buenos Aires, Argentina. E-mail: dsauka@cnia.inta.gov.ar

Introducción

Las raíces de plantas de interés agroalimentario pueden ser vulnerables a la actividad de una gran variedad de plagas de artrópodos, nemátodos y hongos. Estas plagas producen pérdidas sustanciales en los rendimientos, disminución de la longevidad de las plantas y de la calidad de los productos obtenidos. Todas estas plagas demuestran interactuar en la rizosfera y de esta manera generar un incremento en el daño a las raíces. Para poder controlarlas existen medidas que pueden agruparse formando parte de programas de manejo que mejoran la salud de las plantas. En gran medida, el control de plagas depende de la aplicación de productos químicos. Su empleo indiscriminado produce problemas de contaminación ambiental, efectos no deseados sobre especies benéficas y también generando la selección de organismos resistentes. Debido a ello, hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas. Un ejemplo que se erige como una importante alternativa, lo constituye la utilización de bacterias dentro del control microbiano de plagas, debido a su toxicidad selectiva alta e impacto ambiental bajo a nulo. La especie *Bacillus thuringiensis* es particularmente un exponente exitoso y el que mantiene un nivel vigente de desarrollo, que se puede emplear para el control de insectos plaga que afectan específicamente las raíces de plantas.

En este capítulo se integran conocimientos de la biología, la genética y los bioinsecticidas disponibles que contienen a esta bacteria entomopatógena como ingrediente activo dentro de un contexto del control microbiano de insectos que afectan las raíces de cultivos de interés agronómico.

¿Quién es *Bacillus thuringiensis*?

Bacillus thuringiensis es un bacilo gram positivo, anaerobio facultativo,

de flagelación pértrica, que posee la particularidad de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Figura 1) (Sauka, Benintende 2008). No obstante, la característica principal de esta bacteria entomopatógena es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica con toxicidad para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros (Figura 1) (Sauka, Benintende 2008). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, siendo ambos liberados tras la lisis celular.

Las proteínas que forman los cristales, denominadas Cry, son muy diversas e incluyen un conjunto de 68 grupos principales divididos en diferentes clases y subclases juzgadas en base a un análisis de similitud de sus secuencias de aminoácidos e información estructural derivada a partir de cristalografía de rayos X (*B. thuringiensis* toxin nomenclature website en http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (Crickmore et al. 1998). Las diferencias aminoacídicas que presentan se traducen comúnmente en las variaciones a nivel de toxicidad y especificidad (Tounsi et al. 1999). Las proteínas Cry muestran en general espectros de actividad reducida y muchas veces acotados a unas cuantas especies de insectos pertenecientes a un mismo orden. Los genes que codifican estas proteínas (genes *cry*), siguen la clasificación de sus proteínas.



Figura 1: Imagen de *B. thuringiensis* en estado de esporangio obtenida a través de microscopía electrónica de transmisión. C: cristal parasporal; E: espora. Barra, 200 nm.

B. thuringiensis puede llegar a producir la muerte del insecto por un mecanismo no mediado por proteínas Cry. Puede producir factores de virulencia como fosfolipasas C, hemolisinas, enterotoxinas, α y β -exotoxinas, metaloproteasas, quitinasas, proteínas Vip (del inglés «Vegetative insecticidal protein») y proteínas Sip (del inglés «Secreted insecticidal protein») que le permitirían sobrevivir y

multiplicarse dentro del huésped, evadir su sistema inmune y producir septicemia (Fedhila et al. 2004, Donovan et al. 2006). En varios estudios se probó que tanto las quitinasas como las Vips aumentan la eficiencia y potencia de las toxinas Cry en el control de insectos plaga. Por un lado, se sugirió la posible inclusión de algunos de estos factores de virulencia a formulaciones de bioinsecticidas, y por otro, se logró la incorporación de sus genes a cepas de *B. thuringiensis* que no los poseían con el objeto de mejorar su actividad insecticida (Liu et al. 2002, Arora et al. 2003). Las quitinasas son enzimas que tienen la capacidad de degradar quitina, un componente principal de la cutícula y membrana peritrófica de insectos. Esta última se encuentra recubriendo internamente el intestino y funciona como barrera física contra infecciones bacterianas y virales, pero permite el flujo de nutrientes, minerales y agua hacia el epitelio del intestino medio (Patil et al. 2000). Los patógenos que infectan a través del intestino deben penetrar esta barrera rica en quitina, por lo que, la degradación de membrana peritrófica es un blanco a vencer para poder mejorar la accesibilidad de las proteínas Cry a la membrana epitelial (Regev et al. 1996).

Las Vips son proteínas insecticidas no relacionadas estructuralmente con las Cry, que no forman inclusiones cristalinas y que se secretan al medio durante la etapa de crecimiento vegetativo de la bacteria (Estruch et al. 1996). Incluyen una toxina binaria Vip1 y Vip2 con especificidad para coleópteros, y Vip3 con especificidad para lepidópteros (Estruch et al. 1996, Warren 1997 y 1998). Las proteínas Sip fueron recientemente descritas y muy poco se conoce de ellas. Sólo se conoce un miembro de este grupo, la proteína Sip1A (Donovan et al. 2006). Esta posee propiedades insecticidas para coleópteros. Es producida y también secretada por *B. thuringiensis* durante su etapa de crecimiento vegetativo.

El material genético de *B. thuringiensis* consta de un «cromosoma» que está representado por 5,3 millones de bases y de elementos extracromosomales (plásmidos) cuyo tamaño y número es variable entre las distintas cepas de esta especie bacteriana (Schnepf et al. 1998, Han et al. 2006, Challacombe et al. 2007, He et al. 2010). La comparación de genomas de *B. thuringiensis* con los de *Bacillus cereus* demostraron que ambas especies comparten una organización genómica muy similar en la región cercana al origen de replicación, mientras que el resto presenta una mayor variabilidad. Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de tres cepas de *B. thuringiensis* que brindan información nueva de secuencias de nucleótidos que es utilizada para poder entender mejor su genética (Challacombe et al. 2007, Han et al. 2006, He et al. 2010). La gran mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* poseen varios elementos extracromosomales, pudiendo ser circulares y/o lineales (Carlson et al. 1994).

B. thuringiensis también se caracteriza por la presencia de plásmidos que pueden variar en número de 1 a 17 por bacteria (Baum y González 1992), y cuyos tamaños oscilan entre 2 y cientos de kilobases (González y Carlton 1980). Estas cualidades de los plásmidos de *B. thuringiensis* son muy valiosas para la caracterización de cepas, ya que junto al perfil proteico de los cristales, el

contenido de genes *cry* y la identificación serológica, permite hacer una descripción diferenciada de los diversos *B. thuringiensis* (Lopez-Meza e Ibarra 1996, Benintende et al. 1999, Sauka 2007, Sauka et al. 2010). De acuerdo al mecanismo de replicación que utilizan los plásmidos pueden clasificarse en dos grupos que aparentemente no estarían relacionados (Porcar y Caballero, 2001):

- plásmidos menores de 15 kb, sin función conocida que se replicarían mediante un mecanismo de círculo rodante;
- plásmidos de peso molecular elevado, mayores a 45 kb que se replicarían mediante un mecanismo de tipo theta. Los plásmidos de elevado peso molecular de *B. thuringiensis* poseen una estabilidad estructuralmente alta permitiendo que la mayoría de las cepas los mantengan sin perderlos.

La mayoría de los plásmidos de *B. thuringiensis* se han considerado «crípticos», debido a que no se les conoce una función determinada, con la excepción de poseer los genes *cry* responsables de codificar toxinas insecticidas. La primera evidencia que ayuda al establecimiento de una correlación entre síntesis de proteínas del cristal y la presencia de un plásmido, se estableció por experimentos de «curado» de plásmidos, realizada por González y col. (1981). Posteriormente, se probó la transferencia de estos plásmidos y otros entre distintos *B. thuringiensis* utilizando un proceso similar a la conjugación comúnmente conocida en bacterias gram negativas (González et al. 1982). Mediante la reintroducción de los plásmidos apropiados, fue posible restablecer la capacidad de síntesis del cristal en las bacterias a las cuales se les había eliminado esta función mediante el curado. La evidencia directa del rol que juegan estos plásmidos se obtuvo al clonar los primeros genes *cry*, que se utilizaron como sondas para determinar su localización en muchas de las cepas conocidas (Höfte, Whiteley 1989). De estas observaciones se concluye, que los genes *cry* se encuentran localizados en plásmidos de peso molecular elevado y que se replican mediante un mecanismo de tipo theta.

A pesar de dicha generalización, existe un reporte reciente en el que se detectó un gen *cry* en un plásmido de peso molecular bajo que se replica mediante un mecanismo de círculo rodante (Loeza-Lara et al. 2005). También se reportó la existencia de genes *cry* insertados en el cromosoma de *B. thuringiensis* (Klier et al. 1982, Klier, Rapoport 1984, Sanchis et al. 1988). En algunas cepas pertenecientes a los serovares *aizawai*, *thuringiensis*, *dendrolimus*, *entomocidus* y *wuhanensis* se detectó la localizaron de genes *cry* en el DNA cromosómico mediante experimentos de hibridación «Southern blot». Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que dichos genes se encuentren en realidad presentes en un plásmido de peso molecular elevado, el cual, dada su fragilidad, se rompa durante las etapas de extracción y/o análisis. De esta forma, dichos plásmidos co-migrarían con el DNA

cromosomal durante su análisis electroforético, lo cual explicaría su presencia en la banda del DNA cromosomal (Juárez-Pérez 2004).

Otra característica importante de los plásmidos de *B. thuringiensis* es que son conjugativos. Cuando dos *B. thuringiensis* son cultivados juntos pueden intercambiar plásmidos con una frecuencia elevada. Existen varios reportes en relación al estudio de este mecanismo entre cepas de *B. thuringiensis* bajo distintas condiciones en laboratorio. Vilas-Bôas y et al. (1998) evaluaron la frecuencia de conjugación entre una cepa de *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* y una del serovar *kurstaki* en medios de cultivo, en distintos tipos de suelo y en larvas vivas de insectos lepidópteros. Los transconjugantes aparecieron luego de dos horas de incubación en el medio de cultivo y de cuatro horas en el caso de los suelos. Encontraron que la frecuencia más alta de transferencia se dio en las larvas infectadas y la más baja en suelo. Otros estudios, en los que se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, *thuringiensis* e *israelensis*, se comprobó que la conjugación también es posible en medios acuáticos (Furlaneto et al. 2000, Thomas et al. 2001).

Mecanismo de acción general de las proteínas Cry

Desde un punto de vista generalista, se pudo determinar que las proteínas Cry producen el daño celular en el intestino de las larvas de insectos susceptibles siguiendo un proceso de varias etapas (Figura 2). Los cristales de *B. thuringiensis*, y en algunos casos también las esporas, son ingeridos por la larva del insecto como parte de su dieta habitual (en algunos casos puede ser una planta BT – ver más adelante). Los cristales son posteriormente solubilizados en el intestino medio del insecto liberando las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas son procesadas por proteasas para generar las toxinas activas que se conocen como d-endotoxinas. Así, atraviesan la membrana peritrófica y se unen a receptores específicos de la membrana epitelial, para insertarse en la misma y producir poros que finalmente conducen a un desequilibrio osmótico y a una lisis celular consecuente. El tejido intestinal es dañado severamente durante este proceso, impidiendo la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva, lo que lleva a la muerte del insecto por desnutrición. La muerte puede verse acelerada, ya que la desorganización del epitelio producida por la lisis celular favorece el acceso de las esporas a la hemolinfa donde encuentran un ámbito propicio germinar y para que las células vegetativas de la bacteria proliferen (Vachon et al. 2004).

Broderick y et al. (2006 y 2009) sugirieron que la mortalidad sería sólo inducida por *B. thuringiensis* y que dependería esencialmente de bacterias que forman parte de la microbiota del intestino medio del insecto huésped como responsables reales. No obstante, esta posibilidad fue descartada recientemente por otro grupo de investigación que confirma que la presencia de *B. thuringiensis* es suficiente para producir la muerte de la larva y que lo puede lograr en ausencia de su microbiota intestinal (van Frankenhuyzen et al. 2010).

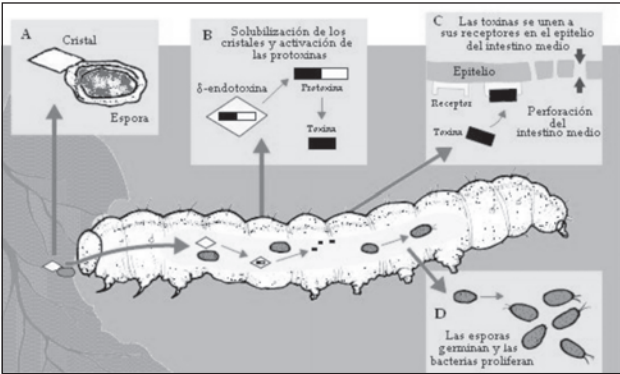


Figura 2: Esquema del mecanismo de acción general de las proteínas Cry (Tomado de Sauka 2007).

¿Cuáles son las formas en que se puede presentar *B. thuringiensis* para ser utilizado en control de plagas?

B. thuringiensis se puede presentar bajo una serie de formas conocidas como bioinsecticidas de primera, segunda y tercera generación (Tabla 1), así como de las llamadas plantas transgénicas BT que se emplean en el control de plagas insectiles.

Tabla 1.
Características principales de los bioinsecticidas que poseen *B. thuringiensis* como ingrediente activo.

Bioinsecticidas	Características principales de las formulaciones
Primera generación	► Mezcla de cristales y esporas de <i>B. thuringiensis</i> como ingrediente activo.- Especificidad restringida a ciertos órdenes de insectos, potencia relativamente baja y toxicidad residual corta.- Constituyen la mayor proporción de los productos comerciales disponibles mundialmente.
Segunda generación	► Mezcla de cristales y esporas de <i>B. thuringiensis</i> a la cual se le introdujo genes que codifican d-endotoxinas presentes en otros <i>B. thuringiensis</i> - Espectro de actividad ampliado o toxicidad incrementada mediante un efecto sinérgico o aditivo.
Tercera generación	► Contiene bacterias recombinantes que fueron modificadas genéticamente con genes <i>cry</i> de <i>B.huringiensis</i> , o esta misma bacteria modificada con otros genes que codifiquen para otros factores de virulencia distintos a las d-endotoxinas.- Toxicidad residual aumentada o espectro de actividad ampliado.

Un número elevado de formulaciones a base de *B. thuringiensis* se encuentran registradas en todo el mundo. En nuestro país, algunas empresas privadas locales registraron productos de origen nacional destinados al control de orugas defoliadoras y también mosquitos, los que se suman a productos de importación (Sauka, Benintende 2008). También se encuentran registradas un gran número de plantas transgénicas BT, plantas que expresan genes *cry*, restringiéndose para su comercialización en nuestro país sólo plantas de maíz y algodón (CERA 2011). En comparación con los bioinsecticidas dispersables que poseen cristales y esporas de *B. thuringiensis* como ingrediente activo, este tipo de plantas transgénicas tienen la ventaja de que brindan una mayor y más efectiva protección a lo largo de toda la estación de su crecimiento.

Control microbiano de insectos plaga asociados a la rizosfera empleando *B. thuringiensis*

Las estrategias de Manejo Integrado de Plagas (MIP) tienen base en principios ecológicos, teniendo en consideración todo el ecosistema y no solo a una especie afectada (Lecuona 1996). Así, distintas tácticas de control se amalgaman para conseguir la reducción poblacional esperada de la plaga, como para impedir el avance a regiones no deseadas. Dentro de ellas, el control microbiano (rama del control biológico), estudia el uso de organismos microscópicos (bacterias, hongos, virus, protozoarios y nematodos) en el control de plagas para reducir sus poblaciones y los efectos dañinos que ellos causan (Lecuona 1996). En particular, el control microbiano de plagas insectiles que atacan el sistema radicular de plantas que poseen valor económico con *B.thuringiensis* o plantas transgénicas productoras de sus toxinas es de gran interés, ya que se disminuye la aplicación de pesticidas que pueden causar importantes daños y contaminación medioambiental. Por otro lado, a pesar de este gran interés existente en el control de plagas asociadas a la rizosfera, su aplicación exitosa se restringe, como se verá a continuación, a un número limitado y determinado de especies del orden Coleoptera. Lamentablemente no se dispone hasta ahora de ningún bioinsecticida comercial de primera generación que se haya registrado para el control de este tipo de plagas, si bien se dispone en el presente de cepas ampliamente promisorias (Tabla 2).

Tabla 2.
Susceptibilidad de plagas *rizófagas* a *B.thuringiensis*.

<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar/cepa	Familia	Género y especie	Planta afectada	L/C ^a	Referencias
Bt185	Scarabaeidae	<i>Holotrichia parallela</i>	Césped	L	Yu et al. 2006

PS80JJ1, PS149B1 y PS167H2	Chrysomelidae	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Maíz	L	Ellis et al. 2002
galleriae	Scarabaeidae	<i>Popillia japonica</i>	Césped	L	Sharpe 1976
<i>japonensis</i> Buibui	Scarabaeidae	<i>Anomala albopilosa</i>	Césped	L	Susuki et al. 1992
		<i>Anomala cuprea</i>	Césped, caña de azúcar	L	Ohba et al. 1992, Susuki et al. 1992 y 1993
		<i>Anomala daimiana</i>	Césped	L	Susuki et al. 1992
		<i>Anomala orientalis</i>	Césped, ananá, maíz, caña de azúcar	C	Koppenhofer et al. 1999, Mashtoly et al. 2009
		<i>Anomala rufocuprea</i>	Césped	L	Ohba et al. 1992, Susuki et al. 1992, Hori et al. 1994
		<i>Anomala schonfeldti</i>	Césped	L	Susuki et al. 1992
		<i>Cydocephala borealis</i>	Césped	L	Mashtoly et al. 2009
		<i>Cydocephala hirta</i>	Césped	L/C	Koppenhofer et al. 1997, Koppenhofer et al. 1999
		<i>Cydocephala pasadenae</i>	Césped	L/C	Koppenhofer et al. 1997, Koppenhofer et al. 1999
		<i>Exomala orientalis</i>	Césped	L/C	Ohba et al. 1992, Alm et al. 1997
kumamotoensis	Chrysomelidae	<i>Popillia japonica</i>	Césped	C	Alm et al. 1997
		<i>Diabrotica undecim punctata howardi</i>	Maíz	L	Johnson et al. 1993

^a Ensayo realizado en Laboratorio (L) y/o a Campo (C).

B. thuringiensis se la puede encontrar comúnmente en muestras de suelo, si bien su rol en el mismo no se comprende en su totalidad. La mayoría de los estudios disponibles describen la presencia y/o persistencia de sus esporas en el mismo alejado de las raíces (Petras, Casida 1985), pero poco se conoce sobre la persistencia de sus células vegetativas en la rizosfera de plantas. Lo que sí se sabe es que *B. thuringiensis* no es una rizobacteria verdadera como lo constituye *Rhizobium*, que en general crece al colonizar las raíces de las plantas con las que se asocian, y que no preferirían la rizosfera para su desarrollo. No obstante, con la disponibilidad de esta escasa información y sabiendo que existen especies bacterianas que en la rizosfera de plantas hallan un ambiente apropiado para su crecimiento y supervivencia protegiéndose de diversos factores bióticos y abióticos, se optó por la introducción de genes *cry* de *B. thuringiensis* en *Rhizobium* mediante ingeniería genética. El objetivo fue transformar a *Rhizobium* para que junto a la nodulación, también se exprese las proteínas insecticidas en nódulos y en la raíz. Esta estrategia brindó resultados prometedores en el control de plagas que afectan la raíz (Nambiar et al 1990, Skot et al 1990, Bezdicke et al 1991).

El caso del control de los gusanos que afectan las raíces del maíz

El maíz posee a nivel mundial una importancia relevante en aspectos que conciernen tanto a lo económico como a lo social, y es afectado por diversas plagas (enfermedades, malezas, artrópodos). De ellas, unas diez especies o subespecies del género *Diabrotica* (Coleoptera) son reconocidas como plagas (Krysan, Miller 1986). Las larvas de estos insectos tienen en común que presentan hábito subterráneo y se alimentan de las raíces del maíz (Krysan, Miller 1986, Saini 2005). Aunque no inciden directamente en los rendimientos en sí, causan un impedimento en el crecimiento de la planta (PRMIP 1990).

Diabrotica virgifera, *D. barberi* y *D. undecimpunctata howardi* son plagas principales en Norteamérica que afectan la raíz del maíz (Krysan, Miller 1986). *D. virgifera* no se había detectado nunca en Europa hasta que fue observada cerca de Belgrado en 1992, para luego dispersarse por el continente y generar gran preocupación entre los productores. Por otro lado, *D. speciosa* es la «prima» Sudamericana de las anteriores. Comúnmente se la conoce en nuestro país como «vaquita de San Antonio». Se distribuye a lo largo de toda el área maicera de Argentina, llegando a lograr por año hasta tres generaciones en el norte (Defagó de Pecchioni et al. 2000, OEPP/EPPO 2005).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estima que los daños causados por especies de *Diabrotica* de esa área, generan pérdidas de 1 billón de dólares anuales a la renta pública, los cuales incluyen 800 millones en pérdidas por menor rendimiento y 200 millones en tratamiento por parte de los agricultores (<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>). Si bien en nuestro país no disponemos de este tipo de estimaciones por ahora,

es factible creer que los perjuicios económicos que producen, son en proporción al menos similares a los mencionados, teniendo en cuenta que nuestra «vaquita» causa daños más severos que las especies norteamericanas.

Existen dos tipos de manejos principales que se emplean para el control de estos coleópteros: la rotación de cultivos, en particular con soja o alfalfa, y principalmente la aplicación de insecticidas químicos con todos los riesgos ambientales que ello acarrea (Arruda et al. 2005). Entre ellos se destaca la disminución de organismos benéficos que contribuyen al mantenimiento de las plagas en niveles lo suficientemente bajos como para que no causen daño. Esto originaría que al desembolso requerido para el control de estas especies, se le debería agregar los costos de control adicional de otras plagas desprovistas de sus enemigos naturales.

Por lo hasta aquí argumentado, y teniendo en cuenta los hábitos alimenticios de las larvas de *Diabrotica*, la mejor opción alternativa es la implementación de una estrategia que involucre la utilización de plantas transgénicas productoras de toxinas de *B. thuringiensis* a nivel de la raíz para el control del daño producido por larvas de esta plaga. El primer paso para lograr el desarrollo de una de estas plantas transgénicas BT fue el descubrimiento de proteínas de *B. thuringiensis* con niveles efectivos de toxicidad para los gusanos de la raíz del maíz. Estas incluyen las proteínas cristalinas Cry3 y Cry6Aa1, y las solubles que constituyen la proteína binaria Vip1/Vip2 (Gaertner et al. 1990, Donovan et al. 1991 y 1992, Carozzi et al. 1993, Narva et al. 1993, Thompson et al. 1999). También se reportaron derivados de Cry3Bb1 modificados genéticamente que poseen una toxicidad mejorada para larvas de *Diabrotica* (English et al. 2000). Las últimas en ser descritas fueron las proteínas binaria Cry34/Cry35 (Baum et al. 2004) y Sip1A (Donovan et al. 2006).

Algunos genes que codifican estas proteínas fueron introducidos para su expresión en híbridos de maíz comerciales. La compañía Monsanto a través del uso de técnicas de DNA recombinante, desarrolló plantas de maíz que son protegidas del daño debido a gusanos del orden Coleoptera que afectan su raíz. Esta planta fue registrada en los Estados Unidos en 2003 (United States Environmental Protection Agency Fact Sheet, 2005a). Los tejidos de estas plantas expresan la proteína Cry3Bb1 obtenida originalmente de *B. thuringiensis* serovar *kumamotoensis* que es toxica selectivamente para larvas de este tipo de gusanos. El nombre comercial de este producto es el *YieldGard® Rootworm corn*, planta transgénica BT que brinda a los que la cultivan una serie de beneficios principales que se pueden resumir a continuación:

- Efectividad: probó ser una alternativa efectiva al tratamiento con ciertos pesticidas tradicionales. Provee un control más consistente debido a que no se ven comprometidas por factores climáticos que afectan a los insecticidas aplicados.

- Reducción en la exposición a insecticidas: con la protección frente al daño transportado en las semillas los agricultores no necesitan manipularlas como si estuvieran tratadas con insecticidas convencionales.
- Simplicidad: los agricultores no deben gastar tiempo en aplicación de insecticidas, pudiendo disponerlos para un sembrado más dedicado.

La seguridad ambiental de esta planta de maíz BT se estableció mediante el ensayo en laboratorio y a campo de sus tejidos vegetales o de la proteína Cry3Bb1 frente a una amplia variedad de especies que no se espera que sean blancos de acción (Grant et al. 2003, Taylor et al. 2003, Hyun et al. 2005, Scheideler et al. 2008). No se observaron efectos adversos frente a esas especies, aún empleando las concentraciones de Cry3Bb1 máximas esperadas en el ambiente. Además, otros estudios demostraron que esta proteína se degrada rápidamente en diversos tipos de suelos (Icoz et al. 2008). Otras observaciones obtenidas de estudios agronómicos realizados a lo largo de toda la región maicera de los Estados Unidos confirman que estas plantas son fenotípicamente equivalentes al maíz convencional (George et al. 2004), con la obvia excepción de su capacidad insecticida, por lo que son seguras e igual de nutritivas para su consumo.

Herculex® RW Rootworm Protection es otra planta de maíz transgénico BT que fue desarrollado en colaboración entre Dow AgroSciences y Pioneer Hi-Bred International, y registrado en los Estados Unidos en 2005 (United States Environmental Protection Agency Fact Sheet, 2005b). Los tejidos de estas plantas expresan una proteína binaria (Cry34Ab1 y Cry35Ab1) obtenida de la cepa PS149B1 de *B. thuringiensis* que es tóxica selectivamente para larvas de este tipo de gusanos. Esta planta de maíz brinda a los agricultores que la cultivan los mismos beneficios principales que se describieron para el *YieldGard® Rootworm corn*.

El último maíz BT desarrollado específicamente para el control de gusanos de las raíces fue el *Agrisure® RW* por Syngenta Seeds Inc. Este producto fue registrado en 2006, también en los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency Fact Sheet, 2006). Estas plantas expresan una proteína Cry3A modificada que originalmente posee un nivel reducido de toxicidad para *Diabrotica* spp. El gen *cry3A* de *B. thuringiensis* serovar *tenebrionis*, primer *B. thuringiensis* descubierto con toxicidad para coleópteros, específicamente para el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), se recreó sintéticamente para optimizar su expresión en maíz y mejorar su actividad tóxica para larvas de *D. virgifera virgifera* y *D. barberi*.

Hasta la fecha ninguna variedad transgénica de maíz BT destinada al control de gusanos de la raíz está disponible en Argentina para su cultivo. Nuestro grupo de trabajo está trabajando actualmente en el marco de dos proyectos financiados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y la Agencia Nacional de

Promoción Científica y Tecnológica, que tienen como base el posible desarrollo de tácticas de control menos contaminantes que puedan ser empleadas específicamente en estrategias de manejo integrado de *D. speciosa* para reducir los daños y/o pérdidas que esta plaga ocasiona. Esos proyectos están generando bases científicas y tecnológicas destinadas al desarrollo de futuros insumos para el control de este coleóptero en nuestra región. Se está llevando a cabo la selección de *B. thuringiensis* con alta toxicidad para *D. speciosa* que puedan ser utilizadas en el desarrollo de bioinsecticidas bacterianos destinados para su integración en sistemas de producción vegetal sustentable. Además, se proyecta disponer de genes que codifiquen reconocida capacidad insecticida que puedan ser empleados para la futura transformación de organismos (planta, bacteria, etc.) que expresen algunas de estas características.

Consideraciones finales

Se apuesta por un esfuerzo mayor en la investigación y desarrollo de herramientas de uso agrícola para el control de insectos plaga asociados a la rizosfera, con el fin de obtener formulaciones que incluyan *B. thuringiensis* como agentes de control microbiano y/o plantas transgénicas que rechacen los embates de este tipo de plagas que son tan difíciles de controlar debido a los hábitos subterráneos de las larvas. Todo esto es necesario para la reducción de la contaminación debida a una carga excesiva de pesticidas químicos que se vierten al ambiente, objetivo éste de gran trascendencia mundial. Parte de estos objetivos se cumplieron en ciertos países, en los que están disponibles plantas modificadas genéticamente que expresan proteínas Cry específicas para el control de diversas especies de *Diabrotica*.

Un desafío sería llegar a lograr el desarrollo de un bioinsecticida exitoso para controlar larvas que se alimentan de raíces de plantas de interés económico, que se pueda dispersar en el suelo y que posea a *B. thuringiensis* como ingrediente activo. Esto es algo, que a pesar de disponer de cepas con toxicidad para este tipo de insectos, no se ha logrado hasta hoy.

Bibliografía

- Ahmad A., Wilde G., Whitworth R., Zolnerowich G. 2006. Effect of corn hybrids expressing the coleopteran-specific Cry3Bb1 protein for corn rootworm control on aboveground insect predators. *J Econ Entomol.* 99: 1085-95.
- Alm S., Villani M., Yeh T., Shutter R. 1997. *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui for control of Japanese and oriental beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Entomol Zool.* 32: 477-84.
- Arora N., Selvapandiyar A., Agrawal N., Bhatnagar R. 2003. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 310: 158-62.

- Arruda I., Ventura M., Scarminio I. 2005. Feeding and arrestment responses of *Diabrotica speciosa* to cucurbitacin-content formulations. *Pesq agropec bras.* 40: 639-43.
- Baum J., González J. 1992. Mode of replication, size and distribution of naturally occurring plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 75: 143-8.
- Baum J., Chu C., Rupar M., Brown G., Donovan W., Huesing J., Ilagan O., Malvar T., Pleau M., Walters M., Vaughn T. 2004. Binary toxins from *Bacillus thuringiensis* active against the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4889-98.
- Benintende G., López-Meza J., Cozzi J., Ibarra J. 1999. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol.* 29: 151-5.
- Bezdicsek D., Quinn M., Khan M. 1991. Genetically engineering *Bacillus thuringiensis* genes into Rhizobia to control nodule feeding insects. USDA CRIS Report No. 9131200.
- Broderick N., Raffa K., Handelsman J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 15196-9.
- Broderick N., Robinson C., McMahon M., Holt J., Handelsman J., Raffa K. 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biol.* 7: 11.
- Carlson C., Caugant D., Kolsto A. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1719-25.
- Carrozzi N., Kramer V., Warren G., Koziel M. 1993. *Bacillus thuringiensis* strains against coleopteran insects. U.S. patent 5,204,100.
- CERA (Center for Environmental Risk Assessment). GM Crop Database. 2011; http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database.
- Challacombe J., Altherr M., Xie G., Bhotika S., Brown N., Bruce D., Campbell C., Campbell M., Chen J., Chertkov O., Cleland C., Dimitrijevic M., Doggett N., Fawcett J., Glavina T., Goodwin L., Green L., Han C., Hill K., Hitchcock P., Jackson P., Keim P., Kewalramani A., Longmire J., Lucas S., Malfatti S., Martinez D., McMurphy K., Meincke L., Misra M., Moseman B., Mundt M., Munk A., Okinaka R., Parson-Quintana B., Reilly J., Richardson P., Robinson D., Saunders E., Tapia R., Tesmer J., Thayer N., Thompson L., Tice H., Ticknor L., Wills P., Gilna P., Brettin T. 2007. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *J Bacteriol.* 189: 3680-1.
- Crickmore N., Zeigler D., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 807-813.

- Defagó de Pecchioni M., Cabrera N., Laguzzi S., Novara C. 2000. Morphological and population aspects of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions. *An Soc Entomol Bras.* 29: 285-94.
- Donovan W., Gonzalez Jr J., Levinson B., Macaluso A. 1991. Coleopteran active microorganisms, related insecticide compositions and methods for their production and use. U.S. patent 5,024,837.
- Donovan W., Rupa M., Slaney A., Malvar T., Gawron-Burke M., Johnson T. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3921-7.
- Donovan W., Engleman J., Donovan J., Baum J., Bunkers G., Chi D., Clinton W., English L., Heck G., Ilagan O., Krasomil-Osterfeld K., Pitkin J., Roberts J., Walters M. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 713-9.
- Ellis R., Stockhoff B., Stamp L., Schnepf H., Schwab G., Knuth M., Russell J., Cardineau G., Narva K. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl Environ Microbiol.* 68: 1137-45.
- English L., Brussock S., Malvar T., Bryson J., Kulesza C., Walters F., Slatin S., Von Tersch M., Romano C. 2000. Insect-resistant transgenic plants. U.S. patent 6,023,013.
- Estruch J., Warren G., Mullins M., Nye G., Craig J., Koziel M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 5389-94.
- Fedhila S., Guillemet E., Nel P., Lereclus D. 2004. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by *in vivo* screening of virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4784-91.
- Furlaneto L., Saridakis H., Arantes O. 2000. Survival and conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* strains in aquatic environment. *Braz J Microbiol.* 31: 233-38.
- Gaertner F., Soares G., Payne J. 1990. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate. U.S. patent 4,910,016.
- George C., Ridley W., Obert J., Nemeth M., Breeze M., Astwood J. 2004. Composition of grain and forage from corn rootworm-protected corn event MON 863 is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem.* 52: 4149-58.
- González J., Carlton B. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 3: 92-8.

- González J., Dulmage H., Carlton B. 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid. 5: 352-65.
- González J., Brown B., Carlton B. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 79: 6951-5.
- Grant R., Fanning K., Kleinschmit D., Stanisiewski E., Hartnell G. 2003. Influence of glyphosate-tolerant (event NK603) and corn rootworm protected (event MON 863) corn silage and grain on feed consumption and milk production in Holstein cattle. Am Dairy Sci. 86: 1707-15.
- Han C., Xie G., Challacombe J., Altherr M., Bhotika S., Brown N., Bruce D., Campbell C., Campbell M., Chen J., Chertkov O., Cleland C., Dimitrijevic M., Doggett N., Fawcett J., Glavina T., Goodwin L., Green L., Hill K., Hitchcock P., Jackson P., Keim P., Kewalramani A., Longmire J., Lucas S., Malfatti S., McMurphy K., Meincke L., Misra M., Moseman B., Mundt M., Munk A., Okinaka R., Parson-Quintana B., Reilly L., Richardson P., Robinson D., Rubin E., Saunders E., Tapia R., Tesmer J., Thayer N., Thompson J., Tice H., Ticknor L., Wills P., Brettin T., Gilna P. 2006. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 188: 3382-90.
- He J., Shao X., Zheng H., Li M., Wang J., Zhang Q., Li L., Liu Z., Sun M., Wang S., Yu Z. 2010. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. J Bacteriol. 192: 4074-5.
- Höfte H., Whiteley H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Ver. 53: 242-55.
- Hori H., Suzuki N., Ogiwara K., Himejima M., Indrasith L., Minami M., Asano S., Sato R., Ohba M., Iwahana H. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. J Appl Bacteriol. 76: 307-13.
- Hyun Y., Bressner G., Fischer R., Miller P., Ellis M., Peterson B., Stanisiewski E., Hartnell G. 2005. Performance of growing-finishing pigs fed diets containing YieldGard Rootworm corn (MON 863), a nontransgenic genetically similar corn, or conventional corn hybrids. J Anim Sci. 83: 1581-90.
- Icoz I., Stotzy G. 2008. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. Transgenic Res. 17: 609-20.
- Johnson T., Slaney A., Donovan W., Rupa M. 1993. Insecticidal activity of EG4961, a novel strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae and adults of southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J Econ Entomol. 86:330-3.

- Juárez-Pérez V. 2004. Genética y biología molecular de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A., Cerón J.(ed.). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. 17-38.
- Klier A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G. 1982. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715. *EMBO J.* 1: 791-9.
- Klier A., Rapoport G. 1984. Cloning and heterospecific expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis*. En: Alout J, F Fehrenbach, J Free, J Jalljaszenice. (ed.). *Bacterial protein toxins*. 65-72.
- Koppenhofer A., Kaya H. 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biol Control.* 8: 131-7.
- Koppenhofer A., Choo H., Kaya H., Lee D., Gelernter W. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biol Control.* 14: 37-44.
- Krysan J., Miller T. 1986. *Methods for the study of pest Diabrotica*. Springer Verlag, New York (US).
- Lecuona R. 1996. Control Microbiano, utopía o realidad. En: Lecuona R (ed.). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. 13-5.
- Liu M., Cai Q., Liu H., Zhang B., Yan J., Yuan Z. 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol.* 93: 374-9.
- Loeza-Lara P., Benintende G., Cozzi J., Ochoa-Zarzosa A., Baizabal-Aguirre V., Valdez-Alarcón J., López-Meza J. 2005. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid.* 54: 229-40.
- Lopez-Meza J., Ibarra J. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 1306-10.
- Mashtoly T., El-Zemaity Mel-S., Hussien M., Alm S. 2009. LC and LD50 values of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui toxin to Oriental beetle and northern masked chafer larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J Econ Entomol.* 102: 1891-5.
- Nambiar P., Ma S., Iyer V. 1990. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. *Appl Environ Microbiol.* 56: 2866-9.
- Narva K., Schwab G., Bradfish G. 1993. Novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding coleopteran-active toxin. U.S. patent 5,186,934.

- OEPP/EPPO. 2005. Data sheets on quarantine pests - *Diabrotica speciosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 35: 374-6.
- Ohba M., Iwahana H., Asano S., Suzuki N., Sato R., Hori H. 1992. A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles. Lett Appl Microbiol. 14: 54-7.
- Patil R., Ghornmade V., Deshpande M. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enzyme and Microbial Technology. 26: 473-83.
- Petras S., Casida L. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* Spores in Soil. Appl Environ Microbiol. 50: 1496-501.
- Porcar M., Caballero P. 2001. Diversidad genética de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero P, J Ferré (ed.). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. 45-70.
- Proyecto Regional Manejo Integrado de Plagas. Turrialba, Costa Rica (PRMIP). 1990. En: Guía para el manejo integrado de plagas del maíz. Editorial CATIE, Turrialba, Costa Rica. 42.
- Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J., Zilberstein A. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Appl Environ Microbiol. 62: 3581-6.
- Saini E. 2005. Insectos perjudiciales al cultivo de maíz y sus enemigos naturales. Editorial INTA. 10.
- Sanchis V., Lereclus D., Menou G., Chaufaux J., Lecadet M. 1988. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. Mol Microbiol. 2: 393-404.
- Sauka D. 2007. Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis Doctoral. UBA. Director: Benintende G.
- Sauka D., Benintende G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. Rev Argent Microbiol. 40: 124-40.
- Sauka D., Basurto-Ríos R., Ibarra J., Benintende G. 2010. Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. Neotrop Entomol. 39: 767-73.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D., Dean D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 62: 775-806.

- Schnepf H.E., Lee S., Dojillo J., Burmeister P., Fencil K., Morera L., Nygaard L., Narva K.E., Wolt J.D. Characterization of Cry34/Cry35 binary insecticidal proteins from diverse *Bacillus thuringiensis* strain collections. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Apr; 71(4):1765-74.
- Scheideler S., Hileman R., Weber T., Robeson L., Hartnell G. 2008. The *in vivo* digestive fate of the Cry3Bb1 protein in laying hens fed diets containing MON 863 corn. *Poult Sci.* 87: 1089-97.
- Sharpe E. 1976. Toxicity of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* to Japanese beetle larvae. *J Invert Pathol.* 27: 421-2.
- Skot L., Harrison S., Nath A., Mytton L., Clifford B. 1990. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the d-endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Plant Soil.* 127: 285-95.
- Suzuki N., Hori H., Ogiwara K., Asano S., Sato R., Ohba M., Iwahana H. 1992. Insecticide spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis*. *Biol Control* 2: 138-42.
- Suzuki N., Hori H., Asano S. 1993. Sensitivity of cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in different larval stages to *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui. *Appl Entomol Zool.* 28: 403-5.
- Taylor M., Hyun Y., Hartnell G., Riordan S., Nemeth M., Karunanandaa K., George B., Astwood J. 2003. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from YieldGard Rootworm (MON863), YieldGard Plus (MON810 x MON863), nontransgenic control, or commercial reference corn hybrids. *Poult Sci.* 82: 1948-56.
- Thomas D., Morgan J., Whipps J., Saunders J. 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl Environ Microbiol.* 67: 330-8.
- Thompson M., Knuth M., Cardineau G. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxins with improved activity. U.S. patent 5,874,288.
- Tounsi S, A J'Mal, N Zouari, S Jaoua. 1999. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry1Aa*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biotechnol Lett.* 21: 771-5.
- United States Environmental Protection Agency Fact Sheet. 2005a. *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (vector ZMIR13L) in event MON863 corn (006484) Fact Sheet. http://www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006484.htm
- United States Environmental Protection Agency Fact Sheet. 2005b. *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1 and Cry35Ab1 proteins and the genetic material necessary for their production (plasmid insert PHP 17662) in Event DAS-59122-7 corn Fact Sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006490.htm

- United States Environmental Protection Agency Fact Sheet. 2006. mCry3A fact sheet. http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/factsheets/factsheet_mcry3a.htm
- Vachon V., Prefontaine G., Rang C., Coux F., Juteau M., Schwartz J., Brousseau R., Frutos R., Laprade R., Masson L. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl Environ Microbiol.* 70: 6123-30.
- van Frankenhuyzen K., Liu Y., Tonon A. 2010. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. *J Invertebr Pathol.* 103: 124-31.
- Vilas-Bôas G., Vilas-Bôas L., Lereclus D., Arantes O. 1998. *Bacillus thuringiensis* conjugation in environmental conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 25: 369–74.
- Warren G. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. En: Carozzi N, M Koziel (Ed.). *Advances in insect control, the role of transgenic plants.* Taylor & Francis Ltd, London. 109-21.
- Warren G., Koziel M., Mullins M. 1998. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. Novartis, US patent 5770696.
- Yu H., Zhang J., Huang D., Gao J., Song F. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Curr Microbiol.* 53: 13-7.

Capítulo 6

Nematodos como indicadores de la calidad del suelo: Efectos de la fertilización nitrogenada

Nematodes as indicators of soil quality: Effects of nitrogen fertilization

Claudia Viviana Azpilicueta¹, María Cristina Aruani²

¹Laboratorio de Servicios Agrarios y Forestales. Ministerio de Desarrollo Territorial. Santiago del Estero 426. (8300) Neuquén. ²Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Comahue. Cinco Saltos. Río Negro.

E-mail: lasaf_suelos@neuquen.gov.ar

Introducción

Nematodos como componentes del sistema suelo

El suelo es un sistema integrado por organismos en estrecha relación e interacción con el medio físico - químico que sirve de soporte y medio de vida y es un componente crítico en la estructura y función de los agrosistemas. Los organismos del suelo aportan una serie de servicios fundamentales para el sustento de todos los ecosistemas ya que son los principales agentes del reciclado de nutrientes, regulan la dinámica de la materia orgánica del suelo y la retención de carbono, modifican la estructura y el contenido de agua del suelo, mejoran la cantidad y eficacia de captación de nutrientes de las plantas (Ferris et al. 2001). Estos servicios no sólo son decisivos para el funcionamiento de los ecosistemas naturales, sino que constituyen un importante recurso para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas

Entre los organismos del suelo podemos citar a los nematodos que son gusanos cilíndricos, aunque en algunos géneros las hembras pierden el aspecto vermiforme y se vuelven globosas. Son animales pequeños, las especies de la familia Tylenchidae miden entre 0,2 y 1 mm de longitud, ocasionalmente mayores de 3 mm, (Luc et al. 1990) y las especies del orden Dorylaimida promedian el mm, pero hay organismos que pueden medir 0,3 - 0,4 mm o tan largos como 12 mm (Jairajpuri, Ahmad 1992). El cuerpo está revestido por una cutícula de naturaleza proteica, flexible que permite los movimientos del animal. Esta cutícula reviste los orificios de la boca, recto, ano, fasmidios, anfidios, vagina y poro excretor. El ciclo biológico de los nematodos del suelo se desarrolla dentro de este o de las plantas, según la modalidad de alimentación. Se diferencian tres estados: huevo, juvenil y adulto (Dropkin, 1989).

Grupos tróficos

La morfología de la cavidad bucal (Fig. 1) y esófago de los nematodos tiene una estrecha relación con el hábito trófico. Yeates et al. (1993) realizaron una revisión bibliográfica donde resumieron información de los hábitos alimenticios de los nematodos, agrupándolos en ocho grupos tróficos, aunque generalmente son reconocidos cinco: fitófagos, bacteriófagos, fungívoros, omnívoros y depredadores (Yeates 1971) que se detallan a continuación.

1. **Fitófagos:** Esta categoría agrupa especies que se alimentan de plantas vasculares. Su alimento consiste en el contenido celular y jugos obtenidos a través de un estomaestilete tylenchoideo o de un odontoestilete dorylaimoideo. Con el estilete atraviesa las paredes celulares de las raíces de las plantas y por contracciones de la zona muscular del esófago absorbe el contenido citoplasmático de las células vegetales. Esta categoría comprende especies del Orden Dorylaimida y Tylenchida. Hay una extensa bibliografía sobre el manejo de este grupo trófico en sistemas agrícolas sustentables y de subsistencia (Bridge 1996) y de distintas estrategias de manejo en agricultura intensiva (Barker, Koenning 1998). Algunos géneros están relacionados con pérdidas económicas de los cultivos, como *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Xiphinema*, entre los más importantes (Yeates 1998).
2. **Bacteriófagos:** Se alimentan a través de un estoma de diferente tamaño y forma. Estos organismos afectan la descomposición de la materia orgánica de distinta manera ya que se alimentan de microbios y regulan la velocidad de descomposición, dispersan microbios a través del suelo y agua, se alimentan de bacterias saprófitas o fitopatógenas e influyen en la composición de la comunidad microbiana, además sirven como fuente de alimento para la fauna del suelo y afectan la distribución y función de los simbioses de las plantas (Freckman 1988).
3. **Fungívoros:** Se alimentan de hifas al introducir el estomaestilete o un odontoestilete. Incluye también a los nematodos que se alimentan de levaduras o esporas de hongos que son perforadas pero no ingeridas en su totalidad. Comprende especies del orden Aphelenchida, Dorylaimida y Tylenchida.
4. **Carnívoros:** Ejemplares de Monochidae poseen una cavidad bucal fuertemente esclerizada, armada a veces con uno o numerosos dientes, esta familia se alimenta de una variedad de animales del suelo como de nematodos Tylenchida, Dorylaimida, Mononchidos y rotíferos (Bilgrami et al. 1986). Los ejemplares del orden Dorylaimida presentan un estilete para alimentarse.
5. **Omnívoros:** Estos nematodos combinan distintas fuentes de alimentos incluyendo bacterias, algas, hongos, protozoos y rotíferos.

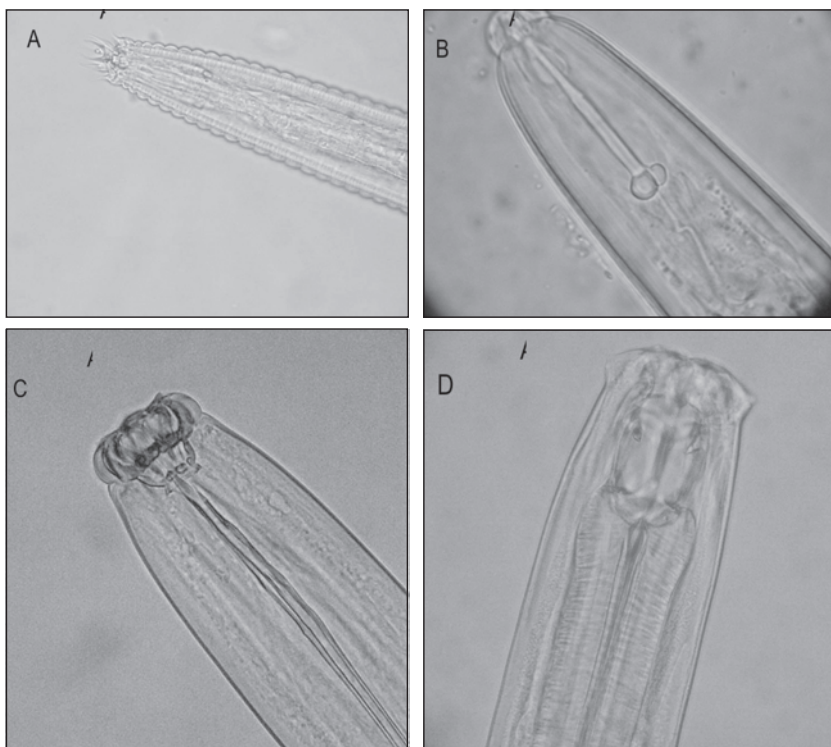


Figura 1: Cavidad bucal de distintos grupos tróficos de nematodos: (A) Bacteriófago, (B) Fitófago, (C) Depredador Dorylaimida, (D) Depredador Mononchidae. (Fotografía Claudia Azpilicueta).

Nematodos como bioindicadores

En los últimos años, se ha demostrado un interés creciente en el estudio de la nematofauna del suelo ya que poseen atributos que los hacen útiles como indicadores ecológicos de la calidad y salud del suelo (Bongers, 1990, Wasilewska, 1997). Los nematodos son frecuentemente los más numerosos de los Metazoa, se encuentran en cualquier ambiente que provea una fuente de carbono, en cualquier tipo de suelo y bajo todas las condiciones climáticas, viven en el agua capilar y están en contacto directo con el microambiente debido a que tienen una cutícula permeable (Bongers, Ferris 1999). Ocupan posiciones claves en la red trófica del suelo, interactúan con otros organismos del suelo, es decir consumen y son alimento de otros (Sánchez-Moreno, Ferris 2007). Son identificados en base a su morfología debido a que se pueden observar sus características por ser transparentes. Presentan una estrecha relación entre estructura y función, su hábito trófico puede ser estimado desde la estructura bucal y esófago (Ritz, Trudgill 1999). La estructura de la comunidad de nematodos ofrece un instrumento para evaluar cambios en la condición del

suelo debido a que estos organismos responden rápidamente a nuevos recursos y pueden ser analizados eficientemente (Bongers, Bongers 1998).

Existe una gran necesidad de asegurar que las prácticas de manejo del suelo utilizadas, mejoren la calidad del suelo y mantengan un suelo saludable, es decir un sistema estable con resiliencia al estrés, una alta diversidad biológica (Van Bruggen, Semenov 2000), una alta población de organismos benéficos y una población baja de plagas de los cultivos (Abawi, Widmer 2000).

La extensa literatura que existe sobre el estudio de los nematodos utilizados como bioindicadores de las condiciones del suelo bajo diferentes cultivos (Power, McSorley 1994), distintas prácticas agrícolas (Freckman, Ettema 1993, Porazinska et al. 1999) aplicación de plaguicidas (Pen-Mouratov, Steinberger 2005) y herbicidas (Neher, Olson 1999), para distinguir los efectos de disturbios físico y químicos de los suelos cultivados (Fiscus, Neher 2002) resalta el potencial que tienen estos animales para reflejar distintas situaciones en un agrosistema.

Indices de la comunidad de nematodos

Los índices ecológicos son herramientas útiles que no solo proveen medidas cuantitativas para caracterizar un ecosistema sino también para comparar diferentes sistemas ecológicos. En los últimos años hubo un desarrollo desde los índices biológicos tradicionales a los índices de madurez de nematodos y sus derivaciones. Bongers (1990) propuso una escala c-p (colonizadores a persistentes) para todas las familias de nematodos, resultando 5 grupos. El grupo c-p 1 conformado por familias con ciclos de vida corto, alta fecundidad, tolerantes al disturbio como Rhabditidae, Panagrolaimidae y Diplogasteridae y en el otro extremo el grupo c-p 5 que incluye familias como Aporcelaimidae, Actinolaimidae, entre otras, que son más sensibles al disturbio, se caracterizan por ciclos de vida largos, baja fecundidad y generalmente aparecen más tarde en la sucesión (Bongers, Bongers 1998, Bongers, Ferris 1999). Los taxa en el mismo grupo c-p responden de la misma manera al disturbio. Esta escala se utiliza para el cálculo del índice de madurez (MI) que se basa en el principio de que distintos taxa de nematodos (sin incluir a los nematodos fitófagos) presentan diferente sensibilidad al estrés e indica la interrupción de la secuencia de la sucesión a causa de las diferencias en sus ciclos de vida (Bongers 1990). La sucesión puede ser interrumpida por el agregado de fertilizantes, plaguicidas, la labranza (Wasilewska 1979, Neher, Olson 1999). El índice de madurez se correlaciona negativamente con la disponibilidad de nitrógeno y positivamente con la tasa de descomposición de la materia orgánica y además refleja funciones importantes del ecosistema que contribuyen a la sustentabilidad del mismo (Neher 1999, 2001).

El índice de madurez MI puede disminuir por un aumento de nutrientes o por contaminación del suelo. Para diferenciar estas dos situaciones, es que se propuso otro índice (MI25) que no incluye a los nematodos con valor de c-p 1, que son los que responden rápidamente al agregado de nutrientes al suelo. Este índice MI25 registra cambios a largo plazo ya que los taxa que incluye (con valores de c-p de 2

a 5) son más estables temporalmente y pueden proveer información a largo plazo de las condiciones ambientales (Neher, Campbell 1994, Korthals et al. 1996).

El índice de madurez PPI es comparable al índice MI pero se calcula en base a los nematodos fitófagos, el valor del índice puede aumentar cuando se produce un incremento en la producción primaria, particularmente de raíces (Bongers 1990). El índice PPI puede o no correlacionarse positivamente con el índice de madurez de nematodos de vida libre (Bongers 1990, Freckman, Ettema 1993, Neher, Campbell 1994). En condiciones de alta disponibilidad de nutrientes, PPI tiende a ser más alto y el índice MI tiende a ser más bajo, de esta manera la relación PPI/MI tiende a aumentar (Bongers et al. 1997).

Ferris et al. (2001) propusieron los índices de enriquecimiento (EI) y de estructura (SI) que proveen información adicional ya que reflejan la contribución de determinadas grupos funcionales de nematodos al enriquecimiento y estructura de la red trófica del suelo. El índice EI mide la abundancia de nematodos oportunistas de enriquecimiento que resulta de la entrada de materia orgánica, labranza y otros factores ambientales y el índice SI sugiere la relación trófica en una red indicada por la presencia de nematodos de nivel trófico alto como son los depredadores y omnívoros. La representación gráfica del perfil de la nematofauna que resulta de la ubicación de los valores de EI e SI provee un modelo de las condiciones de la red trófica del suelo. Las redes tróficas mas estructuradas y/o más diversas, es decir con valores de SI altos, se espera que sean más estables y que contengan probablemente organismos que pueden regular poblaciones de patógenos o parásitos de plantas (Sanchez-Moreno, Ferris, 2007), debido a que habría más uniones en la red trófica, mas interacciones entre organismos, mayor redundancia funcional y potencialmente mayor estabilidad funcional (Ferris et al. 2004). El desarrollo de estos índices representó un avance en la interpretación de la relación entre la ecología de la comunidad de nematodos y la función del suelo.

La interpretación de los índices requiere una referencia de una comunidad relativamente no disturbada (Neher 1999) como son los sistemas de cultivos perennes a medio y largo plazo (Neher, Campbell 1994). Además, se debe tener en cuenta las condiciones del ambiente ya que son importantes a la hora de evaluar los ensambles de nematodos, como ser el tipo del suelo que se correlaciona con distintas familias de nematodos (Yeates et al. 1997, Neher 1999).

Fertilización nitrogenada y su efecto sobre la comunidad de nematodos

Los fertilizantes orgánicos e inorgánicos son agregados al suelo para aumentar la disponibilidad de nutrientes y la productividad del cultivo. En un sistema sustentable, una mayor diversidad de la biota del suelo es requerida para que los nutrientes sean captados en la biomasa y de esta manera prevenir el lixiviado (Bongers, Bongers 1998).

La dinámica trófica y la estructura de la comunidad de nematodos han sido estudiadas en distintos sistemas de manejo con fertilizantes sintéticos

Tabla I.
Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la comunidad de nematodos.

País	Tipo	Fertilizante químico	Comunidad de nematodos*		Cultivo	Tipo de suelo	Referencia
			Abundancia	Índices			
China	urea	135 kg ha ⁻¹	<i>Protorhabditis</i> mayor	(B+F)/FI menor F/B igual MI menor	<i>Zea mays</i>	Franco	Liang et al. 2009
China	urea	300 kg ha ⁻¹	FI menor F mayor	PPI menor MI igual	<i>Glycine max</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Zea mays</i>	-	Pan et al. 2010
China	urea	324 kg ha ⁻¹ 132 kg ha ⁻¹	F mayor O-P eliminación F mayor B, O-P menor	MI, SI menor EI mayor MI menor EI mayor	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Cucumis sativus</i>	Franco arenoso	Li et al. 2010
EEUU**	Nitrato de amonio	110 kg ha ⁻¹	FI mayor B, F igual	ΣMI igual	<i>Cucurbita</i> spp.	Franco arenoso	Porzinska, Coleman 1995
Argentina	Urea	120 kg h a ⁻¹	AT igual B, F, FI igual	ΣMI igual	pastura	Franco	Mondino 2001
Argentina	Nitrato de amonio	150 kg ha ⁻¹ 75 kg ha ⁻¹	F menor B mayor F menor B mayor	MI menor PPI/MI mayor MI menor PPI/MI igual	<i>Malus domestica</i>	Franco	Azpilicueta et al. 2008
Nueva Zelanda	Urea	200 kg ha ⁻¹ 400 kg ha ⁻¹	<i>Meloidogyne</i> menor FI menor <i>Meloidogyne</i> menor FI menor	BI(B+F), MI igual PPI menor BI(B+F) igual MI, PPI menor PPI/MI igual	<i>Agrostis tenuis</i> <i>Trifolium subterraneum</i> <i>Lotus pedunculatus</i>	Franco arenoso	Sarathchandra et al. 2001

*Las comparaciones son realizadas con el tratamiento control excepto en ** la comparación fue con tratamiento estiércol
AT=Abundancia Total; B =Bacteriófagos; F=Fungívoros; O-P=Omnívoros-depredadores; «IM=índice de madurez calculado con todas las familias de la comunidad de nematodos, MI = índice de madurez de nematodos de vida libre, PPI = índice de madurez de nematodos fitoparásitos.

(Tabla I) y orgánicos (Porazinska, Coleman 1995, Neher 1999, Forge et al. 2003, Koenning, Barker 2004). Esta práctica agrícola conduce a cambios en la estructura trófica y en la riqueza de especies de nematodos (Sarathchandra et al. 2001, Bulluck et al. 2002), puede indirectamente y positivamente afectar a los microorganismos y animales del suelo al aumentar el crecimiento vegetal y estimular la exudación radical que conduce a aumentar la entrada de sustrato orgánico al suelo (Eo, Nakamoto 2007).

La fertilización también puede tener efectos adversos sobre la calidad del suelo, se sabe que algunos taxa de nematodos se pierden con la fertilización (Li et al. 2010), si bien la abundancia total permanece inalterada en un amplio rango de usos del suelo, una fuerte presión ambiental selectiva actúa sobre varios taxa, indicando disminución de la estabilidad del sistema como resultado del manejo intensivo (Mulder et al. 2005).

Los cambios en la composición de especies, estructura trófica y número de nematodos de distintos géneros depende del tipo de fertilizante aplicado (Ferris, Bongers 2006, Gruzdeva et al. 2007). Todd (1996) encontró que los nematodos microbívoros (que se alimentan de bacterias y organismos unicelulares eucariotas) aumentaron un 31% con la aplicación de nitrato de amonio. En otros estudios, los bacteriófagos se incrementaron en respuesta a un aumento en la dosis de fertilizante mineral en forma de NPK (60, 120 y 180 kg N ha⁻¹ anual) y respondiendo de la misma manera con otros fertilizantes que contenían nitrógeno (N, NK, NP y NK + NK) (Gruzdeva et al. 2007). Ferris et al. (1998) encontró que la mineralización de nitrógeno en el suelo se incrementó por la actividad de los nematodos bacteriófagos y Wasilewska (1998) al analizar las estrategias de vida de los taxa que componen esta categoría trófica observó que los bacteriófagos c-p 1 declinaron con el desarrollo del ecosistema mientras que la proporción de grupos con valores mayores de c-p aumentaron. Esta autora concluyó que los nematodos bacteriófagos pueden ser empleados en la evolución de las velocidades de los procesos de descomposición.

La respuesta de los nematodos bacteriófagos fue mayor en sistemas de manejo orgánico respecto a un sistema de manejo convencional (Ferris et al. 1996, Hu, Qi 2010). El aumento de los nematodos bacteriófagos oportunistas (c-p 1) está asociado con situaciones de enriquecimiento orgánico y velocidades de descomposición mayores que cuando se dan condiciones de degradación ambiental por lluvia ácida donde disminuyen o desaparecen los nematodos c-p 1 y 2, consecuencia de la tasa más lenta de descomposición (Wasilewska, 1997). El grupo bacteriófago c-p 2, considerados oportunistas generalistas, se caracteriza por tener tasas menores de reproducción que los del grupo c-p 1 e incluye especies de la familia Cephalobidae, que se pueden encontrar tanto en ambientes enriquecidos o en condiciones pobres de alimento y además son tolerantes a disturbios (Bongers, Bongers, 1998, Bongers, 1999, Ferris et al. 2001). La recuperación de un disturbio moderado,

como sería la fertilización, ya que no elimina la fauna del suelo, resulta en un aumento de los nematodos bacteriófagos oportunistas de enriquecimiento, indicadores de la fertilidad del suelo (Ferris et al. 2001), de esta manera se concluye que la dominancia de bacteriófagos de los grupos c-p 1 o 2 depende del estado nutricional y de la actividad microbiana en el sistema disturbado (Bongers, Bongers 1998).

Respecto al comportamiento de la abundancia de los nematodos fungívoros a la fertilización nitrogenada, Li et al. (2007) observaron un aumento en este grupo con un incremento de fertilización en niveles de 112,5 a 225 kg N ha⁻¹, aplicado durante la estación de cultivo de trigo y en dosis mayores (300 kg N ha⁻¹) la población también aumentó, en un sistema de rotación de soja, trigo y maíz (Pan et al. 2010).

La abundancia de nematodos bacteriófagos y fungívoros refleja la disponibilidad actual o reciente de su alimento (Ferris, Matute 2003). Estos nematodos al alimentarse de los descomponedores primarios de la materia orgánica, aceleran la descomposición y además liberan nutrientes para el crecimiento de las plantas (Freckman 1988, Ferris et al. 1996, Neher 2001). Según qué tipo de descomponedor predomine, las rutas de descomposición de la materia orgánica son descritas como bacterianas o fúngicas. La fertilización con nitrógeno influye en las cadenas tróficas basadas en los detritos y puede inducir un ajuste desde los canales de energía basados en hongos a bacterias (Bardgett, McAlister 1999). La relación que se establece entre la abundancia de nematodos fungívoros y bacteriófagos indica qué descomponedor se asocia con la ruta de descomposición. Las cadenas tróficas en suelos agrícolas están basadas más en bacterias que en los hongos (Hendrix et al. 1986), como lo indican varias experiencias (Freckman, Ettema 1993, Neher, Campbell 1994).

La abundancia de nematodos fitófagos fue mayor en respuesta a la fertilización con nitrato de amonio (Todd 1986) probablemente a una mayor producción de biomasa radical (Wang et al. 2006) y también aumentó en respuesta a fertilizantes con K (Gruzdeva et al. 2007). Observaciones realizadas por Rodríguez-Kabana (1986) sobre las propiedades nematicidas del nitrógeno inorgánico indican que para ser efectivo debe ser aplicado a tasas superiores a aquellas requeridas como fertilizantes y que las dosis difieren de acuerdo a la especie de nematodo presente.

Los nematodos depredadores generalistas y especialistas son sensibles al disturbio y a agregados químicos (Korthals et al. 1996, Berkelmans et al. 2003, Tenuta, Ferris 2004), particularmente con la aplicación de una dosis alta de urea de 600 kg ha⁻¹ (324 kg N ha⁻¹), la población de omnívoros – depredadores fue eliminada (Li et al. 2010) mientras que la fertilización con nitrato de amonio, a una tasa de 100 kg ha⁻¹ (33,5 kg N ha⁻¹), disminuyó el porcentaje y abundancia de omnívoros (Wang et al. 2006). Tenuta, Ferris (2004) encontraron que los nematodos del grupo c-p 4 y 5, donde estarían

incluidas las especies de estas categorías tróficas, son más sensibles a soluciones con nitrógeno, por efectos osmóticos y de cada ión, que los grupos con valores de c-p más bajos, lo que sugiere que la aplicación de fertilizantes puede contribuir a la baja abundancia de estos nematodos en sistemas de cultivo anual. Estos grupos funcionales, deberían ser conservados ya que pueden tener un efecto regulatorio sobre los niveles tróficos más bajo, incluyendo a los fitófagos y afectan la dinámica de nutrientes al modificar la abundancia de los consumidores intermediarios (Sánchez-Moreno, Ferris 2007).

Experiencias en Argentina

En Balcarce, en un ensayo realizado en pasturas, Mondino (2001) reportó que la fertilización con urea no afectó al número total de nematodos ni la abundancia de los distintos grupos tróficos.

En el Alto Valle de Río Negro, con historia frutícola de 70 años y sustentada en suelos con bajo contenido de materia orgánica, la fertilización nitrogenada ha sido empleada con variada intensidad dependiendo de las condiciones económicas del sector. Anualmente se aplican entre 100 a 200 kg ha⁻¹ de nitrógeno, cifras consideradas elevadas para frutales de pepita que tienen menores requerimientos (Weinbaum et al. 1992). En un ensayo en la zona, en *Malus domestica*, con sistema de riego mecanizado con microaspersores y malezas controladas con glifosato, la fertilización nitrogenada ocasionó cambios en algunos grupos tróficos (bacteriófagos y fungívoros), familias (Rhabditidae) y géneros de nematodos. La abundancia de nematodos bacteriófagos aumentó con la aplicación de nitrato de amonio en dosis de 150 y 75 kg N ha⁻¹, y con la última dosis el aumento fue temporal. El índice de madurez MI se correlacionó negativamente con el contenido de nitrato en el suelo y la relación PPI/MI fue afectada con la mayor dosis de nitrógeno (Azpilicueta et al. 2008).

En otra experiencia, en la misma zona, en dos huertos comerciales de *Pyrus communis* (H1 y H2), con agregado de guano y fertilizantes inorgánicos, los resultados obtenidos del gráfico que surge de la relación entre los índices EI y SI (Fig. 2), la mayoría de los valores se ubicaron en el cuadrante B y revelaron que las redes tróficas estaban moderadamente enriquecidas, relativamente estructuradas y estables (Azpilicueta et al. 2010). En el huerto H1, el índice de estructura SI fue consistentemente más alto que en el huerto H2 indicando que las redes tróficas más complejas pueden coexistir con los nematodos oportunistas de enriquecimiento y que la presencia de nematodos de niveles tróficos más altos, como omnívoros y carnívoros, pueden sobrevivir en suelos enriquecidos (Sánchez-Moreno et al. 2006).

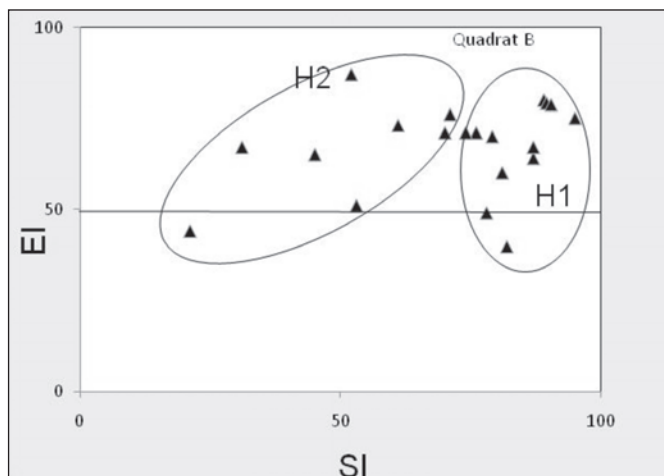


Figura 2: Relación entre los índices de enriquecimiento (EI) y estructura (SI) en los huertos H1 y H2 en la temporada 2008-2009.

Conclusiones

La mayoría de los nematodos del suelo aportan una serie de servicios fundamentales para el sustento de los sistemas agrícolas que contribuyen a mejorar la productividad del cultivo. En los agrosistemas se utilizan fertilizantes nitrogenados en cantidades muchas veces excesivas y se ha demostrado que los fertilizantes impactan en mayor o menor medida en la diversidad y en la estructura de la comunidad de nematodos en el suelo, dependiendo de la dosis y tipo de fertilizante. Es preciso que la información generada por las investigaciones sobre los patrones de comportamiento de la abundancia de los nematodos en respuesta a los fertilizantes, sea incorporada e implementada en futuros programas de manejo de suelo. Con esta información disponible se debería optimizar el uso de los fertilizantes tratando de agregar la cantidad necesaria para el cultivo en el momento que la planta realmente lo necesite, con el fin de evitar pérdidas del mismo y ocasionar efectos negativos en la comunidad de nematodos.

Bibliografía

- Abawi G.S., Widmer T.L. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Appl Soil Ecol.* 15: 37-47.
- Azpilicueta C., Aruani C., Reeb P., Sánchez E. 2008. Estructura de la comunidad de nematodos del suelo bajo dos niveles de fertilización nitrogenada en Alto Valle de Río Negro-Argentina. *Nematropica.* 38(1): 75-86.

- Azpilicueta C., Aruani M.C., Vitta L. 2010. Nematode community structure and chemical and physical properties in different textural class soil in the root zone of pear var. Williams, XI International Pear Symposium. Neuquén. Argentina.
- Bardgett R.D., McAlister E. 1999. The measurement of soil fungal:bacterial biomass ratios as an indicator of eco-system selfregulation in temperate grassland. *Biol Fertil Soils*. 29: 282-290.
- Barker K.R., Koenning S.R. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Ann Rev Phytopathol*. 36: 165-205.
- Berkelmans R., Ferris H., Tenuta M., Van Bruggen A.H.C. 2003. Effects of long-term crop management on nematode trophic levels other than plant feeders disappear after 1 year of disruptive soil management. *Appl Soil Ecol*. 23: 223-235.
- Bilgrami AL., Ahmad I., Jairajpuri M.S. 1986. A study of intestinal contents of some mononchs. *Rev Nematol*. 9:191-194.
- Bongers T. 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition, *Oecologia*. 83: 14-19.
- Bongers T., Van Der Meulen H., Korthals G. 1997. Inverse relationship between the nematode maturity index and plant parasite index under enriched nutrient conditions. *App Soil Ecol*. 6:195-199.
- Bongers, T., M., Bongers. 1998. Functional diversity of nematodes, *Applied Soil Ecology* 10: 239-251.
- Bongers T., Ferris H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Tree*. 14(6): 224-228.
- Bridge J. 1996. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Ann Rev Phytopathol*. 34: 201-225.
- Bulluck L.R., Barker K.R., Ristaino J.B. 2002. Influences of organic and synthetic soil fertility amendments on nematode trophic groups and community dynamics under tomatoes. *App Soil Ecol*. 21: 233-250.
- Dropkin V.H. 1989. Introduction to Plant Nematology. Department of Plant Pathology. Ed Wiley, second edition. pp 304.
- Eo J., Nakamoto T. 2007. Evaluation of roots effects on soil organisms under different fertilization regimes by comparing rhizosphere and interrow soil in a wheat field. *Plant Root*. 1: 1-9.
- Ferris H., Venette H.R., Lau S.S. 1996. Dynamics of nematode communities in tomatoes grown in conventional and organic farming systems, and their impact on soil fertility. *App Soil Ecol*. 3: 161-175.
- Ferris H., Venette R.C., van der Meulen H.R., Scow K.M. 1998. Nitrogen fertility and soil food web management. *J Nematol*. 30: 495-496.

- Ferris H., Bongers T., De Goede R.G.M. 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *App Soil Ecol.* 18:13-29.
- Ferris H., Matute M.M. 2003. Structural and functional succession in the nematode fauna of a soil food web. *App Soil Ecol.* 23: 93-110.
- Ferris H., Venette R.C., Scow K.M. 2004. Soil management to enhance bacterivore and fungivore nematode populations and their nitrogen mineralization function. *App Soil Ecol.* 25: 19-35.
- Ferris H., Bongers T. 2006. Nematode indicators of organic enrichment. *J Nematol.* 38: 3–12.
- Fiscus D.A., Neher D.A. 2002. Distinguishing sensitivity of free-living soil nematode genera to physical and chemical disturbances. *Ecological Applications.* 12: 565-575.
- Freckman D.W., Ettema CH. 1993. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. *Agr Ecosyst Environ.* 45: 239-261.
- Freckman D.W. 1988. Bacterivorous nematodes and organic-matter decomposition. *Agr Ecosyst Environ.* 24: 195-217.
- Gruzdeva L.L., Matveeva E.M., Kovalenko T.E. 2007. Changes in Soil Nematode Communities under the Impact of Fertilizers. *Eurasian Soil Sci.* 40(6): 681-693.
- Hu C., Qi Y. 2010. Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field. *European J Soil Biol.* 46: 203-236.
- Hendrix P.F., Parmelee R.W., Crossley J., Coleman D.A., Odum E.P., Groffman P.M. 1986. Detritus food webs in conventional and no-tillage agroecosystems. *BioSci.* 36: 374-380.
- Jairajpuri S.M., Ahmad W. 1992. *Dorylaimida. Free-living, predaceous and plant-parasitic nematodes*, Brill E.J., Leiden. pp 458.
- Koenning S.R., Barker K.R. 2004. Influence of poultry litter applications on nematode communities in cotton agroecosystems. *J Nematol.* 36(4): 524-533.
- Korthals G.W., Van De Ende A., Megen H.V., Lexmond T.M., Kammenga J.E., Bongers T. 1996. Short-term effects of cadmium, copper, nickel and zinc on soil nematodes from different feeding and life-history strategy groups. *App Soil Ecol.* 4: 107–117.
- Li Q., Liang W.J., Jiang Y., Shi Y., Zhu J.G., Neher D.A. 2007. Effect of elevated CO₂ and N fertilization on soil nematode abundance and diversity in a wheat field. *App Soil Ecol.* 36(2007): 63-69.
- Li Q., Jiang Y., Liang W., Lou Y., Zhang E., Liang CH. 2010. Long-term effect of fertility management on the soil nematode community in vegetable production under greenhouse conditions. *App Soil Ecol.* 46: 111-118.

- Liang W., Lou Y., Li Q., Zhong S., Zhang X., Wang J. 2009. Nematode faunal response to long-term application of nitrogen fertilizer and organic manure in Northeast China. *Soil Biol Biochem.* 41: 883-890.
- Luc M., Hunt D., Machon J. 1990. Morphology, Anatomy and Biology of Plant Parasitic Nematodes-A Synopsis. Ed. Luc M., RS., Sikora, J., Bridge. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.* CAB International. pp 1-44.
- Neher D.A. 1999. Nematode communities in organically and conventionally managed agricultural soils. *J Nematol.* 31(2): 142-154.
- Neher D.A., Olson R.K. 1999. Nematode communities in soils of four farm cropping management systems. *Pedobiologia.* 43: 430-438.
- Neher D.A. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J Nematol.* 33 (4): 161-168.
- Neher D.A., Campbell C.L. 1994. Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops. *App Soil Ecol.* 1: 17-28.
- Mondino E. A. 2001. Efecto de las rotaciones, las labranzas y la fertilización nitrogenada sobre la nematofauna del suelo. Tesis (Maestría en Producción Vegetal)-Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce, Argentina. pp. 71.
- Mulder C., Schouten A.J., Hund-Rinke K., Breure A.M. 2005. The use of nematodes in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicol Environ Safety.* 62: 278-289.
- Pan F., McLaughlin N.B., Yu Q., Xue A.G., Xu Y., Han Y., Li C., Zhao D. 2010. Responses of soil nematode community structure to different long-term fertilizer strategies in the soybean phase of a soybean-wheat-corn rotation. *European J Soil Biol.* 46:105-111.
- Pen-Mouratov S., Steinberger Y. 2005. Responses of nematode population community structure and diversity to pesticide treatments in arid ecosystem of the Negev Desert. *Nematology.* 7(2): 179-191.
- Porazinska D.L., Coleman D.C. 1995. Ecology of nematodes under Influence of *Cucurbita* spp. and different fertilizer types. *Supp J Nematol.* 27(4S): 617-623.
- Porazinska D.L., Duncan L.W., McSorley R., Graham J.H. 1999. Nematode communities as indicators of status and processes of a soil ecosystem influenced by agricultural management practices. *App Soil Ecol.* 13: 69-86.
- Power I.E., McSorley R.M. 1994. Soil nematode community structure in two tropical pastures. *Nematologica.* 24(2): 133-141.
- Ritz K., Trudgill D.L. 1999. Utility of nematode community analysis as an integrated measure of the functional state of soils: perspectives and challenges. *Plant and Soil.* 212: (1): 1-11.

- Rodríguez-Kábana R. 1986. Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *J Nematol.* 18(2): 129-135.
- Sánchez-Moreno S., Ferris H. 2007. Suppressive service of the soil food web: Effects of environmental management. *Agr Ecosyst Environ.* 119: 75-87.
- Sarathchandra S.U., Ghani A., Yeates G.W., Burch G., Cox N.R. 2000. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biol Biochem.* 33: 953-964.
- Tenuta M., Ferris H. 2004. Sensitivity of nematode life-history groups to ions and osmotic tensions of nitrogenous solutions. *J Nematol.* 36(1): 85-94.
- Todd T.C. 1996. Effects of management practices on nematode community structure in tallgrass prairie. *App Soil Ecol.* 3: 235-246.
- van Bruggen A.H.C., Semenov A.M. 2000. In search of biological indicators of soil health and disease suppression. *App Soil Ecol.* 15: 13-24.
- Wang R.H., McSorley R., Marshall A., Gallaher R.N. 2006. Influence of organic *Crotalaria juncea* hay and ammonium nitrate fertilizers on soil nematode communities. *App Soil Ecol.* 31:186-198.
- Wasilewska L. 1979. The structure and function of soil nematode communities in natural ecosystems and agrocenoses. *Polish Ecol Studies.* 5: 7-145.
- Wasilewska L. 1997. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes. *Russian J Nematol.* 5(2): 113-126.
- Weinbaum S.A., Johnson R.S., DeJong T.M. 1992. Causes and consequences of over fertilization in orchards. *Hoer Technol.* 2:112-121.
- Yeates G.W. 1971. Feeding types and feeding groups in plant and soil nematodes. *Pedobiologia.* 11: 173-179.
- Yeates G.W., Bongers T., De Goede R.G.M., Freckman D.W., Georgieva S.S. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera - An outline for soil ecologists. *J Nematol.* 25: 315-331.
- Yeates G.W., Bardgett R.D., Cook R., Hobbs P.J., Bowling P.J., Potter J.F. 1997. Faunal and microbial diversity in three Welsh grassland soils under conventional and organic management regimes. *J App Ecol.* 34: 453-470.
- Yeates, G. 1998. Soil Nematode Assemblages: Regulators of Ecosystem Productivity. *Phytoparasitica.* 26 (2): 97-100.

Capítulo 7

Perfil Fisiológico de Comunidades de Suelo Basado en el Consumo de Oxígeno

Community-Level Physiological Profiling of Soil Communities Based on Oxygen Consumption

Jay L. Garland¹, M. Celina Zabalo²

¹Dynamac Corporation, Mail Code DYN-3 Kennedy Space Center, Fla. 32899, USA. ²Center of Renewable Resources of Semiarid Region, National Council for Scientific and Technological Research (CERZOS-CONICET), San Andrés 800, Bahía Blanca (8000), Argentina.
E-mail: mzabaloy@uns.edu.ar

Introduction

Characterization and classification of heterotrophic microbial communities based on rapid assessment of multiple sole carbon sources use, an approach termed community-level physiological profiling (CLPP) by Lehman et al. (1995), was developed over 10 years ago (Garland, Mills 1991). The approach commonly utilizes microtiter plates from Biolog, Inc. in which respiration of 95 separate sole carbon sources is detected by the reduction of a redox sensitive dye (Bochner, Savageau 1977, Bochner 1989). The multivariate profile of carbon source use is a proven tool for rapid assessment of community dynamics in response to spatial, temporal, or experimental gradients (Garland 1997, Mills, Garland 2001). More recent work has employed the rate of extinction in community phenotypic characters with dilution as an estimate of relative structural diversity (Garland, Lehman 1999). While a valuable method for assessing relative change in microbial communities when properly applied, significant limitations of the approach are well known (Konopka et al. 1998). In particular, the kinetics of dye reduction is not a clear indicator of in situ carbon source utilization. The discrepancy between CLPP response and function may result from the selective enrichment of the community at the high substrate concentration (i.e., > 100 mM) necessary to achieve tetrazolium reduction in the Biolog plates during the typical 1-4 day incubation (Smalla et al. 1998; Winding, Hendrickson 1997).

Development of a more functionally relevant CLPP will depend on the application of new technologies for detection of physiological processes. An improved detection system would involve lower substrate concentrations and shorter incubations to minimize bias due to growth and selective enrichment. In addition, the use of undefined, proprietary reagents should be minimized so that incubation conditions can be defined and manipulated. The significant

effect that changes in the media formulation between GN2 and GN plates from Biolog Inc. had on CLPP illustrates the need for a defined chemical environment (O'Connell, Garland 2002). Assessment of respiration should involve direct measurement of substrates (i.e., O_2) or products (CO_2) rather than indirect indicators such as tetrazolium dye. A multivariate approach to carbon source use based on CO_2 monitoring has been developed (Degens et al. 2001). While this approach limits incubation time and the use of unknown reagents, substrate concentrations are relatively high (i.e., 10-100 mM). ^{14}C -respirometric approaches allow for testing of environmentally relevant substrate concentrations, but even simplified assay systems (Reid et al. 2001) still have the expense associated with disposal of radioactive wastes.

Since the CLPP approach typically involves uniform mixing of various substrates with the sample, aqueous suspensions (either direct samples of liquid environments or slurries of solid samples) are tested. Detection of dissolved O_2 (DO) in the test medium may allow for improved sensitivity (i.e., testing of lower substrate concentrations) given the low solubility of O_2 in water. Recently, a fluorescence-based, microplate platform has been developed for assessing DO (Wodnicka et al. 2000), and the objective of the current work is to review the work completed to date with this approach, with specific emphasis on soil analyses.

General methodology

BD Microplates

The BD Oxygen Biosensor System (BD Biosciences, Bedford, MA) used in these studies consists of a 96 well (300 μ l volume) microtiter plate containing an O_2 -sensitive fluorophore, 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium (II) chloride, adsorbed onto an O_2 permeable silicone matrix in the bottom of each well. The fluorescence of the ruthenium dye is quenched by the presence of O_2 , so the signal from the fluorophore-gel complex loaded on the bottom of the microplate wells increases in response to respiration in the overlying sample.

Plates are read continuously (every 15 to 30 min) on a microplate fluorometer at 485 nm excitation and 604 nm emission using the bottom reading mode, with controlled incubation temperature, given that the fluorescence is affected by temperature.

Plate inoculation

Previous work (Zabaloy et al. 2008) has shown that the sensitivity of the assay to detect a response to low levels of substrate can be greatly increased by increasing the volume of liquid loaded in the wells from 150 to 240 μ l. Subsequent experimental work has been conducted using the optimized

protocol published by Zabaloy et al. (2008) (Figure 1). Briefly, the 96-well plate is loaded with the assay substrates to give a final concentration of 50 mg l^{-1} , taking into account the volume of soil slurry and any other reagent solution to be loaded in the well (e.g., N, P, or antibiotic), and a final volume of $240 \mu\text{l}$. Nitrogen at a rate of 10 mg l^{-1} has been shown to give an optimum response. To achieve the desired final concentrations, appropriate stock solutions must be prepared and filter-sterilized ($< 0.2 \mu\text{m}$). For example, if the desired final concentration of C source is 50 mg l^{-1} and that for N is 10 mg l^{-1} , and the soil slurry will be added in $80 \mu\text{l}$, then one could prepare stocks of 150 mg l^{-1} C source and 30 mg l^{-1} N, loading $80 \mu\text{l}$ of each one. A thick soil slurry that still allows pipetting is prepared. As a rule of thumb, mineral soils can be suspended in less water (thicker slurries) than organic soils. In general, 10 g mineral soil (or 5 g of organic soil) is suspended in 25 ml of filter-sterilized distilled water in a 50 ml centrifuge tube containing glass beads ($2 \text{ mm } \varnothing$) and shaken for 1 min by hand to disrupt soil aggregates and homogenize the slurry. The soil slurry is inoculated in the plate (typically, 80 to $160 \mu\text{l}$) immediately prior to plate incubation and reading.

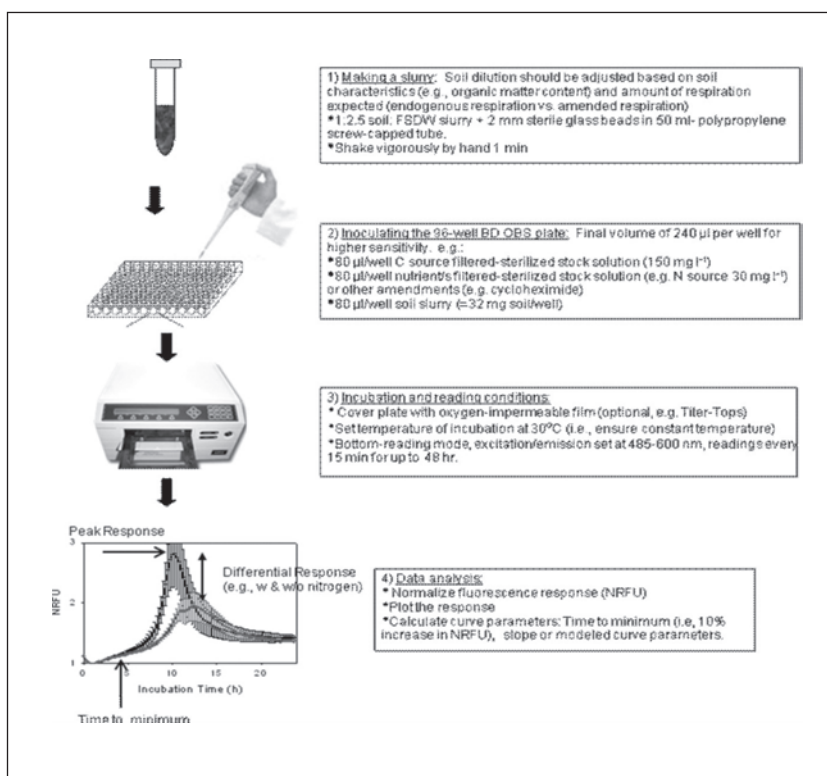


Figure 1: Overview of the BDOBS approach for soil community level physiological profiling.

Data analysis

Fluorescence increases following a lag period ranging from a few minutes to many hours as the inoculated community consumes O_2 (Figure 1). To simplify interpretation, fluorescent data are converted to normalized relative fluorescent units (NRFU) by dividing each time reading by the time=1 h response (to account for temperature stabilization in the platform). Fluorescence reaches a peak at low substrate concentrations (<100 ppm), but may be maintained at saturating levels (typically 8-9 NRFU) when high substrate levels (e.g., 500 ppm) are used. Since low substrates amendments minimize enrichment effects (see below), a peak in fluorescence is the preferred response profile. Given the reversible nature of the quenching reaction, fluorescence begins to decline when O_2 diffusion into the gel layer equals the diminishing rate of respiration rate as substrate is depleted. The rate of O_2 diffusion into the gel layer appears to be strongly influenced by settling of the soil suspension on top of the gel layer. Shaking the plates, even when sealed with gas impermeable film to prevent O_2 diffusion from the atmosphere air, greatly reduces the fluorescent response (Garland and Zabaloy, unpublished data). These result suggests that O_2 dissolved in the overlying sample can not readily diffuse into the gel under static conditions, most likely due to the settled soil layer.

Various parameters may be used to characterize and compare the response profiles, but the 3 most commonly used to date have been minimum response time, peak height, and the integrated response, or area. The minimum response time is defined as the amount of time necessary for a 10% increase in NRFU (i.e., threshold response of 1.1 NRFU) given that formalin killed control never exceed 1.1 NRFU. The lag in response should be related to the amount of active biomass able to utilize a given substrate (see below for further detail). The peak in response corresponds to the minimal level of O_2 in the gel layer during incubation, and should reflect the rate at which the O_2 is consumed. The rate of O_2 consumption can be affected by the same factors affecting lag (i.e., the number and activity of organisms present in the sample that can utilize the substrate). In addition, the peak will be influenced by the degree of selected enrichment during the lag phase. Finally, the degree to which the substrate is respired versus assimilated will affect the peak response since samples with more cell growth should have lower O_2 consumption. Further work is needed to evaluate the influence of these various factors on the peak height. The area under the curve can provide an integrated measure of both the lag and the peak height, but effective comparison amongst samples requires selection of an appropriate incubation time. For example, sufficient time is needed to ensure that responses are observable, but long incubation time will minimize differences if responses have peak and declined to baseline level. Ideally, area values should be compared when the fastest responding wells have just reached their peak.

Functional relevance of the assay

The first published work that used BDOBS microplates for microbial community analysis was by Garland et al. (2003), who reported that CLPP could be performed with the O_2 -based system using substrate concentrations as low as 50–100 mg l⁻¹, which represent 10–100 times less than used in CLPP approaches based on either Biolog or CO₂ monitoring. Quantifiable responses were obtained in as little as several hours when samples of relatively low cell densities (i.e., 10⁵–10⁶ ml⁻¹) were exposed to substrate concentrations as low as 50 ppm (Figure 2). The rate of fluorescent response was correlated with independent measures of *in situ* rates of substrate use, indicating that, unlike the Biolog-CLPP, the BDOBS-CLPP approach produced functionally relevant profiles. Specifically, rhizosphere samples from a hydroponic plant system exposed to known concentrations of either of two different types of surfactants, sodium laureth sulfate or cocoamidopropyl betaine, showed a faster response in the BDOBS. The inverse relationship between the lag in response and independent measures of the rate of substrate surfactant utilization by the intact rhizosphere communities suggest that this is a viable approach for rapid assessment of relative rates of substrate utilization among microbial communities. The reduced incubation times and lower substrate concentrations appear to result in a CLPP more indicative of the physiological activity, rather than phenotypic potential, of the community. Recent work (Garland, Zabalo, unpublished data) found that the amount of cell growth in wells is minimal, particularly for samples showing peak responses within 6–10 h, further demonstrating that selective enrichment is minimal. Phenotypic and genotypic characterization of the overall community, and its active fraction, is necessary to address fundamental questions in microbial ecology related to the relationship between community structure and function. Linking BDOBS with community-level genotypic analysis targeting both the total (Amann et al. 1995, Pace 1997, Smalla et al. 2001) and active (Borneman 1999, Yin et al. 2000) cells may help provide fundamental insight into structural/functional dynamics.

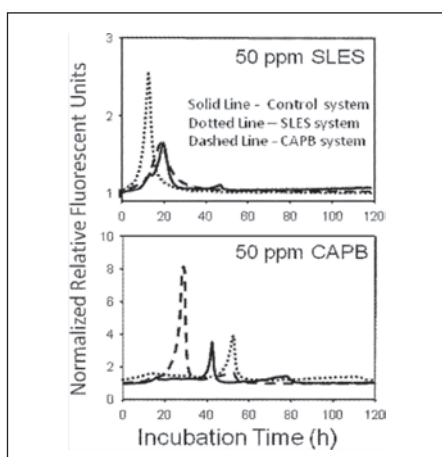


Figure 2: Response of rhizosphere communities in the BDOBS plates containing 50 ppm of either A) sodium laureth sulfate, SLES, or B) cocoamidopropyl betaine, CAPD. Samples obtained from hydroponic systems exposed to neither substrate (control system) or each individually (SLES or CAPB systems).

This work also demonstrated that inoculum density consistently affected the rate of response (i.e., minimum response time, lag, time to peak), and also affected the degree of response in some cases, indicating that it can be a confounding factor when comparing substrate utilization among samples. This effect may be of limited concern in studies interested in comparing responses per unit habitat (i.e., ml^{-1} , g dry wt^{-1} , etc.), but will need to be addressed when density-independent changes in community response are sought.

Review of work with soils

The suitability of the BDOBS approach for soil microbial physiological profiling was first addressed by Väisänen et al. (2005). Different size classes of water stable aggregates were amended with low levels of C sources (100 mg l^{-1} ; chitin, xylan, α -cellulose, potato starch, L-asparagine, D(+) mannose, casamino acid, sucrose, D-(+) xylose, sodium acetate and tryptic soya broth) in the wells. All substrates induced detectable O_2 consumption (peak in fluorescence) within 24 h. The communities associated with macroaggregates exhibited faster response (time to peak) to C sources such as asparagine, cellulose, chitin, mannose, sucrose, xylan and xylose compared to microaggregates. This work verified that fungi responded in the assay, since addition of cycloheximide reduced the rate of respiration of cellulose, chitin, mannose, xylan and xylose. Response to asparagine and sucrose were less effected by cycloheximide addition, suggesting that these substrates were preferentially used by bacteria.

Several methodological issues with the assay for soil testing were investigated and optimized by Zabaloy et al. (2008), including the minimal level of C supplementation that yielded a detectable response, the effect of soil aggregate disruption, storage, N availability on C use, and selective inhibition of fungi were explored in that work. Results showed that although levels of substrates as low as 10 mg l^{-1} gave a fluorescent signal, 50 mg l^{-1} was recommendable to distinguish the substrate-induced respiration from the endogenous C response. Soil incubated in the field within micro-bags and stored at 4°C for 0, 11 and 33 days, were either disrupted prior to plate inoculation or incubated intact within the bags. The maximum fluorescent response was not significantly changed by soil:water mixing and storage (<33 days), thus indicating that creating the soil slurry has minimal impact on the response. The addition of the fungal inhibitor cycloheximide in the plate increased the lag in response (time to minimum response) of several substrates (casein, asparagine, coumaric acid, acetate), but the extent of inhibition was not related to the fungal to bacterial biomass ratios in the soils. Still, the use of BDOBS coupled to the selective-inhibition method may allow for discrimination of relative utilization of substrates by the fungal communities, although it is not recommended for the estimation of overall fungal activity/biomass in the samples.

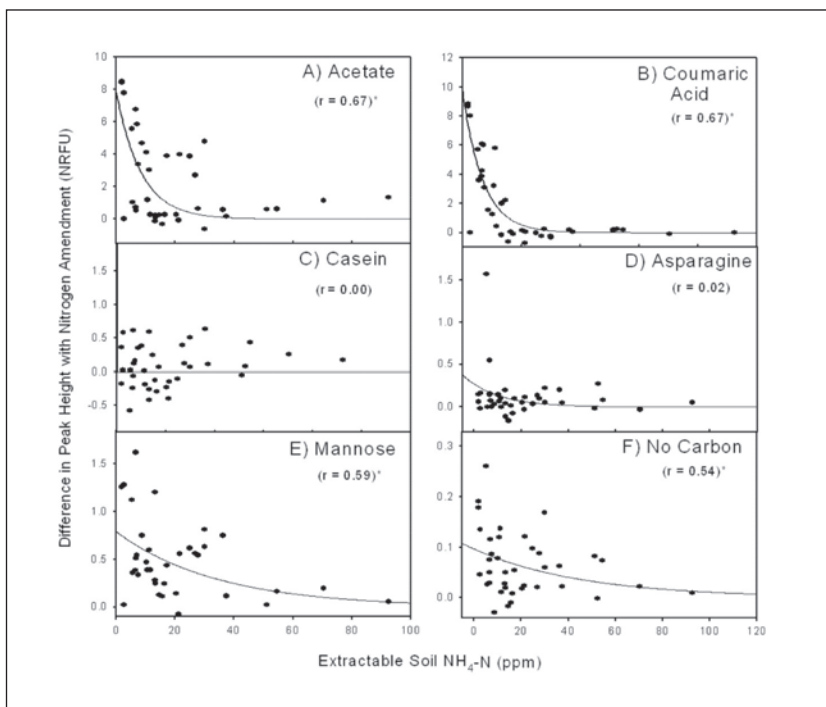


Figure 3: Correlation of N_{diff} (see explanation in the text) to extractable soil $\text{NH}_4\text{-N}$ in field samples from a rye-corn rotation. Responses presented for different (50 mg l^{-1}) carbon amendments to the wells (Panels A-E) and no carbon addition (Panel F).

Garland et al. (2002) was the first to demonstrate that N addition to the wells could increase community response, suggesting that the assay could be used to assess N limitation of microbial activity. Zabaloy et al. (2008) showed that fertilization of soil microcosms altered the impact of N addition to the wells. Unfertilized microcosms showed higher fluorescent peaks with N addition (compared to without N) at all sampling times while soils from the fertilized microcosms did not respond to N at the early time point (1 day) but appeared N limited 5 days after fertilization.

Nutrient limitation of microbial activity in soil has practical consequences on soil fertility and crop yields, for N is most likely immobilized in the microbial biomass with amendments with high C:N contents. Garland et al. (2010) compared the microbial activity between corn (*Zea mays* L.) and rye (*Secale cereale* L.) rotations receiving no organic amendment (all fertilizer from inorganic sources) versus additions of biosolids or dairy waste solid organic amendments. They studied microbial respiration with a range of substrates with and without N addition in the plate, along the crops cycle, in relation with fertilization timing. This work further showed that N_{diff} (i.e., the difference

in peak height for a given C source with 10 mg l⁻¹ N source and without N) is an indication of N limitation on microbial respiration. N_{diff} was considerably higher in all treatments during the rye crop when soil inorganic N was very low (< 10 mg l⁻¹), with the dairy solid treatment showing the highest N limitation. In contrast, N_{diff} was low along all treatments during the corn crop when extractable inorganic N was high (Figure 3). The crop yield results showed good agreement with the N limitation estimate through N_{diff} , with lower mid-season biomass production for rye with dairy solids fertilization and no effect of organic amendments on corn production. Work is being conducted to understand the extent and duration of N limitation in soils following different levels of N fertilization in the field, and the relationship between N limitation and growth under the assay conditions (Garland et al., in preparation).

Brown et al. (2009) used the BDOBS approach to analyze physiological responses of bulk soil, rhizosphere and litter microbial communities in a nutrient-limited scrub-oak forest soil, exposed to varied experimental conditions (N and/or P additions vs. no nutrients; complex, natural substrates and glucose, vs. no C). All the communities appeared mainly N-limited with a secondary P limitation, as observed by the complete lack of response to glucose in the absence of these nutrients. That effect was greater in bulk and rhizosphere soils, while the litter community might have less of a P limitation given that the background C+ N and glucose+N showed significant respiration. The litter community also showed substrate-specific adaptation, with greater use of litter extracts as C source. This is a clear demonstration of the ecological relevance of the assay, which reflects in situ use of substrates by microbial communities. Moreover, this study showed that factors limiting microbial respiration in the field can be assessed with this approach, given the flexibility to add macro and micronutrients in the incubation media.

Overall, the above results showed that the BDOBS approach allows for rapid and multivariate physiological profiling of soil microbial communities, as well as the evaluation of their integrated use of C, N and P.

Effects of pesticides and other potential toxicants

Monitoring the fate and effects of pesticides and other xenobiotics in environmental samples for ecotoxicological risk assessment is often time-consuming and labor intensive, involving techniques ranging from analytical chemistry to physiological studies with single species or communities. BDOBS-CLPP has been used a rapid means of both defining biodegradation pathways and assessing the potential impacts of toxicants on whole communities.

Sharvelle et al. (2008) used the BDOBS approach to elucidate the dominant biodegradation pathway of an anionic surfactant used in detergents, polyalcohol ethoxylate (PAE). They observed that PAE-adapted microbial consortium, present in a sludge taken from municipal wastewater treatment

plant, showed a faster O_2 uptake and greater response to the surfactant and its metabolites as compared to an unexposed, control consortium. The BDOBS results suggested that the hydrophobe-hydrophile pathway was the prevalent metabolic route in this microbial community. At the same time, it allowed the identification of several metabolites, such as ethylene glycol and diethylene glycol, that were relatively recalcitrant and may be of environmental concern.

More recent work by Zabaloy et al. (2010) used the BDOBS to examine aerobic degradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil microcosms treated with an environmentally-relevant level (ERL, 5 mg kg^{-1} soil) and high level (HL, 50 mg kg^{-1} soil) of 2,4-D after 3 and 14 days of incubation. Use of 2,4-D as a sole source of C and energy (50 mg l^{-1}) was initially retarded (> 40 h at day 3) and was maximal 2 weeks after treatment (Figure 4). They argued that a shift in the dominant degrader populations may have occurred between days 3 and 14 in the HL, as opposed to the ERL microcosms, and the increase in use of 2,4-D reflected the activity of specific degraders that were favored by the high dose.

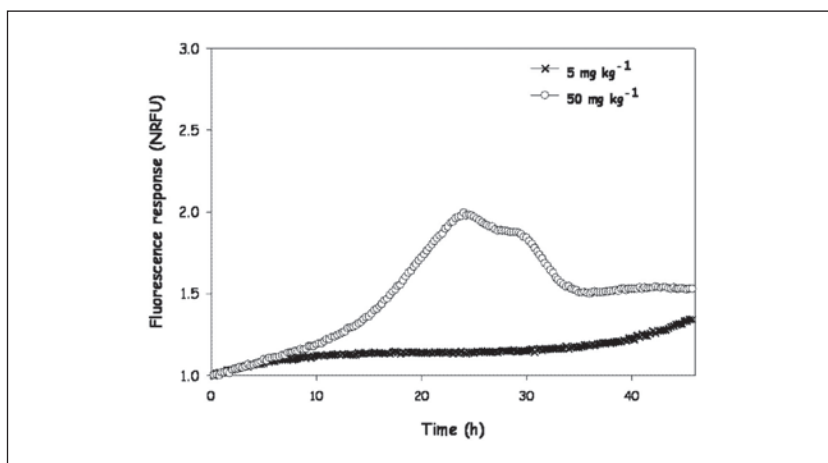


Figure 4: Time course of the fluorescent response of soils in the BDOBS to 2,4-D as sole source of C. Plots represents data for microcosms exposed to 5 or 50 mg 2,4-D kg^{-1} soil for 14 days.

It has been postulated that long-term exposure of a community to a given toxicant will lead to a higher tolerance for this pollutant, a concept known as pollution-induced community tolerance (PICT) (Blanck 2002). Increased community tolerance resulting from the elimination of sensitive species and addition of tolerant species is considered strong evidence that changes were caused by the pollutant. A fundamental step in the PICT measurements is the selection of an ecologically relevant parameter as endpoint that reflects the toxic effects at the community level (Blanck 2002). Zabaloy et al. (2010) adapted

the BDOBS as a means of assessing PICT of the soil microbial community to 2,4-D. Coumaric acid mineralization by an agricultural soil and a pristine forest soil were assessed in the BDOBS plate with increasing concentrations of herbicide (0, 5, 125 and 250 mg l⁻¹) in the wells (Figure 4). Coumaric acid is a lignin-derived phenolic compound, and its metabolism by soil microbes may have important implications in soil C cycling (Yanni et al. 2010). Coumaric acid use by the agricultural soil remained constant across all of the herbicide levels, indicating the 2,4-D tolerant community existed even though 2,4-D exposures had ceased 2 years before sampling. In contrast, increasing concentrations of 2,4-D in the plate significantly decreased coumaric acid use in the forest soil that had never been directly exposed to 2,4-D. The BDOBS PICT approach proved to be a useful tool to distinguish an herbicide-exposed soil from an unpolluted one.

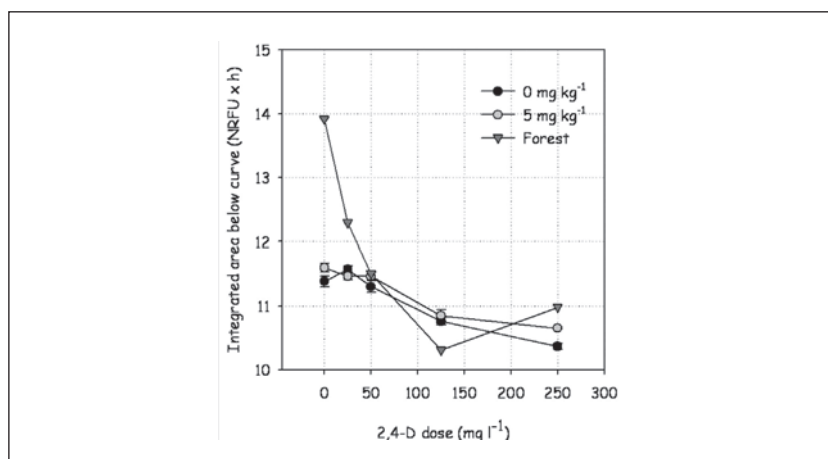


Figure 5: Pollution induced community tolerance (PICT) response (see text for details) of agricultural soils exposed to 0 or 5 mg kg⁻¹ 2,4-D and a pristine forest soil to 2,4-D. Graph shows the integrated response to 50 mg l⁻¹ coumaric acid within wells of the BDOBS containing increasing concentrations of 2,4-D.

Glyphosate is a non-selective herbicide that blocks the synthesis of aromatic amino acids in plants and non-target sensitive microbes. Zabaloy et al. (in preparation) used BDOBS as a CLPP tool to examine herbicide-derived shifts in functional diversity and to assess potential mineralization of glyphosate in soil. Soils from the Pampa region in Argentina (DOR and ZAV11) were collected from fields with long-term use of the herbicide (> 11 year), and a natural site [ZAV0]. Microcosms were treated with glyphosate at rates of 15 and 150 mg kg⁻¹ soil, incubated for 1 week, and then sampled for carbon sources utilization using the BDOBS plates. In the DOR microcosms, coumaric acid utilization showed a reduction in peak height with the high dose of glyphosate. ZAV0 and ZAV11 differed in their

carbon utilization pattern, probably reflecting differences in long-term land management, such as glyphosate use, vegetation cover, and tillage. Interestingly, ZAV0 exhibited greater use of N-containing substrates (phenylalanine, sarcosine, and glyphosate) which suggests larger N limitation as compared to the agricultural site (ZAV11). Acute effects of the herbicide were not noticeable in the ZAV11 microcosms, probably because only the low rate was tested. Comparison of the fluorescence response curve between wells without C amendment other than glyphosate as a C+N source showed no adaptation for glyphosate use as was detected in soils with previous history of herbicide use (DOR, ZAV11). However, the unexposed (ZAV0) soil showed a relatively high respiratory response with glyphosate as substrate which was probably related to N limitation in this soil (see above), and not to higher general microbial activity (as background C was used to the same extent than in the ZAV11 soil).

Conclusions

The BDOBS offers many advantages for physiological testing of microbial communities. The location of the gel layer on the bottom of the wells allows for visibly turbid (e.g. heavy soil suspensions) materials to be assayed with bottom-reading plate readers, eliminating the need for cell extraction steps. Detection of dissolved O₂ (DO) rather than redox dye reduction improves the sensitivity of CLPP, allowing for more rapid assessment (i.e., several hours versus 1-4 days) of community respiration either without amendment or with addition of low levels of substrates (i.e., 1 mM g⁻¹ soil vs. 10-100 mM typically used in substrate-induced respiration assays). Finally, conditions can be fully defined and readily manipulated within the assay due to lack of ancillary proprietary ingredients or physicochemical restrictions on the fluorophore response. This flexibility allows for testing of the factors which may be limiting microbial activity, such as the availability of nutrients or the presence of potential toxicants. The ability to rapidly assess the physiological profile of a soil microbial community was one of the original intents of the CLPP approach, but the selective enrichment bias of the original plates severely limited the ability to interpret such responses. Results to date suggests that the new platform for the assay may allow for greater realization of the original intent, providing ecological insight into how soil microbial communities are poised to process various forms of carbon.

References

- Amann, R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59:143-169.
- Blanck H. 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in biotic communities. *Hum Ecol Risk Assess.* 8, 1003–1034.

- Bochner B.B., Savageau M.A. 1977. Generalized indicator plate for genetic, metabolic, and taxonomic studies with microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 33:434-444.
- Bochner B.R. 1989. Breathprints at the microbial level. *Am Soc Microbiol News.* 55: 536-539
- Borneman J. 1999. Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. *Appl Environ Microbiol.* 65:3398-3400.
- Brown A.L.P., Garland J.L., Day F.P. 2009. Physiological profiling of microbial communities in a Florida scrub-oak ecosystem: spatial distribution and nutrient limitations. *Microbiol Ecol.* 57:14-24.
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Duncan L.C. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance. *Soil Biol Biochem.* 33:1143-1153.
- Garland J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 24:289-300.
- Garland J.L., Lehman R.M. 1999. Dilution/Extinction of community phenotypic characters to estimate relative structural diversity in mixed communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 30:333-343.
- Garland J.L., Mills A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Appl Environ. Microbiol.* 57:2351-2359.
- Garland J.L., Roberts M.S., Levine L.H., Mills A.L. 2003. Community-level physiological profiling using an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. *Appl Environ Microbiol.* 69, 2994–2998.
- Garland J.L., Mackowiak C.L., Zabaloy M.C. 2010. Organic waste amendment effects on microbial activity in a corn-rye rotation: application of a new approach to community-level physiological profiling. 44:262-269.
- Konopka A., Oliver L., Turco R.F. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb Ecol.* 35:103-115.
- Lehman R.M., Colwell F.S., Ringelberg D.B., White D.C.1995. Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *J Microb Meth.* 22: 263-281.
- Mills A.L., Garland J.L. 2001. Application of physiological profiles to assess community properties, p 135-146. In Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.L., McInerney M.J., Stetzenback D.L. (ed.). *ASM Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C.

- O'Connell S.P., Garland J.L. 2002. Dissimilar response of microbial communities in Biolog GN and GN2 plates. *Soil Biol Biochem.* 34:413-416.
- Pace N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276:734-740.
- Reid B.J., MacLeod C.J.A., Lee P.H., Morriss A.W.J., Stokes J.D., Semple K.T. 2001. A simple ¹⁴C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. *FEMS Microbiol Lett.* 191:141-146.
- Sharvelle S.E., Garland J.L., Banks M.K. 2008. Biodegradation of polyalcohol ethoxlate by a wastewater microbial consortium. *Biodegradation* 19, 215–221.
- Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W.T., Forney L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 64:1220-1225.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol.* 67:4742-4751.
- Väisänen R.K., Roberts M.S., Garland J.L., Frey S.D., Dawson L.A. 2005. Physiological and molecular characterization of microbial communities associated with different water-stable aggregate size fractions. *Soil Biol Biochem.* 37: 2007–2016.
- Winding A., Hendriksen N.B. 1997. Biolog substrate utilization assay for metabolic fingerprints of soil bacteria: incubation effects, p. 195-205. In H. Insam and A. Ranggner (ed.), *Microbial Communities. Functional versus structural approaches.* Springer-Verlag KG Berlin, Berlin.
- Wodnicka M., Guarino R.D., Hemperly J.J., Thomas M.R., Stitt D., Pitner J.B. 2000. Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays. *J Biomol Screening.* 5:141-152.
- Yanni S.F., Whalen J.K., Simpson M.J., Janzen H.H. 2011. Plant lignin and nitrogen contents control carbon dioxide production and nitrogen mineralization in soils incubated with Bt and non-Bt corn residues. 43:63-69.
- Yin B., Crowley D., Sparovek G., De Melo W.J., Borneman J. 2000. Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. *Appl Environ Microbiol.* 66:4361-4365.
- Zabaloy M.C., Lehman R.M., Frey S.D., Garland J.L. 2008. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. *Soil Biol Biochem.* 40:2960-2969.

Zabaloy M.C., Garland J.L., Gómez M.A. 2010. Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil. *Appl Soil Ecol.* 46:240-246.

Capítulo 8

Bacterias solubilizadoras de fósforo como biofertilizantes: aislamiento, caracterización, diversidad y promoción del crecimiento vegetal

Phosphate solubilizing bacteria as biofertilizers: isolation, characterization, diversity and growth vegetable promotion

Leticia A. Fernández¹, Marcelo A. Sagardoy²

¹ Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, San Andrés 800 Altos del Palihue (8000) Bahía Blanca. ² Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, San Andrés 800 Altos del Palihue (8000) Bahía Blanca.
E-mail: fernandezletic@yahoo.com.ar

Introducción

La rizosfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde los organismos forman una comunidad única y de considerable potencial para su estudio y aplicación tecnológica. El conocimiento integral de la misma, es fundamental para la comprensión de distintos aspectos que se consideran pilares de la sustentabilidad agrícola y ambiental (García de Salamone, Cassán 2010). El proceso de solubilización de fósforo se presenta como uno de esos aspectos relevantes.

La habilidad de algunos microorganismos para convertir formas de fósforo insolubles de tal manera que se vuelvan accesibles por las raíces de las plantas y/o cultivos, es una propiedad importante del suelo y de la rizosfera. Esta capacidad es conocida como solubilización de fósforo y el número de bacterias con este potencial es mayor en la rizosfera que en el suelo propiamente dicho (Nobandegani 2008). Numerosos estudios han demostrado que este proceso aumenta la fertilidad del suelo proveyendo de fósforo disponible extra para las plantas y/o cultivos de interés agronómico, además de que tiene efectos importantes sobre otros nutrientes en el suelo, como por ejemplo el nitrógeno en la fijación biológica de nitrógeno (Rodríguez, Fraga 1999).

El objetivo de este capítulo es hacer una revisión que abarque los trabajos más actuales de una temática tan relevante como es el proceso de solubilización de fósforo inorgánico. De manera tal que, se comenzará con el ciclo de este

nutriente en el suelo, seguido de una profunda descripción de las bacterias solubilizadoras, su aislamiento, caracterización y una consideración de los mecanismos que les permiten la solubilización. Posteriormente, se explicarán las actividades de las PGPRs en el suelo y su potencial utilización como biofertilizantes para una agricultura sustentable. Cabe destacar, que en el capítulo se incluirán referencias sobre las distintas presentaciones realizadas durante el Taller Internacional de Rizosfera Biodiversidad y Agricultura Sustentable.

Disponibilidad de fósforo en el suelo

El fósforo (P) es uno de los elementos más importantes en la producción agrícola, ya que después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos y además, es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante en el suelo tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Alexander 1980).

El ciclo del P en los suelos representa sólo una parte del que cumple en la naturaleza (Figura 1). Las formas de P, con sus estados de oxidación de -3 a +5, son P soluble e insoluble. El P inorgánico soluble es la forma disponible para los vegetales, ya que estos absorben los aniones ortofosfato (predominantemente las formas iónicas, H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) desde la solución del suelo donde se encuentran a razón de 0,03 ppm y cuando un suelo es fertilizado esta concentración puede ascender a 3 ppm. Los aniones ortofosfato son rápidamente consumidos en las inmediaciones de las raíces, lo que generaría gradientes de concentración entre el suelo, la rizosfera y las superficies de las raíces. Sin embargo, para la mayoría de los suelos la tasa de difusión de estos aniones es insuficiente para generar gradientes localizados, lo cual limita la absorción de este nutriente (Richardson et al. 2009).

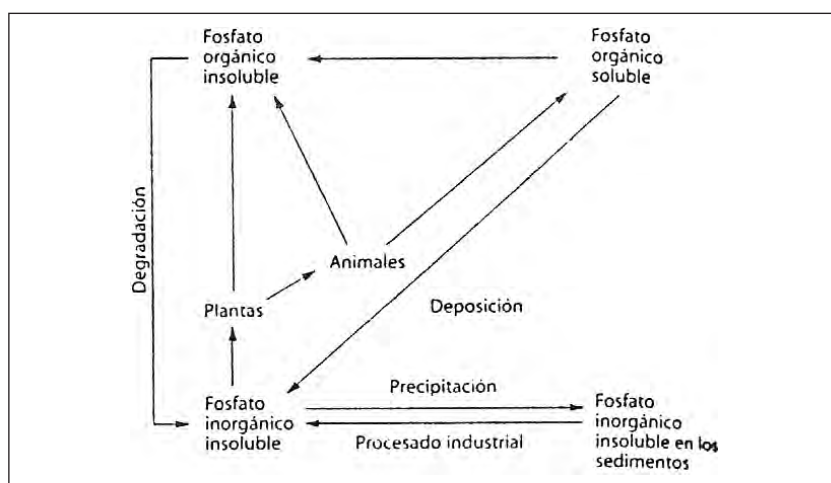


Figura 1: Ciclo del fósforo en la naturaleza (Atlas, Bartha 2002)

El P insoluble se divide en la fracción orgánica (Po) e inorgánica (Nahas 1991). Esta última, es la fracción involucrada en el proceso de solubilización, donde el fósforo insoluble inorgánico (Pi) se encuentra en el suelo como aniones de fosfato que son adsorbidos a los constituyentes del suelo. Las mayores reservas de Pi son las rocas y otros depósitos minerales, tales como apatita, hidroxiapatita y oxiapatita. Gran parte de los suelos agrícolas contienen importantes reservas de Pi, que se han ido incrementando debido a la aplicación de fertilizantes químicos (Rodríguez, Fraga 1999).

Los microorganismos y la disponibilidad de fósforo

Como habitantes de la rizosfera y del suelo, las bacterias y los hongos participan de una manera fundamental en la disponibilidad de P a las plantas. En la mayor parte de las transformaciones que ocurren en el ciclo del P, los microorganismos median las reacciones de transferencia de Po a Pi y de formas fosfatadas insolubles e inmovilizadas a formas solubles o compuestos móviles (Figura 2) (Richardson 2001, Richardson et al. 2009). Una de las principales transformaciones que producen es la inmovilización de P. Este proceso ocurre cuando los microorganismos hacen inaccesible el P para el resto de la comunidad biológica ya que lo asimilan para integrarlo a su biomasa. Las otras dos transformaciones son la mineralización de Po y la solubilización de Pi (Nahas 1991).

Los microorganismos solubilizadores de fósforo (PSM), son aquellos capaces de transformar P inorgánico insoluble en ortofosfato soluble, en una manera que contribuye significativamente al estado nutricional de una planta específica (Golstein, Krihinaraj 2007). Según Illmer y Schinner (1992), la solubilización por los microorganismos del suelo, objeto de esta revisión, es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de P disponible para las plantas.

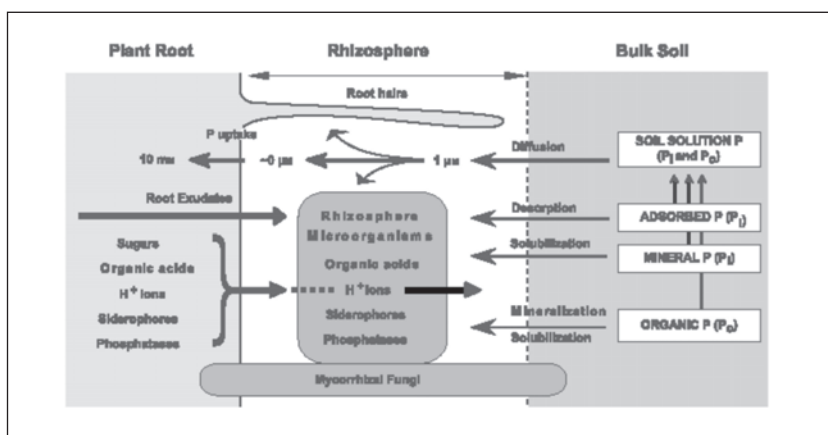


Figura 2: Representación esquemática de los procesos fisiológicos y químicos que influyen la disponibilidad de P en el suelo y en la rizosfera (Richardson 2001)

Solubilización de fósforo inorgánico: aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras

En el laboratorio, las bacterias solubilizadoras, crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (Alexander 1980).

El número de microorganismos solubilizadores puede constituir hasta un 40% de la población cultivable (Richardson 2001). Si bien parecería que la capacidad de solubilización está ampliamente extendida entre las bacterias, la descripción de organismos con esta capacidad se restringe a unos pocos géneros (Kämpfer 2007). Entre ellos se han aislado de distintos suelos bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Nahas 1996; Kumar et al. 2001).

Existen diferentes métodos para aislar del suelo microorganismos solubilizadores de Pi, que presentan sus ventajas y desventajas. Si bien se ha demostrado que la selección a partir de la formación del halo de solubilización no es una técnica infalible (Nautiyal 1999), tampoco la concentración de P detectada en cultivo líquido lo es (Rodríguez, Fraga, 1999). Gyaneshwar et al. (1998) demostraron que algunos microorganismos que solubilizan P en condiciones de laboratorio no son capaces de hacerlo en suelos vertisoles alcalinos. Esta incapacidad se debe posiblemente al alto poder de resistencia a los cambios de pH de los suelos alcalinos junto con la baja secreción de ácidos orgánicos que producen los microorganismos en esos ambientes. Gyaneshwar et al. (2002) determinaron que es mejor adoptar técnicas de selección de cepas a partir de ensayos que reflejen la capacidad amortiguadora de pH del suelo y por lo tanto serían válidos sólo aquellos métodos que incorporen soluciones tamponadas a los medios de cultivo. De todas maneras, sólo los ensayos de campo, establecerán si la capacidad solubilizadora de Pi de los organismos seleccionados *in vitro* realmente tiene efecto sobre plantas de interés comercial.

Son numerosos los grupos de investigadores y los trabajos que describen y resaltan la importancia de la solubilización de P, dedicándose principalmente al aislamiento, caracterización y estudio de las capacidades de solubilización en bacterias. Por ejemplo, en las proximidades de Aligarh (India) fueron identificadas a nivel de género, 72 bacterias aisladas de suelos rizosféricos y de nódulos radiculares. Los aislamientos fueron investigados en su capacidad para promover el desarrollo de plantas a través de la producción de IAA, amoniaco, HCN, sideróforos, solubilización de fosfatos y de su actividad antifúngica. Entre las bacterias identificadas, el 80% pertenecía al género *Bacillus* y tenía capacidad para solubilizar fosfato, seguido por *Azotobacter* (74,47%), *Pseudomonas* (55,56%) y *Mesorhizobium* (16,67%) (Farah

et al. 2008). Por su parte, Taurian et al. (2009) seleccionaron 37 aislamientos epifíticos y 73 endofíticos de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L) por su capacidad de solubilizar P en placa utilizando el medio NBRIP. Además, estudiaron la producción de sideróforos, de IAA, la inhibición de dos patógenos fúngicos de maní, *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* y la promoción del crecimiento en maní trabajando con condiciones controladas. Los resultados demostraron que 85 de los 110 aislamientos formaban un halo naranja, indicativo de la producción de sideróforos. Asimismo, nueve bacterias mostraron producción de IAA y otros 11 aislamientos poseían propiedades antibióticas contra los patógenos previamente mencionados. Estos investigadores identificaron el mejor aislamiento como *Pantoea agglomerans*. Por su parte, el trabajo de Malboobi et al. (2009) identificó los mejores aislamientos obtenidos de suelos alcalinos cultivados y no cultivados de Irán trabajando con la cuantificación de P soluble en el medio de Sperber. *Pantoea agglomerans*, *Microbacterium laevaniformans* y *Pseudomonas putida* solubilizaron entre 120 y 150 $\mu\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}$ de P soluble. Los resultados previamente descritos son comparables a los obtenidos por Fernández et al. (2005) trabajando con las cepas Per2F del género *Burkholderia* y la Per3G de *Enterobacter* aisladas de suelos cultivados con soja de Argentina. Estos autores cuantificaron entre 112 y 206 $\mu\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}$ de P soluble, trabajando con soluciones tamponadas. Finalmente, Deepa et al. (2010) estudiaron la eficacia de solubilización de P por aislamientos del género *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *E. asburiae*, obtenidos de suelos no rizosféricos de India. Realizaron ensayos de cuantificación de P soluble y de IAA en medio líquido así como estimaciones cualitativas de producción de sideróforos y de HCN. Los resultados demostraron que estas cepas solubilizaron entre 58,5 y 79,5 $\mu\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}\text{ día}^{-1}$ de P soluble.

Se ha demostrado que el prolongado repique de BSP puede producir en las mismas una rápida e irreversible pérdida de la habilidad para disolver fosfatos y que esa pérdida es más evidente en los aislamientos realizados desde el suelo que a partir de la rizosfera de plantas, principalmente si se trabaja con leguminosas (Paul, Sundara Rao 1971). En este sentido, Taurian et al. (2009), evaluaron la capacidad de solubilizar P luego de 8 repiques y observaron que el 93% de sus aislamientos mantenían esta capacidad.

Mecanismos y bases moleculares involucradas en el proceso de solubilización

El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander 1980). La secreción de los ácidos puede disolver directamente los fosfatos de origen mineral como resultado de un intercambio del anión ortofosfato por el anión del ácido. Sin embargo, también es posible que los ácidos se unan a los iones de hierro y aluminio que se encontraban

asociados a los fosfatos. Se han descripto distintos ácidos orgánicos producidos por los organismos solubilizadores de fosfato. Algunos de ellos son glucónico, acetato, lactato, oxalato, succinato, citrato, glicolato y gluconato, entre otros (Gyaneshwar et al. 2002). Goldstein (1999) trabajó en varias cepas de bacterias Gram negativas y demostró que el mecanismo implica la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico y luego a 2-ketoglucónico vía la enzima glucosa deshidrogenada que requiere el cofactor redox: pyrroloquinolina quinona. Como estas reacciones ocurren en el espacio periplásmico de la célula, por lo tanto el espacio extracelular se vuelve ácido. Asimismo, Chen et al. (2006) aislaron 36 bacterias solubilizadoras de fosfato de calcio de suelos de Taiwan, que pertenecían predominantemente a los géneros bacterianos *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* y *Serratia*. Estos autores mostraron que la propiedad de solubilización estaba asociada con la producción de ácidos orgánicos y con una disminución del pH del medio de cultivo utilizado en el estudio. El análisis de los ácidos orgánicos producidos por las bacterias estudiadas mediante la técnica de HPLC, detectó ocho ácidos orgánicos diferentes: cítrico, glucónico, láctico, succínico, propiónico y tres ácidos orgánicos no identificados. Por su parte, De Werra et al. (2009) trabajaron con *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y demostraron, trabajando con mutantes, que la capacidad de esta cepa de acidificar el medio y de solubilizar P mineral, dependía exclusivamente de la producción de ácido glucónico.

Se han observado otros posibles mecanismos que explicarían la solubilización de Pi. Estos incluyen la liberación de protones afuera de la célula y su intercambio con cationes que estén unidos al P. Otros implican la producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfhídrico, el ácido nítrico o el ácido carbónico. De todas formas, estos últimos han sido más cuestionados (Rodríguez, Fraga 1999; Nahas 1991).

Las bases genéticas de este proceso de solubilización aún no son claras. Como la producción de distintos ácidos estaría involucrada en la solubilización, cualquier gen que esté relacionado con la elaboración de ácidos podría tener que ver con el fenotipo solubilizador (Rodríguez, Fraga, 1999). Las investigaciones en este tema se han orientado al aislamiento de los genes de solubilización de Pi (*mpps*) y a la manipulación de los mismos, mediante la introducción y la sobreexpresión en bacterias que no posean esta capacidad (Rodríguez et al. 2007). Liu et al. (1992) clonaron un gen de *Erwinia hervicola* necesario para la producción de ácido glucónico en una cepa de *Escherichia coli* HB101. Como resultado de la incorporación de un plásmido con el gen de interés, aumentó la producción del ácido y como consecuencia, la solubilización de hidroxipatita por la bacteria en cuestión. Babu-Khan et al. (1995) clonaron el mismo gen en la misma cepa, pero el gen de interés era procedente de *Pseudomonas cepacia* E-37. Por otro lado, Buch et al. (2009) estudiaron el mecanismo de solubilización mediante la transformación de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Estos investigadores insertaron en la cepa mencionada

el plásmido pAB3 conteniendo el gen para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa que incrementa la cantidad de oxalacetato, un intermediario en la biosíntesis de ácidos orgánicos implicados en la solubilización de Pi. Los resultados demostraron que bajo condiciones de insuficiencia de P, la actividad enzimática se sobreexpresaba y aumentaba el catabolismo de la glucosa, aumentando las capacidades de solubilización de P.

El género *Bradyrhizobium* y la solubilización

Numerosos géneros bacterianos presentan capacidad para solubilizar y mineralizar P, pero es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que además realicen otras actividades, como por ejemplo fijar nitrógeno. La obtención de cepas de bradyrhizobios con doble función, permitiría la producción de biofertilizantes fosforados para las futuras generaciones que tendrán un doble compromiso: proteger el ambiente y alimentar a la población humana.

Los bradyrhizobios pueden mineralizar Po (Abd-Alla 1994) y poseen capacidad de solubilización de Pi (Halder, Chakrabartty 1993). Sin embargo, son pocos los trabajos que han estudiado este grupo bacteriano y su relación con la disponibilidad de P en el suelo (Abd-Alla 1994). En la bibliografía se describen experimentos en invernáculo con cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* como promotoras del crecimiento en plantas no leguminosas como por ejemplo en maíz y en lechuga (Chabot et al. 1996 a; b; Chabot et al., 1998) y en rabanito (Antoun et al. 1998). Existen algunos trabajos en leguminosas como la soja (Mikanová, Kubát 1997) y ensayos de inoculación de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con cepas solubilizadoras de Pi de otros géneros bacterianos (Rudresh et al. 2005; Gull et al. 2004). En la mayoría de estos trabajos, se observa una estimulación en el crecimiento y una mayor absorción de nutrientes por los cultivos así como en el número y en el peso de los nódulos y en la actividad de la enzima nitrogenasa responsable de la fijación de nitrógeno. Asimismo, existen trabajos que han demostrado una interacción sinérgica positiva entre la MA *Glomus mosseae*, la BSP *Enterobacter* sp. y *Rhizobium meliloti* (Barea et al. 2002). Por su parte, como se mencionó en un párrafo previo, Fernández et al. (2007) estudiaron la inoculación de BSP sobre el cultivo de soja trabajando en el invernáculo. Entre las bacterias se incluyó un aislamiento de *Bradyrhizobium* que presentó buenas capacidades de solubilización *in vitro* con respecto a otros aislamientos. Sin embargo, los resultados en planta no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación a un testigo sin inocular.

Las bacterias solubilizadoras y la promoción del crecimiento vegetal

Las asociaciones entre los microorganismos y las raíces en el suelo son muy complejas y pueden mejorar la adquisición de nutrientes por las plantas mediante

distintos mecanismos. Entre ellos se incluyen: i) un incremento en la superficie y longitud radicular, ii) una contribución directa mediante la disponibilidad de nutrientes, ya sea por fijación de nitrógeno o por estimulación y/o contribución con los procesos metabólicos que movilizan nutrientes desde fuentes inaccesibles y iii) a través de la biomasa microbiana (Figura 3) (Richardson et al. 2009).

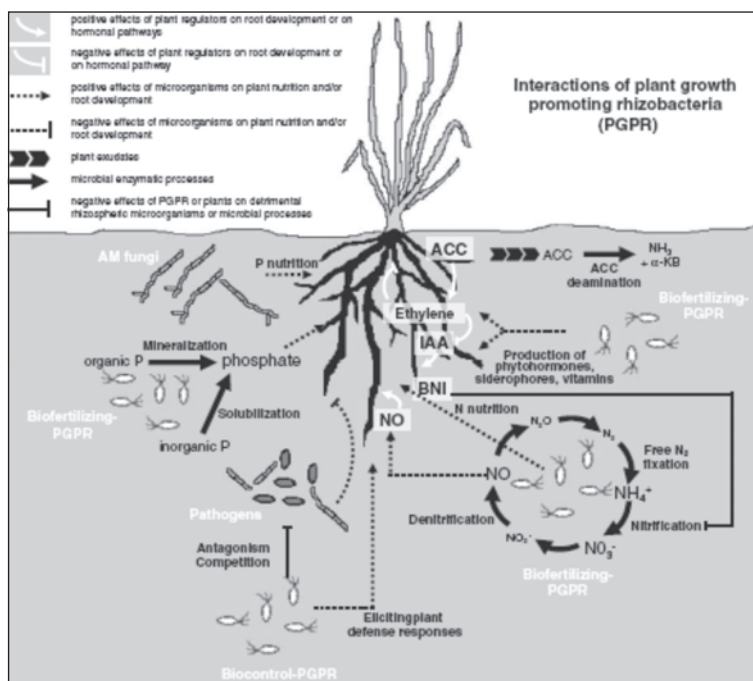


Figura 3: Mecanismos promotores del crecimiento y desarrollo vegetal (efectos directos e indirectos) asociados con el suelo y los microorganismos de la rizosfera (Richardson et al. 2009). Las PGPRs biofertilizantes y las micorrizas arbusculares (AM) estimulan la nutrición vegetal directamente incrementando el suministro de nutrientes a las plantas (por ejemplo mediante fijación biológica de N, solubilización de P_i, mineralización de P_o y la producción de vitaminas y de sideróforos; ó mejorando el acceso de las plantas a los nutrientes por incrementar la superficie y longitud radicular. Las PGPRs con funciones de biocontrol mejoran la salud de las plantas mediante la inhibición del crecimiento de organismos patógenos.

En este sentido, entre las bacterias que habitan en la rizosfera hay un grupo de particular importancia, ya que causa impactos benéficos en las plantas y son conocidas como PGPRs (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal). Las PGPRs colonizan las raíces y estimulan el crecimiento vegetal mediante el biocontrol (efecto indirecto) y la biofertilización (efecto

directo) (Richardson et al. 2007). Como parte de la biofertilización, se incluye el proceso de solubilización de P_i .

Los efectos benéficos de la inoculación con BSP sobre numerosos cultivos son bien conocidos y han sido descriptos por numerosos autores (Igual, Rodríguez-Barrueco 2007). Sin embargo, los resultados no siempre son consistentes, a veces resultan contradictorios, observándose diferencias entre investigadores y entre los ensayos realizados en el laboratorio y los resultados obtenidos en el campo y/o invernáculo. Fernández et al. (2007) estudiaron la inoculación de BSP sobre el cultivo de soja trabajando en el invernáculo. Las plantas que se habían inoculado con la cepa Per2F del género *Burkholderia* presentaron mayor altura y una mejor relación N/P. Sin embargo, ninguna de las cepas estudiadas, solubilizadoras de P *in vitro*, incrementaron el P absorbido por el cultivo, lo cual estaría indicando que la inoculación de BSP no necesariamente promueve y/o mejora la nutrición fosforada. Por su parte, Afzal y Asghari (2008) estudiando en Pakistán la combinación que podía existir entre un fertilizante fosforado y bacterias aisladas del suelo, demostraron que la inoculación de trigo (*Triticum aestivum* L.) fertilizado con P más el agregado de *Rhizobium* y una bacteria solubilizadora de P podía incrementar la producción del cereal en un 29% respecto al control no inoculado. Los autores concluyen que cuando se aplica esa técnica dual es necesario el agregado de fertilizaciones reducidas de P para lograr incrementos significativos en la producción de granos de trigo. Además, proponen que los rizobios agregados a no leguminosas podrían actuar también como organismos solubilizadores de fosfatos y productores de hormonas vegetales. En China, Chen et al. (2008) trabajando con una fosfobacteria Gram positiva esporulada, observaron bajo condiciones controladas que la liberación de fósforo soluble que producía esa bacteria, se incrementaba con el aumento de fosfatos al medio de cultivo, entre un rango de 0,12-4% (p/v), y que los valores máximos se lograban a los 7 días de incubación. Además, los autores detectaron una correlación positiva ($r = 0,93$) entre el nivel de fósforo soluble obtenido en el medio y la concentración de células vivas de la fosfobacteria investigada. Resultados por demás interesantes cuando se piensa que esa bacteria podría ser utilizada para producir un inoculante que ayude a movilizar P de un suelo.

PGPRS en agricultura sostenible: los biofertilizantes

Si bien la utilización de fertilizantes fosforados es obviamente el mejor método para cubrir el déficit de P en la producción sustentable, su uso está siempre limitado por la espiral de los costos. En la actualidad, un alto interés se ha generado en la búsqueda de tecnologías que podrían proveer de suficiente P a las plantas y así poder reducir la costosa dependencia que tienen los productores agrícolas en buena parte del mundo (Zaidi et al. 2009). Como consecuencia, surgen las PGPRs como una alternativa fundamental para la agricultura sostenible. Las PGPRs son aplicadas como tratamiento a la semilla,

e inmediatamente después de sembrar se multiplican y colonizan el sistema radicular. Las industrias emergentes que elaboran productos basados en PGPRs pertenecen a la categoría de biofertilizantes (Kloepper 2010).

Entre las bacterias más empleadas en los biofertilizantes se encuentran las BSP que son considerados los inoculantes más prometedores. Si bien numerosos autores reportan una promoción del crecimiento vegetal gracias a los microorganismos solubilizadores de P, un incremento en la producción no siempre está asociado a un aumento en la absorción de P. Numerosos son los motivos. Algunas de las razones podrían ser: supervivencia y colonización por parte de las cepas inoculadas, competencia con microorganismos nativos, naturaleza y propiedades del suelo y de los cultivos, falta de nutrientes en la rizosfera que permitan la producción de ácidos orgánicos y posiblemente la falta de una asociación simbiótica que le provee suficientes compuestos carbonados para permitir la movilización (Deubel, Merbach 2005). Penna (2010) plantea acertadamente, que la mayor parte de los trabajos publicados basan su análisis en microorganismos cultivados en laboratorio y cosechados en fase exponencial para ser aplicados en plántulas que crecen en medios sintéticos en condiciones controladas. Sin embargo, las formulaciones corrientemente conocidas como inoculantes se aplican luego de meses de ser producidos tras un largo período de almacenamiento con los microorganismos en una larga fase estacionaria o en una fase de muerte.

Existen en el país distintas redes aplicadas al estudio de la rizosfera que han surgido ante la creciente demanda de nuevas tecnologías para mejorar la productividad reduciendo los riesgos ambientales (Toresani et al. 2010). Por ejemplo, la REDCAI (Red de Control de Calidad de Inoculantes), tiene como misión la creación de un espacio nacional de participación de profesionales que se desempeñen en el área de evaluación inoculantes. En el año 2003 se creó la red de biofertilización iberoamericana denominada BIOFAG (Fertilizantes Biológicos para la Agricultura y el Medio Ambiente). Esta es una red cuyo objetivo central ha sido la promoción de la investigación, desarrollo y aplicación de fertilizantes biológicos de máxima calidad (Lagares 2010). DIMAGRI es otra red compuesta por investigadores de la Argentina, Brasil, Colombia, España, Guatemala, México y Uruguay. Los investigadores que componen esta red proponen el estudio de diferentes aspectos relacionados con los microorganismos asociados a las raíces de cultivos de interés agronómico y del suelo circundante (Teixeira 2010).

Conclusiones

La adquisición de nutrientes como el P desde el suelo, es un proceso gobernado por el desarrollo de las raíces y su interacción con los componentes abióticos y bióticos (Richardson et al. 2009). Dentro de estos últimos, los microorganismos y más precisamente, las bacterias solubilizadoras de P, objeto de esta revisión, son un componente fundamental de la agricultura sostenible.

El entendimiento más claro y preciso de la diversidad, estructura y funcionamiento de estas bacterias, permitirá mejorar el desarrollo de tecnologías que posibiliten la aplicación de las mismas como biofertilizantes.

En la actualidad, son necesarios los resultados consistentes por parte de toda la comunidad científica y los trabajos interdisciplinarios, donde biólogos, microbiólogos, biotecnólogos y agrónomos, sean capaces de explicar el fenómeno complejo de la solubilización de Pi por las bacterias asociadas a las raíces de las plantas.

Bibliografía

- Abd-Alla M.H. 1994. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*, Biol Fertil Soils. 18:216-218.
- Afzal A., Asghari B. 2008. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). Int J Agr Biol. 10: 85-88.
- Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editorial S.A. México. pp. 380
- Atlas R., Bartha R. 2002 Ciclos biogeoquímicos: nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y otros elementos. En: Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Edición. Pearson Educación SA, Madrid España. pp. 412 - 434.
- Babu-Khan S., Yeo T.C., Martin W.L., Duron M.R., Rogers R.D., Goldstein A.H. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. Appl Environ Microbiol. 61:972-978.
- Barea J.M., Toro M., Orozco M.O., Campos E., Azcón R. 2002. The application of isotopic (^{32}P and ^{15}N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. Nut Cyc Agroecos. 63:35-42.
- Buch A., Archana G., Kumar N. 2009. Heterologous expresión of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield. Bioresour Technol. 101:679-687.
- Chabot R., Antoun H., Cescas M.P. 1996a. Growth promotion of maize and lettuce by PS *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Plant Soil. 184:311-321.
- Chabot R., Antoun H., Kloepper J.W., Beauchamp C.J. 1996b. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Appl Environ Microbiol. 62:2767-2772.

- Chabot R., Beauchamp C.J., Kloepper J.W., Antoun H. 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of PS *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Soil Biol Biochem. 30:1615-1618.
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol. 34:33-41.
- Chen Z., Shengwu M., Lily L. 2008. Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. Bioresour Technol. 99: 6702-6707.
- De Werra P., Pechy Tarr M., Keel C., Maurhofer M. 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Appl Environ Microbiol. 75:4162-4174.
- Deepa Devi S., Oinam G., Devi Th. Indrama, Singh O. Avijeet, Tiwari O.N., Sharma G.D. 2010. Ecology and biodiversity analysis of cyanobacteria. Biol Environ Sci. 5:6-13.
- Deubel A., Merbach W. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. En: Microorganisms in soil: roles in genesis and function. Cap 9. pp. 176-179
- Farah A., Iqbal A., Khan M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res. 163:173-181.
- Fernández L.A., Zalba P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. 2007. Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. Bio Fertil Soils. 43(6):805-809.
- Fernández L.A., Zalba P., Gómez M.A., Sagardoy M.A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera, CI del suelo. 23(1):31-37.
- García de Salamone I., Casán F.D. 2010. Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable TIRBAS-2010. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. pp 67.
- Golstein A.H., Krihnaraj P.U. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms vs phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait? Developments in plant and soil science. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization.
- Gull M., Hafeez F.Y., Saleem M., Malik K.A. 2004. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilizing bacteria and a mixed rhizobial culture. Aust J Exp Agric. 44:623-628.
- Gyaneshwar P., Naresh K.G., Parekh L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. World J Microbiol Biotech. 14:669-673.

- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L.J., Poole P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. 245:83-93.
- Halder A.K., Chakrabartty P.K. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.
- Igual J.M., Rodríguez-Barrueco C. 2007. Fertilizers food and environment Developments in plant and soil science. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp. 199-202.
- Illmer P., Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol Biochem.* 24:389-395.
- Kämpfer P. 2007. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria, Developments in plant and soil science. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. pp. 11-115.
- Kloepper J. 2010 Libro de resúmenes TIRBAS Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable TIRBAS-2010. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires.
- Kumar V., Rishi Kumar R.B., Narula N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol Res.* 156:87-93.
- Lagares A. 2010. BIOFAG una red para la promoción de la Investigación, desarrollo y uso normalizado de biofertilizantes para la agricultura en Iberoamérica. Editores García de Salamone I., Casán F.D. Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable TIRBAS-2010. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. pp. 63.
- Liu S., Lee L., Tai C., Hung C., Cahng Y., Wolfram J.H., Rogers R., Goldstein A.H. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinine. *J Bacteriol.* 174:5814-5819.
- Malboobi M.A., Owlia P., Behdahaani M., Sarokhani E., Moradi S., Yakhchali B. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by highly efficient soil bacterial isolates. *World J Microbiol Biotech.* 25:1471-1477.
- Mikanová O., Kubát J. 1994. Inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains with different P-solubilizing activity and its effect on soybean yields. *Sci Agriculture Bohemica.* 63-66.
- Mikanová O., Kubát J. 1999. Practical use of the P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostl Vyr.* 45:407-409.

- Nahas E. 1991. Ciclo do fósforo: transformacoes microbianas. FCAV UNESP Jaboticabal, Brasil. pp. 67.
- Nahas E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World J Microbiol Biotech.* 12:567-572.
- Nautiyal C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 170:265-270.
- Nobandegani M.B. 2008. Distribution and biochemical and genotypic comparison of phosphate solubilizing bacteria in oil palm soils. Masters Thesis, Universiti Putra, Malaysia.
- Paul N.B., Sundara Rao W.V.B. 1971. Phosphate –dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant Soil* 35: 127-132.
- Penna C.A. 2010. Aspectos básicos y aplicados de la producción y utilización de formulaciones a base de microorganismos en agricultura. Editores García de Salamone I., Casán F.D. Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable TIRBAS-2010. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. pp. 57.
- Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. 2007. Genetics of phosphate solubilization and its potencial applications for improving plant growth promoting bacteria. *Developments in plant and soil science. First International meeting on microbial phosphate solubilization.* 15-21.
- Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech Adv.* 17:319-339.
- Rudresh D.L., Shivaprakash M.K., Prasad R.D. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Appl Soil Ecol.* 28:139-146.
- Taurian T., Anzuay M.S., Angelini J.G., Tonelli M.L., Luducña L., Pena D., Ibañez F., Fabra A. 2009. Phosphate solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth promoting activities. *Pant Soil.* 329:421-431.
- Toresani S. 2010. Red Argentina de calidad de inoculantes: una experiencia Interlab. Editores García de Salamone I., Casán F.D. Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable TIRBAS-2010. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. pp. 61.
- Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M., Oves M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 56: 263-284.

Capítulo 9

Investigación aplicada en *Azotobacter* sp. dirigida a la promoción de crecimiento en cultivos de interés económico en Colombia

Azotobacter sp. applied research aimed to growth promotion of crops with economics interest in Colombia

Ruth Rebeca Bonilla¹, René Novo², Belisario Roncallo³, Mauricio Camelo¹, Paola Criollo¹, Germán Andrés Estrada⁴, María Fernanda Garrido¹, Mónica López¹, Andrés Eduardo Moreno¹, Melissa Obando¹, Lorena Parra¹, Diego Mauricio Rivera¹, Daniel Fernando Rojas¹, Mario Van Strahlen⁵, Corina Zambrano⁶

¹Laboratorio de Microbiología de Suelos, Corpoica. ²Universidad de la Habana, Cuba.

³Estación Experimental Motilonia, Corpoica. ⁴Embrapa Agrobiología, Brasil. ⁵Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. ⁶Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. E-mail: rbonilla@corpoica.org.co

Introducción

El uso excesivo de fertilizantes de síntesis química se hace insostenible para cualquier práctica agrícola tanto a nivel económico como ecológico. Aún así, el uso de fuentes químicas ha incrementado la producción agrícola (Johnson et al. 2001), pero con costos irre recuperables (García-Agustín et al. 2004). Su aplicación ha provocado numerosos efectos negativos sobre el medio ambiente, tales como acumulación de nitratos en aguas subterráneas (Johnson, Kross 1990; Smith et al. 1994; Halwani et al. 1999; Suthar et al. 2009), toxicidad en plantas por altos niveles de nitritos (Bancroft et al. 1979) y en general, alteración de las interacciones biológicas y químicas del suelo (Mirlean et al. 2008). Por estas razones se considera que la incorporación de prácticas sostenibles en la agricultura moderna puede generar beneficios ambientales importantes y su aplicación cada vez es más necesaria.

Diversas estrategias se han planteado como alternativa de enmienda, dentro de las cuales reviste gran importancia el uso de microorganismos eficientes en la promoción del crecimiento vegetal como herramienta de biofertilización (Raupach, Kloepper 1998; Adesemoye et al. 2008, 2009). Estos, son un componente natural del suelo y debido a su rol en el ciclaje de nutrientes y en la síntesis de ciertos metabolitos, pueden incrementar su fertilidad y productividad (Adesemoye et al. 2009).

La presencia de microorganismos benéficos asociados a cultivos de interés económico es determinante, debido a que contribuyen con el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la producción y solubilización de sustancias fisiológicamente activas, el establecimiento y la aceleración de procesos bioquímicos, lo cual está asociado con un incremento en la productividad de los cultivos (Yan et al. 2002; Kloepper et al. 2004; Ryu et al. 2007; Dutta, Podile 2010).

El género *Azotobacter* sp. es uno de los géneros bacterianos que ha sido utilizado y estudiado en la agricultura, especialmente la especie *A. vinelandii* (Katznelson, Strzelczyk 1961; Bishop et al. 1980, 1982; Chisnell et al. 1988; Premakumar et al. 1998); aunque es cosmopolita, está ampliamente distribuido y ha sido encontrado predominantemente en algunos suelos tropicales que se caracterizan por poseer contenidos medios de materia orgánica, fosfatos y valores de pH cercanos a la neutralidad (Novo, Bonilla 1998; Kumar et al. 2007; Bhatia et al. 2008). Las bacterias de este género tienen varias actividades metabólicas de interés como: fijación de nitrógeno de vida libre (Benemann et al. 1972; Eady, 1995; Fisher et al. 2000b, a; Kizilkaya, 2009), solubilización de fósforo (Garg et al. 2001), producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Tserkovniak et al. 2009) y degradación de hidrocarburos (Saha et al. 2007; Juarez et al. 2008).

Basados en estas consideraciones, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), ha focalizado parte de sus trabajos en la investigación básica y aplicada de este microorganismo, en particular, con la especie *Azotobacter chroococcum*. En este sentido, se han adelantado procesos de evaluación dirigidos a determinar su potencial como herramienta biotecnológica para incorporarla en sistemas de agricultura sostenible en Colombia. Aspectos relevantes relacionados con diversas experiencias de campo con *Azotobacter chroococcum* y el desarrollo de un biofertilizante basado en este microorganismo serán descritos y discutidos en el presente documento.

Monibac®: Un biofertilizante con base en una cepa nativa de *Azotobacter chroococcum* para incrementar la productividad y sostenibilidad de los cultivos de algodón, pastos, ají y tomate

La utilización de microorganismos capaces de intervenir directamente sobre los ciclos biogeoquímicos, se ha propuesto como una alternativa para reducir el impacto generado por los problemas actuales de contaminación derivados de la fertilización química (Kang et al. 2010). Utilizar biofertilizantes en los sistemas productivos se convierte en una opción sostenible viable para incorporar en sistemas agrícolas de producción.

Desarrollo del producto Monibac®

1. Aislamiento, caracterización y selección de cepas

El proceso de aislamiento de *Azotobacter* sp. se desarrolló en el laboratorio de la Estación Experimental Motilonia de Corpoica, localizada en Agustín Codazzi,

Cesar, Colombia. Las muestras de suelo rizosférico fueron obtenidas de cultivos de algodón, ubicados en tres localidades de la Región Caribe Colombiana: Agustín Codazzi (Cesar), Riohacha (La Guajira) y Montería (Córdoba). Estos suelos presentaron un pH entre 6,0 y 7,3, bajos contenidos de materia orgánica (entre 1,0 y 1,5%) y textura franco arcillosa (Novo, Bonilla 1998).

El aislamiento se llevó a cabo mediante la técnica de gránulos de suelo en medio de cultivo Ashby (Beliakov 1957), modificada por Novo y Bonilla (1998) y fueron analizadas cinco placas por muestra, colocando 20 granos de suelo en cada una; la temperatura de incubación fue de 30° C hasta la aparición de colonias típicas de *Azotobacter*. Se realizaron pases sucesivos en medio de cultivo Ashby hasta obtener un cultivo puro con presencia de pigmentos característicos de cada una de las especies; estos cultivos se observaron mediante la coloración de Gram, identificando las características propias para la familia Azotobacteraceae (Dworkin et al. 2006), correspondiente a bacilos pleomórficos Gram negativos que a las 72 horas de incubación, presentan la formación de quistes (Bonilla, Morales 2006). La purificación bioquímica se realizó mediante el empleo de medio de cultivo Ashby y benzoato de sodio como fuente de carbono (Dworkin et al. 2006).

2. Selección de cepas eficientes

El proceso de selección de cepas eficiente se centró en el desarrollo de un inoculante biológico que permitiera aumentar la productividad del cultivo del algodón, disminuir el impacto de la fertilización química y reducir los costos de producción. Se evaluó la capacidad de las cepas AC1, AC2 y AC3 de *A. chroococcum* para promover el crecimiento de cuatro especies vegetales: algodón (*Gossypium hirsutum*), sorgo (*Sorghum vulgare*), maíz (*Zea mays*) y frijol caupí o capezuna (*Vigna unguiculata*). Se emplearon como criterios de selección la disminución de los tiempos de germinación y la productividad de las plantas. Los resultados obtenidos evidenciaron que todas las cepas evaluadas fueron capaces de reducir los tiempos de germinación sobre todas las especies vegetales (Figura 1), en particular, la cepa AC1 redujo los tiempos de germinación con respecto al control sin inocular en 45, 23, 43 y 44% para algodón, sorgo, maíz y frijol caupí, respectivamente. Las cepas AC2 y AC3 también mostraron un efecto significativo positivo sobre los tiempos de germinación, no obstante, éste no se reflejó sobre todas las especies vegetales de estudio.

A continuación, se evaluó el efecto de la inoculación con las cepas de estudio sobre la productividad de las especies vegetales seleccionadas. Todas las cepas fueron capaces de aumentar el contenido de materia seca (Figura 2) en algodón (*Gossypium hirsutum*), sorgo (*Sorghum vulgare*), maíz (*Zea mays*) y Caupí (*Vigna unguiculata*). En particular, las cepas presentaron una tasa de incremento más amplia sobre el maíz donde los incrementos fueron frente al control de 100, 197 y 202% para AC1, AC2 y AC3, respectivamente, que sobre las otras especies vegetales donde los incrementos fueron de 113, 55 y 107% para capezuna o frijol caupí, 45, 63 y 46% para algodón, y 43, 0 y 50% para sorgo, respectivamente. Este efecto suele estar asociado a las capacidades de promoción vegetal propias del género en estudio (Kizilkaya, 2008; Kizilkaya,

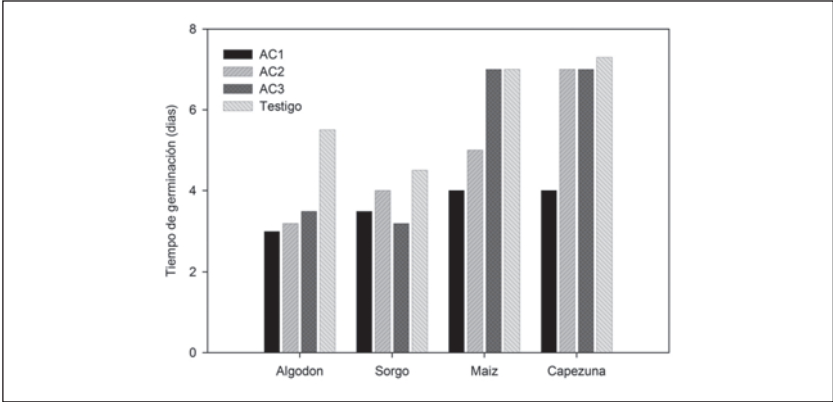


Figura 1: Efecto de *A. chroococcum*, sobre la germinación de cuatro especies vegetales.

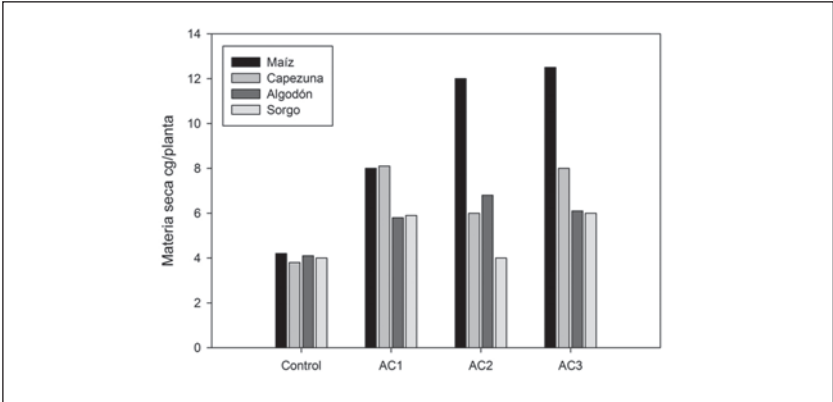


Figura 2: Efecto de la inoculación de *A. chroococcum* sobre el contenido de materia seca.

2009). Se afirma que la capacidad de ciertos géneros bacterianos como *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. o *Burkholderia* sp. para aumentar la disponibilidad de elementos como nitrógeno y fósforo pueden repercutir de forma directa y significativa sobre el crecimiento y desarrollo de ciertas especies vegetales. Adicionalmente, la síntesis bacteriana de compuestos reguladores del crecimiento vegetal también pueden influir sobre el desarrollo de las plantas, incrementando su crecimiento y en consecuencia su productividad. La cepa AC1 mostró ser la mejor sobre el desarrollo del cultivo de algodón ya que no sólo redujo los tiempos de germinación, sino que además, dio lugar a un aumento en el contenido de materia seca de la planta lo cual se refleja en un mayor tamaño de la misma y en un mayor índice de ingresos económicos para los pequeños productores, de modo que el proceso de desarrollo del inoculante

se continuaría empleando la cepa AC1, pero en primer lugar sería necesario definir como se realizaría el proceso de inoculación para estudiar su eficiencia como posible bioinoculante (Bonilla, Morales 2006).

Las cuatro especies evaluadas en este experimento representan especies agrícolas de importancia económica de la región Caribe colombiana. Los logros obtenidos en la biofertilización abre las puertas a la utilización de estrategias de fertilización amigables con el medio ambiente y que pueden generar un impacto directo sobre la productividad de los cultivos y a su vez, sobre la calidad de vida de los agricultores. Después de seleccionado el microorganismo, las actividades de investigación giraron en torno de la búsqueda de un soporte que permitiera la aplicación fácil del producto y su comercialización.

1.2. Formulación y pruebas de eficiencia en el cultivo de algodón

Se evaluaron dos soportes sólidos: la turba y la cachaza suplementada. Después, se verificó el crecimiento del microorganismo y se realizó la incubación de los productos para la obtención de las concentraciones adecuadas ($\geq 1 \times 10^8$ UFC g⁻¹). A través del tiempo se realizaron análisis de control de calidad cada 15 días, durante 3 meses. Se verificó la viabilidad del microorganismo durante los 90 días mediante la técnica de dilución decimal y recuento en placa. Los resultados evidenciaron que ambos sustratos preservaron la viabilidad celular en condiciones de refrigeración, demostrando que los dos soportes resultaban adecuados para el mantenimiento del inoculante biológico basado en la cepa AC1 de *A. chroococcum*. El efecto de ésta cepa sobre la productividad del cultivo del algodón en las dos formulaciones previamente descritas, con adición de 25 kg de nitrógeno, se corrobora al comparar los rendimientos en las pruebas de eficiencia de Monibac® en condiciones de campo (Figura 3).

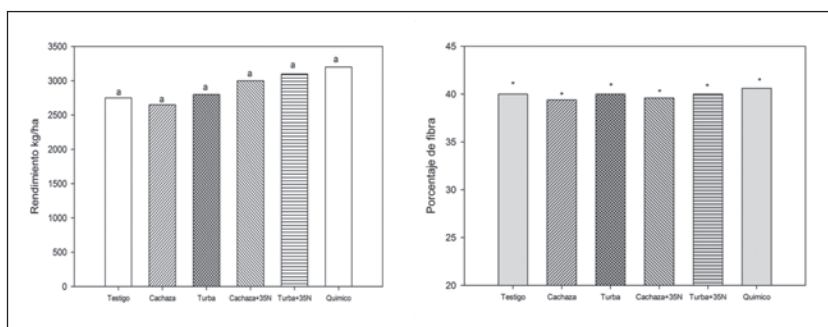


Figura 3: Pruebas de eficiencia de Monibac® sobre el cultivo del algodón. Rendimiento de algodón semilla y porcentaje de fibra obtenidos.

Los resultados revelan que en los tratamientos en donde se realizó inoculación con el biofertilizante se obtuvieron mayores producciones de algodón semilla, siendo superiores en un 18,8% respecto al testigo. El efecto de la inoculación del microorganismo sobre el crecimiento de la planta no se vio afectado por el tipo de soporte empleado. Las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($P>0,05$), sin embargo, se observó una tendencia de incremento en la producción de algodón semilla en las plantas inoculadas con soportes sólidos y líquidos con respecto al testigo. No obstante, debido a la mayor disponibilidad de la turba en el mercado y a que no hubo diferencias significativas sobre la eficiencia del cultivo del algodón cuando se emplearon los dos soportes, esta fue seleccionada para estudios posteriores. El empleo del biofertilizante no incidió en la calidad de la semilla (Bonilla, Morales 2006).

3. Evaluación de la capacidad promotora de crecimiento vegetal

La especie *Azotobacter chroococcum* posee una amplia diversidad metabólica (Chakraborty et al. 2002; Bonartseva et al. 2003; Gradova et al. 2003; Saha and Paul, 2005; Saha et al. 2007; Juárez et al. 2008). Dentro de las características más relevantes está su capacidad para promover el crecimiento vegetal (Katznelson, Strzelczyk 1961; Azcón, Barea 1975). Esto, debido a que cuenta con ciertas habilidades para mejorar la disponibilidad de nutrientes en suelo o a la producción de ciertos metabolitos que pueden influir directamente sobre el desarrollo de ciertas especies vegetales (Azcón, Barea 1975). Algunos de estos mecanismos de acción son: la solubilización de fósforo, la fijación biológica de nitrógeno o la producción de compuestos tipo indoles, entre otros. Con el objetivo de caracterizar estas capacidades microbianas, se llevaron a cabo diversos experimentos en condiciones de laboratorio.

3.1. Solubilización de fósforo

En la evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*, se empleó el medio de cultivo líquido SRSM suplementado con fosfato tri-cálcico. El medio de cultivo fue inoculado con una suspensión celular de AC1 ajustada a una $OD_{600} = 0,5$. El cultivo se incubó durante doce días a 28° C y 150 rpm., de acuerdo a la metodología desarrollada por (Caballero et al. 2007) para la cuantificación del fósforo disponible con la técnica de azul de fosfomolibdeno. En los resultados se observa que en el medio de cultivo líquido SRSM, la cepa AC1 liberó 212 ppm de PO_4^{3-} con un pH final de 4,48. Rajkumar et al. (2006), reportaron una solubilización de fósforo de 380 y 300 ppm para las cepas *Pseudomonas* sp. PsA4 y *Bacillus* sp. Ba32, respectivamente, bajo las mismas condiciones. Mientras que Ma et al. (2008) reportaron datos de solubilización de tan solo 90 ppm después de 7 días de incubación, lo que es significativamente menor a lo obtenido por la cepa

AC1, mientras que el valor de AC1 es menor a lo reportado para las cepas PsA4 y Ba32. A pesar que el género *Azotobacter* no ha sido ampliamente reportado como solubilizador de fosfatos, los valores obtenidos estuvieron acorde con lo reportado por varios autores (Chen et al. 2005; Rajkumar et al. 2006). También se aplicó el método del *p*-nitrofenilfosfato (Caballero et al. 2007) con el fin de determinar la presencia de la enzima fosfatasa en la cepa AC1 de *A. chroococcum*; sin embargo, no hubo evidencia de la presencia de esta enzima encargada de la mineralización de fósforo orgánico.

3.2. Determinación de compuestos indólicos totales

Con el objetivo de cuantificar la producción de compuestos indólicos de la cepa AC1 se empleó la técnica de Salkowsky modificada (Glickmann, Dessaux 1995) en el medio de cultivo K-lactato suplementado con 100 ppm de triptófano (Carreno-Lopez et al. 2000). La cepa AC1 produjo 18,23 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de indoles totales después de seis días de incubación, lo cual evidencia que la producción de indoles suele estar asociada con la fase estacionaria del microorganismo. La curva de calibración fue realizada empleando ácido indol-3-acético (AIA) (Glickmann, Dessaux 1995). Estos resultados pueden ser comparados con varios autores quienes reportan cantidades comparables de indoles totales (Rajkumar, Freitas 2008; Ma et al. 2009) Rajkumar et al. (2006) reportó producción de indoles sobre medio de cultivo LB suplementado con 500 ppm de triptófano en medio de 6,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ luego de 36 horas de incubación, lo que resultó ser bajo comparado con lo obtenido para la cepa AC1 puesto que el medio empleado solo contenía 100 ppm de triptófano.

3.3. Fijación biológica nitrógeno

Para la cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno, se aplicó la técnica de reducción de acetileno (ARA) mediante cromatografía de gases (Caballero-Mellado et al. 2007), determinada en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 3920B con detector de ionización de llama y una columna Poropak N 200/300 Mesh de 6 pies y 3 mm de diámetro. La cepa AC1 fue capaz de reducir acetileno a etileno, produciendo 736 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, lo cual confirmó la capacidad de la cepa de reducir nitrógeno molecular a amonio. De acuerdo a los resultados obtenidos, existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre AC1 y las demás cepas analizadas (datos no mostrados).

4. Pruebas de eficiencia sobre otros cultivos de interés económico

4.1 Prueba de eficacia de Monibac® en ají (*Capsicum* sp.)

El cultivo de hortalizas en ciertas áreas de la región Caribe representa una importante fuente de ingreso para el pequeño productor. En consecuencia, la disminución en los costos de producción provenientes de la aplicación de

fertilizantes químicos resulta una necesidad prioritaria para el mejoramiento de sus ingresos. El experimento consistió en evaluar el efecto de la aplicación del bioinoculante Monibac® sobre las variedades de ají chino y topito (*Capsicum* sp.).

Le evaluación se realizó en la Estación Experimental Caribia (Sevilla, Magdalena) y en la finca Buenavista (Santa Marta, Magdalena). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro tratamientos y tres replicas, distribuidos de la siguiente manera: T1) testigo absoluto (sin fertilización), T2) Monibac®, T3) Monibac® + 1/3 de la fertilización química y T4) testigo completo (fertilización química completa: 75 kg N/ha), tomando como referente para la fertilización química los análisis químicos del suelo. Los resultados fueron similares en ambas variedades. La calidad del fruto fue similar entre tratamientos, mientras que el rendimiento en kg de fruto/ha disminuyó para T1, y no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) entre los tratamientos T2, T3 y T4. La aplicación de Monibac® permitió reducir la fertilización química. Los resultados mostraron una disminución de 13% y 15% en el rendimiento cuando la fertilización biológica no se complementó con la química, por lo tanto, no se puede suplir completamente la aplicación de fertilizantes de síntesis y se recomienda la aplicación de 50% de la fertilización química y Monibac®.

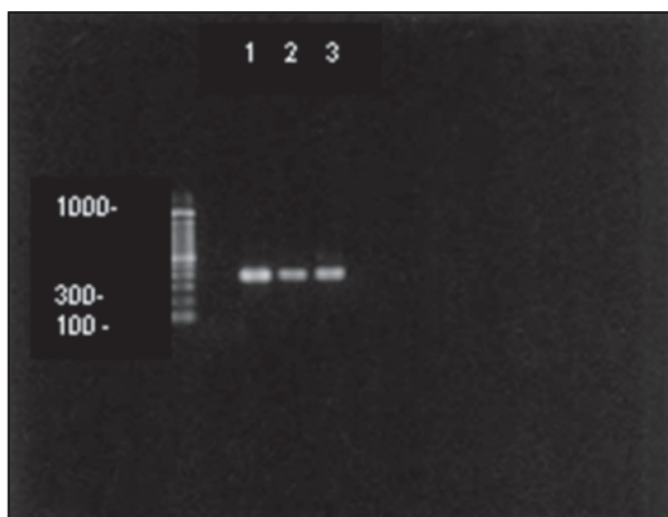


Figura 4: Producto de PCR con primers específicos para el gen *nifH*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb a 1000 pb. 2) *A. chroococcum* AC1. 3) *A. vinelandii* AV5.

4.2 Prueba de eficacia de Monibac® en lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Al igual que en la costa Atlántica colombiana, la sabana de Bogotá, D.C., también representa un gran potencial para la producción masiva de hortalizas, donde reviste gran interés la lechuga en la canasta familiar. La investigación

se realizó en el Centro de Investigación Tibaitatá de Corpoica (Mosquera, Cundinamarca) con el propósito de evaluar el efecto de la aplicación de Monibac® en la reducción de la fertilización química nitrogenada. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: T1) sin fertilización, T2) aplicación de Monibac® y re-inoculación a los 20 días, T3) aplicación de Monibac® + 1/3 de la fertilización nitrogenada y T4) fertilización química completa. Se evaluaron las siguientes variables: Rendimiento en kg ha⁻¹, peso seco total-PST (g), peso de cabeza-PC (g), altura AL (cm), longitud de raíz-LR (cm) y diámetro de la cabeza- DC (cm).

El experimento se estableció en áreas de 17,0 m² por parcela, utilizando un diseño de bloques al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones y la fertilización química se realizó de acuerdo a previos análisis de suelo. En la variable rendimiento, los resultados revelaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos que recibieron fertilización (T2, T3 y T4) y el testigo (T1); con la aplicación de Monibac® solo (T2), el rendimiento (14,803 kg ha⁻¹) se redujo 6% en relación con la fertilización química completa (T4), mientras que la fertilización con Monibac® más el 33% de fertilización química (T3) (15,416 kg/ha) produjo una reducción del rendimiento del 2% (15,416 kg ha⁻¹), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos.

En la variable PST se presentaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos T2, T3 y T4 en relación con el testigo (T1); no obstante, entre los tratamientos T1, T2 y T3 las diferencias observadas no fueron significativas. La variable PC presentó igual comportamiento que el peso seco total. Las variables AL, LR y DC no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. En conclusión, la aplicación de Monibac® representa una alternativa importante para la disminución de los costos de producción generados por la aplicación de fertilizantes químicos y en consecuencia un impacto importante sobre la calidad de vida del pequeño productor y el consumidor con productos más limpios.

4.3 Prueba de eficacia de Monibac® en pastos

Se realizaron dos experimentos en sitios diferentes en la Estación Experimental Motilonia (Agustín Codazzi, Cesar), utilizando el pasto Guinea (*Panicum maximum* cv Tanzania). En la variable producción de materia seca/ha, los resultados revelaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos que recibieron fertilización en relación con el testigo. Los tratamientos consistentes en la aplicación del Monibac® (9,553 kg/ha) y Monibac® con 23,3 kg de Nitrógeno en forma de urea (12,048 kg/ha), presentaron mayores producciones de forraje con respecto al testigo (4,085 kg/ha). No fueron observadas diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre los tratamientos que recibieron fertilización química, Monibac® con fertilización química y aplicación de Monibac®. En la variable producción de forraje (materia seca /ha) no fueron encontradas diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$)

entre los tratamientos donde se aplicó Monibac® y Monibac® con fertilización química en relación con el testigo; sin embargo, se presentaron incrementos de producción de forrajes de 86,3 y 125,9% con la aplicación de Monibac® y Monibac® con fertilización química, respectivamente en relación con el testigo.

5. Identificación molecular

Inicialmente se aislaron 42 cepas y se identificaron preliminarmente como del género *Azotobacter* sp. por pruebas fenotípicas (microscópicas, macroscópicas y bioquímicas) y posteriormente se seleccionaron 8. Los resultados obtenidos en diferentes especies vegetales permitieron seleccionar la cepa AC1 por tener un mayor efecto sobre la germinación de algodón, sorgo, maíz y caupí, en relación con los otros aislamientos obtenidos; en condiciones de invernadero aumentó la altura de la planta, la longitud radicular, el peso seco de la raíz y la parte aérea, con respecto a los testigos.

Dado que la cepa presentaba actividades metabólicas de interés, se caracterizó filogenéticamente mediante la amplificación del gen *nifH* en el laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria – CORPOICA. Este gen (*nifH*) codifica para una subunidad de la enzima dinitrogenasa reductasa y se ha demostrado que contiene información filogenética suficiente para la identificación de microorganismos diazótrofos (Hill 1992). Se obtuvo una banda de 370 pb aproximadamente (Figura 4). La purificación se llevó a cabo mediante una columna de purificación Microcon® siguiendo la metodología descrita por la casa comercial. El producto obtenido de PCR se secuenció, la información obtenida fue comparada con la base de datos curada del GenBank y se confirmó el género y la especie del microorganismo con un 99% de similitud.

6. Estandarización del proceso tecnológico para la producción de Monibac®

6.1. Diseño de un medio de cultivo económico alternativo

El uso secuencial de diseños estadísticos experimentales (Plackett-Burman, factorial fraccionado, paso ascendente y Box-Behnken) ha sido empleado para la optimización y diseño de medios de cultivo alternativos (Ren et al. 2008; Rojas-Tapias et al. 2009). Se enfocaron esfuerzos para generar un efecto positivo sobre la multiplicación de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum* mediante el diseño de un medio de cultivo alternativo, aplicando como criterio principal de evaluación la producción de biomasa viable (UFC.ml⁻¹); se tuvo en consideración el costo de producción y la disponibilidad de las fuentes nutricionales.

Mediante el diseño de screening primario (Plackett-Burman) se evaluaron once fuentes nutricionales (glucosa, glicerol, almidón, levadura entera, levadura hidrolizada, glutamato, fosfato dibásico de potasio, cloruro de

sodio, cloruro de calcio, molibdato de sodio y solución de sales menores). Seis fuentes fueron seleccionadas y evaluadas mediante un diseño factorial fraccionado seguido del modelo de paso ascendente. Se escogieron finalmente tres fuentes (glucosa, levadura y glutamato) que demostraron tener el mayor efecto ($P < 0,05$) sobre el crecimiento del microorganismo.

Las tres fuentes nutricionales seleccionadas se llevaron a un diseño de optimización de variables (Box-Behnken) y mediante el análisis de una serie de superficies de respuesta de correlación entre los factores, se generó la predicción de la concentración de los factores nutricionales y el comportamiento esperado de la biomasa viable (UFC.ml⁻¹) (Figura 5).

El análisis estadístico demostró que dentro de las tres fuentes nutricionales evaluadas en la fase final del estudio, el glutamato suplementado presentó un efecto positivo significativo ($P < 0,05$) con mayor influencia sobre la producción de biomasa viable. Con base en esta fuente nutricional, se generó la composición optimizada del medio alternativo a partir de la cual se obtuvo una producción de 9×10^9 UFC.ml⁻¹ con una reducción de costos de producción de 96.7% (Moreno et al. 2009).

6.2 Estandarización de condiciones fisicoquímicas en biorreactor

Para definir y optimizar las condiciones fisicoquímicas relacionadas con la multiplicación de la cepa AC1 en un biorreactor de 5L (Minifors 5L. VET 3.7L) se aplicó un diseño estadístico factorial completo, partiendo de tres

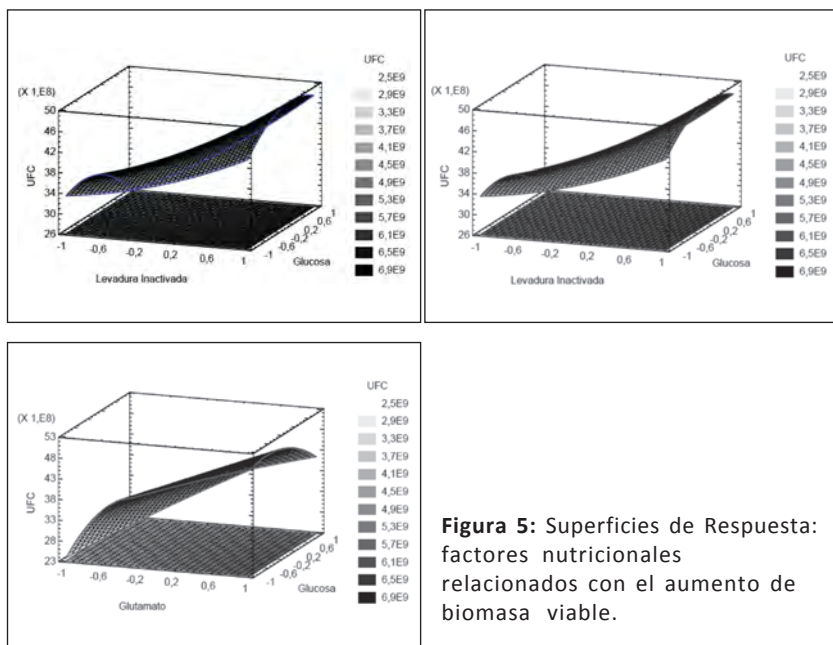


Figura 5: Superficies de Respuesta: factores nutricionales relacionados con el aumento de biomasa viable.

condiciones que desempeñan un papel crucial sobre el crecimiento del microorganismo en un biorreactor: aireación, velocidad de agitación y pH (Peña et al. 2000; Peña et al. 2008). Con este propósito, se generó una matriz de 8 tratamientos con 24 ejecuciones donde se tomó como variable única de respuesta la producción de biomasa viable (UFC.ml⁻¹). Se evaluaron las tres condiciones fisicoquímicas limitantes a dos niveles: aireación (0,2 – 0,4 v.v.m), velocidad de agitación (300 – 500 rpm) y pH (ajustado a 7,2 – no controlado). De las variables evaluadas se analizaron las superficies de respuesta generadas con el fin de observar el área de distribución de la combinación de factores (Figura 6) que incrementan la producción de biomasa viable (Moreno et al. 2009)

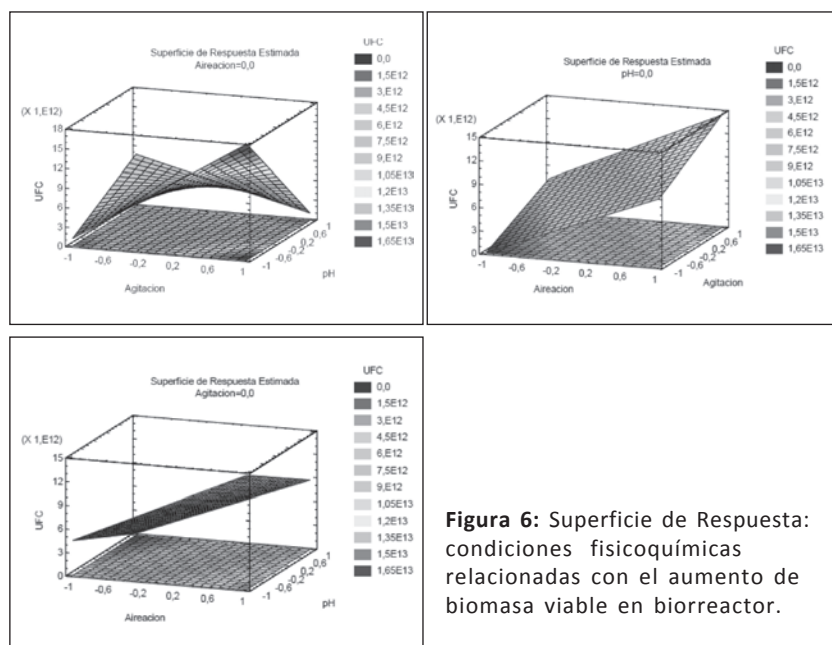


Figura 6: Superficie de Respuesta: condiciones fisicoquímicas relacionadas con el aumento de biomasa viable en biorreactor.

Las condiciones fisicoquímicas asociadas al aumento de biomasa viable de *A. chroococcum* en biorreactor fueron: 0,4 v.v.m, 500 rpm y pH no controlado, generando un recuento de $2,7 \times 10^{13}$ UFC mL⁻¹. Relacionado a esto, el crecimiento del microorganismo se vio favorecido por el incremento del pH en el medio, ya que este al no ser regulado, alcanzó valores de $8,2 \pm 0,10$, lo cual ha sido relacionado con un mejor crecimiento del microorganismo (Gauri et al. 2009; Thavasi et al. 2009). De igual forma, el aumento de la relación entre la aireación y la velocidad de agitación, demostró influenciar de manera significativa ($P < 0,05$) el desarrollo del microorganismo debido a que esta relación regula la disponibilidad de oxígeno, el tamaño de partícula de la burbuja y la disponibilidad de nutrientes dentro del medio de cultivo.

7. Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de Monibac®

La utilización de agroquímicos en los sistemas de producción intensivos tiene una clara acción sobre la microbiota del suelo, lo cual afecta directamente la riqueza y abundancia de las poblaciones microbianas nativas expuestas a este tipo de sustancias. Como consecuencia de la retención de ciertos plaguicidas en las partículas del suelo, los microorganismos benéficos, como muchas bacterias presentes en la mayoría de los sistemas agrícolas, pueden sufrir alteraciones bioquímicas, disminuyendo su actividad biológica y su efecto promotor (Paoletti 1999; Rivera et al. 2010).

Dentro de las bacterias diazotróficas, el género *Azotobacter* es uno de los más estudiados en la agricultura por su alta capacidad de biodegradación, especialmente para la oxidación de compuestos fenólicos sustituidos. Este hecho resulta de especial interés debido a que estas bacterias aumentan su actividad biológica en suelos agrícolas con residuos de tipo fenólico, lo que sugiere que estos microorganismos pueden contribuir a la biotransformación de estos residuos. En este contexto, estos diazótrofos son considerados como bacterias ciertamente ideales para los procesos de remediación de suelos agrícolas contaminados con sustancias xenobióticas (Chakraborty et al. 2002; Gradova et al. 2003; Caballero-Mellado et al. 2007; Rivera et al. 2010).

El uso intensivo de plaguicidas en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*) se ha convertido en una problemática insostenible ocasionando daños drásticos al medio ambiente y la salud humana (FAO, 2008, 2009). Esta situación ha obligado a establecer planes de mejoramiento de la fertilidad del suelo permitiendo la reducción en el uso de fertilizantes de síntesis química mediante el empleo de tecnologías limpias (Acuña et al. 2006). Los datos de campo e *in vitro* sobre los efectos de los fertilizantes nitrogenados, fungicidas, insecticidas y herbicidas sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a los cultivos de interés agrícola son escasos, motivo por el cual se evaluó el efecto de agroquímicos cuyos principios activos se basan en Carboxin: 5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide; Tiram: tetramethylthioperoxydicarbonic diamide; Imidacloprid: (1-(6-cloro 6-4- piridinil-metil)-N-nitroimidazolidin -2- ilideneamina); Cipermetrina:(1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS)-ciano-3-Fenoxibencilo; S-metolachloro: (S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metoxi-1-metil-etil)-acetamida; Fluometuron: 1,1-dimetil-3(alfa, alfa, alfa-trifluorom-tolil) urea y Glifosato: (N-(fosfonometil) glicina) sobre la viabilidad del inoculante biológico Monibac®. Los resultados demostraron la susceptibilidad del microorganismo frente al insecticida Cipermetrina al 50% y al ser mezclado con los demás plaguicidas en la dosis utilizada regularmente en campo. Se encontró que no hubo efectos significativos ($P>0,05$) en la aplicación de los plaguicidas Carboxin, Thiram, Imidacloprid, S-metolachloro, Fluometuron y Glifosato) sobre la cepa AC1, las diferentes dosis evaluadas infiriendo que ésta bacteria en condiciones de laboratorio

es capaz de tolerar estas sustancias químicas mediante diferentes mecanismos fisiológicos sin afectar su crecimiento (Figura 7) (Rivera et al. 2010).

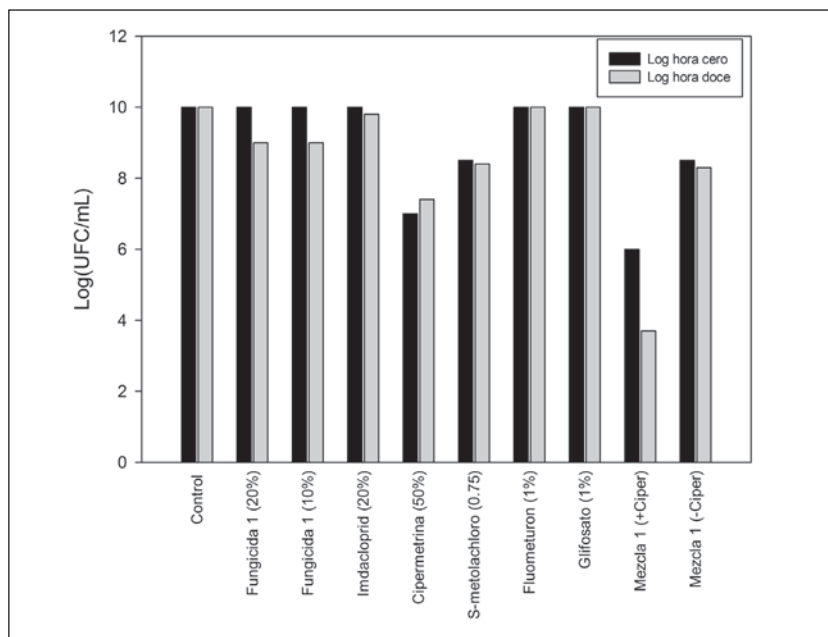


Figura 7. Efecto de los agroquímicos sobre la viabilidad de *A. chroococcum* AC1, en dos tiempos de contacto.

8. Selección y caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* sp. asociadas a especies forestales de interés en Colombia

El uso de microorganismos nativos con potencial biofertilizante se involucra cada vez más en los sistemas agropecuarios debido a que la práctica de la bioinoculación aporta numerosos beneficios a los cultivos desde el momento de la germinación hasta los estadios de su desarrollo posterior, lo que determina incrementos en la producción (Kizilkaya, 2008).

Se seleccionaron *in vitro* cepas promotoras de crecimiento vegetal eficientes del género *Azotobacter* asociadas a especies de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.), Roble (*Tabebuia rosea*), Ceiba (*Pachira quinata*) y Melina (*Gmelina arborea*). Los criterios de selección fueron la eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA) (Eckert et al. 2001) y su capacidad en la producción de indoles totales mediante la técnica de Salkowsky modificada (Carreno-Lopez et al. 2000). Se seleccionaron dos cepas eficientes por cada una de las especies arbórea en estudio, con producciones de etileno de $7,58 \times 10^8$ a $8,51 \times 10^8$ nmol mL⁻¹ min⁻¹ y valores promedios en la

prueba colorimétrica de AIA de 38,26 a 50 ug mL⁻¹.

De igual forma, en estudios preliminares, se realizaron evaluaciones en condiciones de invernadero con las cepas promisorias seleccionadas a partir de las especies de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) y Roble (*Tabebuia rosea*). Los resultados demostraron a los 30, 60 y 90 días después de la siembra, la prevalencia de la población identificada presuntivamente como *Azotobacter* sp. en suelo rizosférico ($P < 0,05$), el cual presentó el mayor número de células por unidad de volumen (UFC mL⁻¹) con respecto a los tratamientos sin inoculación y fertilización química. Asimismo, los parámetros agronómicos evaluados: peso seco y fresco de parte aérea y raíces, diámetro de tallo, longitud de la planta y contenido de nitrógeno presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos inoculados con respecto a los no inoculados (Figura 8).

Conclusiones

El desarrollo de sistemas agropecuarios sostenibles requiere del conocimiento de los mecanismos que involucran las interacciones suelo-microorganismo-planta-ambiente. El uso de fertilizantes biológicos como Monibac® permite aumentar el rendimiento de diferentes cultivos de interés económico en Colombia, disminuyendo el impacto sobre el medio ambiente y favoreciendo la calidad de vida del productor. La continuidad en la investigación pretende proyectar el uso de principios activos de tipo biológico (*Azotobacter* sp.) en biofertilizantes, los cuales contribuyan con la promoción del crecimiento vegetal de especies promisorias en Colombia.

A partir de varios aislamientos provenientes de la zona Caribe colombiana se obtuvo la cepa AC1 la cual evidenció en invernadero y campo promover el crecimiento de diferentes cultivos de interés como el algodón, la lechuga, tomate, ají o los pastos. Estos resultados fueron corroborados en el laboratorio donde se evidenció que AC1 fue capaz de fijar nitrógeno, producir indoles y solubilizar fosfatos. De igual forma, se demostró que la inoculación con la cepa AC1 representa una alternativa eficiente y rentable para la promoción de ciertos cultivos donde la fertilización nitrogenada puede ser reducida hasta en un 50%. Adicionalmente, los trabajos actuales también están dirigidos hacia la reducción en los costos de producción de los inoculantes. Ciertos avances han sido realizados sobre el proceso tecnológico, donde se logró una reducción del 98% en el proceso de producción mediante el desarrollo de un medio de cultivo alternativo para la producción del microorganismo. *Azotobacter chroococcum* es participe en la fijación biológica de nitrógeno en los suelos, es decir, contribuye al ciclaje del nitrógeno en los sistemas de producción reduciendo la aplicación de productos de origen químico. Adicionalmente, se le atribuye la capacidad de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, contribuyendo al desarrollo de la planta.

El efecto de compatibilidad de la bacteria con los herbicidas (S-metolachloro y Fluometuron) demostró que *A. chroococcum* AC1, puede ser aplicado conjuntamente con plaguicidas sin alterar su concentración como una estrategia en el manejo de los cultivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los financiadores: Conalgodón, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Fedegan y la Gobernación del Cesar. Adicionalmente, agradecen a Ever Mauricio Barón y a Edelberto Maestre por su colaboración técnica durante la ejecución de las actividades implicadas en el desarrollo del biofertilizante y el apoyo durante el proceso investigativo.

Bibliografía

- Acuña O., Peña E., Serrando L., Pocasangre F., Rosales E., Delgado J., Trejos A., Segura A. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de los suelos. Memorias XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical, Santa catarina, Brasil. pp. 222-223.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol.* 54:876-886.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58:921-929.
- Azcón R., Barea J. 1975. Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant and Soil.* 43:609-619.
- Bancroft K., Grant I.F., Alexander M. 1979. Toxicity of NO(2): effect of nitrite on microbial activity in an acid soil. *Appl Environ Microbiol.* 38: 940-944.
- Beliakov E.V. 1957. New simple method of isolation of *Azotobacter* from soil. *Mikrobiologiya.* 26:186-188.
- Benemann J.R., McKenna C.E., Lie R.F., Traylor T.G., Kamen M.D. 1972. The vanadium effect in nitrogen fixation by *azotobacter*. *Biochim Biophys Acta* 264. pp. 25-38.
- Bhatia R., Ruppel S., Narula N. 2008. Diversity studies of *Azotobacter* spp. from cotton-wheat cropping systems of India. *J Basic Microbiol.* 48: 455-463.

- Bishop P.E., Jarlenski D.M., Hetherington D.R., 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. Proc Natl Acad Sci USA. 77:7342-7346.
- Bishop P.E., Jarlenski D.M., Hetherington D.R. 1982. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. 150:1244-1251.
- Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N. 2003. Aerobic and anaerobic microbial degradation of poly-beta-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum*. Appl Biochem Biotechnol. 109:285-301.
- Bonilla R., Morales J. 2006. Monibac: un biofertilizante con base en cepas nativas de *Azotobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodón. Innovación y Cambio Tecnológico. pp. 4-5.
- Caballero T., Camelo M., Bonilla R., Martínez M. 2007. Determinación de Actividad Fosfato solubilizadora por bacterias aisladas a partir de suelos algodóneros en los Departamentos del Cesar y Meta. Suelos Ecuatoriales 37, 6.
- Caballero-Mellado J., Onofre-Lemus J., Estrada-de Los Santos P., Martinez-Aguilar L., 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl Environ Microbiol .73:5308-5319.
- Carreno-Lopez R., Campos-Reales N., Elmerich C., Baca B.E. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet. 264:521-530.
- Chakraborty S.K., Bhattacharyya A., Chowdhury A., 2002. Degradation of oxyfluorfen by *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck). Bull Environ Contam Toxicol. 69:203-209.
- Chen Y.X., Wang Y.P., Lin Q., Luo Y.M. 2005. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. Environ Int. 31:861-866.
- Chisnell J.R., Premakumar R., Bishop P.E. 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. 170:27-33.
- Dutta S., Podile A.R. 2010. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Crit Rev Microbiol. 36:232-244.
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E., Becking J. 2006. The Family Azotobacteraceae. The Prokaryotes. Springer New York. pp. 759-783.

- Eady R.R. 1995. Vanadium nitrogenases of *Azotobacter*. *Met Ions Biol Syst.* 31:, 363-405.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A., 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:17-26.
- FAO, 2008. Cambio climático y seguridad alimentaria: un documento marco.
- FAO, 2009. Perfil para el cambio climático.
- Fisher K., Dilworth M.J., Kim C.H., Newton W.E. 2000a. *Azotobacter vinelandii* nitrogenases containing altered MoFe proteins with substitutions in the FeMo-cofactor environment: effects on the catalyzed reduction of acetylene and ethylene. *Biochemistry.* 39:2970-2979.
- Fisher K., Dilworth M.J., Kim C.H., Newton W.E., 2000b. *Azotobacter vinelandii* nitrogenases with substitutions in the FeMo-cofactor environment of the MoFe protein: effects of acetylene or ethylene on interactions with H⁺, HCN, and CN. *Biochemistry.* 39:10855-10865.
- Garcia-Agustin P., Flors V., Cerezo M., Romero E., Lapena L. 2004. Aquifer contamination by nitrogen after sewage sludge fertilization. *Bull Environ Contam Toxicol.* 72:344-351.
- Garg S.K., Bhatnagar A., Kalla A., Narula N., 2001. *In vitro* nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresour Technol.* 80:101-109.
- Gauri S.S., Mandal S.M., Mondal K.C., Dey S., Pati B.R. 2009. Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresour Technol.* 100:4240-4243.
- Glickmann E., Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61:793-796.
- Gradova N.B., Gornova I.B., Eddaudi R., Salina R.N. 2003. Use of bacteria of the genus *Azotobacter* for biodegradation of oil-contaminated soils. *Príkl Biokhím Mikrobiol.* 39:318-321.
- Halwani J., Baroudi B.O., Wartel M. 1999. [Nitrate contamination of the groundwater of the Akkar Plain in northern Lebanon]. *Sante* 9, 219-223.
- Hill S., 1992. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In: Stacey, G., Burris, R., Evans, H. (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hill. pp. 960.
- Johnson C.J., Kross B.C. 1990. Continuing importance of nitrate contamination of groundwater and wells in rural areas. *Am J Ind Med.* 18:449-456.
- Johnson C.R., Reiling B.A., Mislevy P., Hall M.B. 2001. Effects of nitrogen fertilization and harvest date on yield, digestibility, fiber, and protein fractions of tropical grasses. *J Anim Sci.* 79:2439-2448.

- Juarez M.J., Zafra-Gomez A., Luzon-Toro B., Ballesteros-Garcia O.A., Navalon A., Gonzalez J., Vilchez J.L. 2008. Gas chromatographic-mass spectrometric study of the degradation of phenolic compounds in wastewater olive oil by *Azotobacter Chroococcum*. *Bioresour Technol.* 99:2392-2398.
- Kang Y.J., Cheng J., Mei L.J., Hu J., Piao Z., Yin S.X. 2010. Action mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 21:232-238.
- Katznelson H., Strzelczyk E. 1961. Studies on the interaction of plants and free-living nitrogen-fixing microorganisms. I. Occurrence of *Azotobacter* in the rhizosphere of crop plants. *Can J Microbiol.* 7:437-446.
- Kizilkaya R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol Engin* 33. pp. 150-156.
- Kizilkaya R. 2009. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J Environ Biol.* 30:73-82.
- Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94:1259-1266.
- Kumar R., Bhatia R., Kukreja K., Behl R.K., Dudeja S.S., Narula N. 2007. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Basic Microbiol.* 47:436-439.
- Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J Environ Manage.* 90: 831-837.
- Mirlean N., Baisch P., Machado I., Shumilin E. 2008. Mercury contamination of soil as the result of long-term phosphate fertilizer production. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81:305-308.
- Moreno, A., Rojas-Tapias, D., Bonilla, R., 2009. Estandarización de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación de la cepa AC1 de *Azotobacter chroococcum*. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, p. 117.
- Novo R., Bonilla R. 1998. Distribución y nivel poblacional de bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* en suelos de los departamentos del Cesar, Córdoba y Guajira. *Corpocaribe.* pp. 1-6.
- Paoletti, M.G. 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agr Ecosyst Environ.* 74:137-155.

- Peña C., Millan M., Galindo E. 2008. Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks. *Process Biochem.* 43:775-778.
- Peña C., Trujillo-Roldan M.A., Galindo E. 2000. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii* *small star*, *filled*. *Enzyme Microb Tech.* 27:390-398.
- Premakumar R., Pau R.N., Mitchenall L.A., Easo M., Bishop P.E. 1998. Regulation of the transcriptional activators AnfA and VnfA by metals and ammonium in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett.* 164:63-68.
- Rajkumar M., Freitas H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere.* 71:834-842.
- Rajkumar M., Nagendran R., Lee K.J., Lee W.H., Kim S.Z. 2006. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr6⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere.* 62:741-748.
- Raupach G.S., Kloepper J.W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology.* 88:1158-1164.
- Ren J., Lin W.T., Shen Y.J., Wang J.F., Luo X.C., Xie M.Q. 2008. Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Tech.* 99:7923-7927.
- Rivera D., Camelo M., Estrada G., Obando M., Bonilla R. 2010. Different pesticides' effect on *Azotobacter chroococcum* growth. *Rev Colomb Biotechnol.* 12. pp. 9.
- Rojas-Tapias D., Garrido M.F., Bonilla R. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10. pp. 70-80.
- Ryu C.M., Murphy J.F., Reddy M.S., Kloepper J.W. 2007. A two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas syringae* and Cucumber mosaic virus coupled to promotion of plant growth on *Arabidopsis thaliana*. *J Microbiol Biotechnol.* 17:280-286.
- Saha S.P., Patra A., Paul A.K. 2007. Studies on intracellular degradation of polyhydroxyalkanoic acid-polyethylene glycol copolymer accumulated by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *J Biotechnol.* 132:325-330.
- Saha S.P., Paul A.K. 2005. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyric acid) accumulated by *Azotobacter chroococcum* MAL-201. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 64:50-56.

- Smith R.L., Ceazan M.L., Brooks M.H. 1994. Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1949-1955.
- Suthar S., Bishnoi P., Singh S., Mutiyar P.K., Nema A.K., Patil N.S. 2009. Nitrate contamination in groundwater of some rural areas of Rajasthan, India. *J Hazard Mater.* 171:189-199.
- Thavasi R., Subramanyam Nambaru V.R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M. 2009. Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Mar Biotechnol* (NY). 11:551-556.
- Tserkovniak L.S., Bega Z.T., Ostapchuk A.N., Kuz'min V.E., Kurdish I.K. 2009. Production of biologically active substances of indol nature by bacteria of *Azotobacter* genus. *Ukr Biokhim Zh.* 81:122-128.
- Yan Z., Reddy M.S., Ryu C.M., McInroy J.A., Wilson M., Kloepper J.W. 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* 92:1329-1333.

Capítulo 10

El género *Pseudomonas* en suelos agrícolas y en rizosfera. De moléculas a comunidades

Pseudomonads in agricultural soils and rhizosphere.
From molecules to communities

Betina Agaras, Claudio Valverde

Programa Interacciones Biológicas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Argentina. Tel.: +54-11-4365-7100. Fax: +54-11-4365-7132. Consorcio BIOSPAS (Biología del Suelo y Producción Agraria Sustentable), proyecto PAE 36976, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina. E-mail: cvalver@unq.edu.ar

Introduction

Pseudomonads are Gram-negative, aerobic, non-sporulating, polarly flagellated rods that are widely distributed in nature (Holt et al. 1994). Here, the term «pseudomonads» will refer to members of the genus *Pseudomonas* spp., also known as *Pseudomonas sensu stricto*, i.e., strains whose 16S ribosomal DNA sequences fall into the rRNA I group defined by Palleroni (Anzai et al. 2000). Representative members of the pseudomonads are *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. chlororaphis* and *P. stutzeri*. These species include strains that are opportunistic human pathogens (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*) and plant pathogens (*P. syringae*), as well as strains that have plant growth promoting or plant probiotic effects (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*). Despite this simplified categorization, the nature of the interaction (pathogenic, probiotic or neutral) with a eukaryotic host (plant, animal or human), can not be associated with a single *pseudomonad* species and must be determined for every single isolate. An important number of isolated pseudomonads produce water soluble pigments that fluoresce under UV light, particularly under iron limitation; those strains are referred to as fluorescent pseudomonads (Cornellis 2010).

Pseudomonads are detected in the rhizosphere of many healthy plants, as important quantitative components of the microbial biota, suggesting that their presence might be advantageous to the host plant (Haas, Defago 2005; Weller 2007). Moreover, specific lineages have been detected in certain crops associated

with reduced incidence of root diseases (Weller 2007). For several isolates, it has been proved that their inoculation results on plant growth promotion under certain controlled conditions. Such positive effects have been explained by different mechanisms, some of which have been dissected at the molecular level (Haas, Defago 2005). This aspect will be first illustrated here for a model *P. fluorescens* probiotic strain, with a discussion about the critical role that a genetic regulatory system has to protect plants against phytopathogenic fungi and, simultaneously, to protect bacterial cells themselves from predation by bacterivorous eukaryotes. We will then move from molecular details of a model strain into ecological aspects of pseudomonads as members of the rhizosphere community, and briefly introduce current studies on pseudomonads diversity in soil and rhizosphere in no-till farming plots in Argentina.

Dual role of a *P. fluorescens* genetic regulatory system for plant growth promotion and for avoidance of eukaryotic predation

Biocontrol features of *P. fluorescens* strain CHA0

More than two decades ago in Morens (Switzerland), a *P. fluorescens* strain was isolated from a tobacco field suppressive to *Thielaviopsis basicola*, the fungal agent causative of tobacco black root rot. The strain was able to avoid or reduce the negative effects of *T. basicola* and several other phytopathogens inoculated in plants under controlled conditions, and for this reason, it was deemed a «biocontrol» microorganism (Stutz et al. 1986). The strain was designated as *P. fluorescens* CHA0, and as will be briefly resumed below, it has become a model bacterium to study genetic regulation of biocontrol expression (Lapouge et al. 2008; Valverde, Haas 2008). The biocontrol ability of strain CHA0 is due to the production and secretion of a variety of chemical compounds and lytic enzymes on colonized host plant roots. Among the identified factors that contribute to biocontrol, we can cite the antibiotics 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), pyrrolnitrin (PRN) and pyoluteorin (PLT), the volatile toxin hydrogen cyanide (HCN), and the exometalloprotease A (AprA) (Haas, Keel 2003). As expected, the production of all these biocontrol compounds is not constitutive or, in other words, their expression is regulated by cellular and environmental cues (Haas, Keel 2003). For instance, HCN production is maximized under reduced O₂ tension and it is strongly dependent on an adequate iron supply (Blumer, Haas 2000); DAPG synthesis is higher on maize and wheat roots than on bean or cucumber roots (Notz et al. 2001), and is also affected by the presence of fusaric acid (Notz et al. 2002) and by soluble signals from protozoans (Jousset et al. 2010). These abiotic and biotic cues operate as signals that influence genetic regulatory systems that operate at the transcriptional level through classical transcriptional regulatory proteins, like ANR for HCN biosynthetic genes (Laville et al. 1998) and PhIF and PhIH for DAPG biosynthetic genes (Schnider-Keel et al. 2000). These mechanisms allow specific adjustments of gene expression in response to environmental signals, as O₂ availability for the HCN synthesis operon or nitrogen availability to the extracellular protease

operon (Haas, Keel 2003). The genes encoding proteins and enzymes for these biocontrol factors are organized into separate operons that are dispersed into the genome (Paulsen et al. 2005), that is, they are not physically linked so that the above mentioned regulatory cues affecting transcription of the *hcn* or *phl* operons do not influence expression of the *plt*, *prn* or *aprA* operons, and *vice versa*.

However, early in the 90's, a classical genetic screening of a library of random generated transposon mutants derived from strain CHA0, allowed the identification of a single gene that when inactivated, it caused multiple phenotypes including loss of all antibiotic factors and extracellular enzymes, and consequently, loss of tobacco black root rot suppression (Laville et al. 1992). For this reason, the identified gene was named *gacA*, namely, global antibiotic and cyanide regulator A. Amino acid sequence homology indicated that GacA is a transcriptional regulatory protein, typical of bacterial two-component systems (TCSs). TCSs are very common in prokaryotes as sensory-transducing systems that permit bacteria to decode environmental signals into genetic and cellular responses (Goulian 2010). The first component is a transmembrane protein with at least three domains, a periplasmic domain for interaction with the external stimulatory signal, a membrane anchorage domain, and a cytoplasmic domain that contains a conserved histidine residue where autophosphorylation occurs upon perception of the inducing signal. The second component is the response regulator, i.e., a transcriptional regulator that interacts with the sensor cytoplasmic domain and receives the phosphate in a conserved aspartate residue, inducing a conformational change that permits binding of the phosphorylated response regulator to the DNA to execute transcriptional regulation of target genes and operons (Goulian 2010). In *P. fluorescens* strain CHA0, GacA is the response regulator and GacS, is the partner membrane sensor (Figure 1a; Zuber et al. 2003). One intriguing feature of the *gacA* mutant was that the mutation did not affect transcription of all biocontrol operons, but the corresponding biocontrol products were not synthesized. Thus, GacS/A seemed to have a global regulatory positive effect on biocontrol gene expression at a post-transcriptional level (Figure 1a). Two major questions arose: 1) how does the GacS/A executes the global control on biocontrol gene expression? 2) Which is the signal perceived by GacS? Significant advances at the molecular level have been achieved regarding these issues in the last two decades for strain CHA0 (Lapouge et al. 2008; Valverde, Haas 2008).

A keynote feature of the GacS/A system of strain CHA0 is that its global positive effect on expression of biocontrol genes is maximal in cultures with high cell density, with activation factors of 25-50' when cultures transit from exponential to stationary phase (Lapouge et al. 2008). This behaviour is reminiscent of regulatory systems of the quorum sensing type, i.e., regulatory circuits that respond to increasing cell densities (Valverde 2010). In fact, strain CHA0 synthesizes a water soluble low molecular weight compound that can be extracted from culture supernatants, and that is able to activate the GacS/A system and advance biocontrol gene expression to lower cell densities; that is, strain CHA0 produces an autoinducer that is sensed

by the GacS/A system. The chemical nature of the GacS/A autoinducer is unknown yet (Dubuis, Haas 2007). So, the GacS/A TCS behaves as a quorum sensing system with a positive feedback autoregulatory loop and an output branch for activation of biocontrol gene expression (Figure 1a; Valverde, Haas 2008).

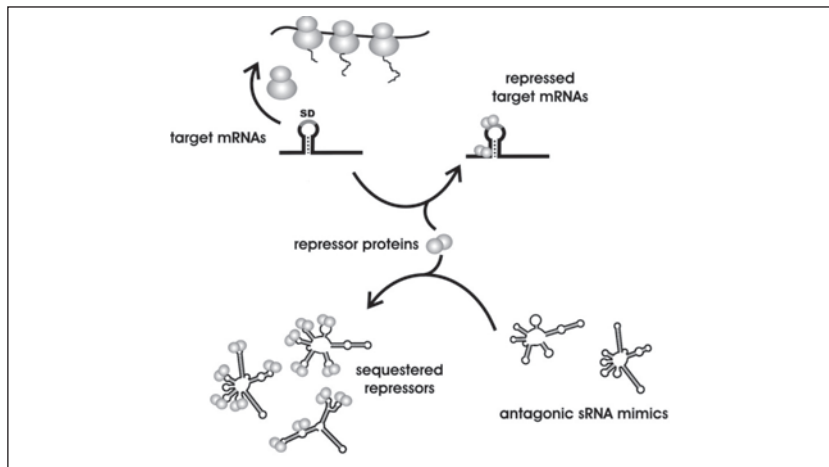


Figure 1: Molecular control of biocontrol gene expression in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 by the Gac/Rsm cascade. a) Cell-density dependent translational activation of biocontrol gene expression depends on the two-component system GacS/A, which responds to an autoinducer signal. b) Molecular detail of the mechanism responsible for the translational activation of GacS/A-controlled genes. At high cell densities, the phosphorylated response regulator GacA~P_i promotes transcription of three small regulatory RNAs, the antagonistic sRNA mimics RsmX/Y/Z, that bind to and remove RsmA/E repressor proteins from biocontrol target mRNAs, thus allowing simultaneous translation and biosynthesis of biocontrol compounds.

As highlighted in the previous section, the GacS/A TCS is a global controller of biocontrol genes acting at a post-transcriptional level. So, how does the system act on multiple operons dispersed in the genome if not by a direct action of the response regulator GacA, a likely transcriptional regulator? The point is that the TCS GacS/A is the top element of a regulatory cascade that contains additional intermediate elements. Two proteins, RsmA and RsmE (for regulator of secondary metabolism), are RNA binding proteins that recognize and bind to sequence-structural motifs in the leader regions of target mRNAs, around the ribosome binding site, introducing a translational restriction to ribosome access (Lapouge et al. 2007; Alvarez Crespo, Valverde 2009). Thus, RsmA and RsmE are global translational regulators of biocontrol mRNAs (Figure 1b; Reimmann et al. 2005). To relieve biocontrol mRNA repression by RsmA/E proteins, the GacS/A TCS makes use of small non coding RNA molecules (Figure 1b). When a proper cellular density is achieved and a threshold autoinducer signal concentration is attained, autophosphorylated GacS activates GacA by trans-phosphorylation, and GacA~P_i

induces transcription of the three small RNA transcripts RsmX, RsmY and RsmZ, that are the true effectors of the GacS/A system (Heeb et al. 2002; Valverde et al. 2003; Kay et al. 2005). These small regulatory RNAs have several structural-sequence motifs that resemble those recognized by RsmA/E proteins in target mRNAs (Valverde et al. 2004), so when the intracellular concentration of RsmX/Y/Z small RNAs is increased, the RsmA/E proteins are outcompeted and displaced from blocked mRNAs to form ribonucleoprotein RsmA/E-RsmX/Y/Z complexes, thus permitting mRNA translation (Figure 1b; Valverde, Haas 2008). In this way, the regulatory mechanism that controls biocontrol gene expression in strain CHA0 can be considered a cascade mastered by the GacS/A TCS, which output is executed by small RNA molecules that act as antagonists of translational repressor proteins (Figure 1). Which would be the advantages of such a complicated mechanism? On the one hand, the response is quite fast and economic as it relies on synthesis of small RNA molecules that must not be translated, and it operates on pre-formed mRNAs. On the other hand, it allows coordinated expression of operons/genes whose activation confers a competitive advantage for the cell under certain environmental condition. So, one can imagine that plant roots profusely colonized by strain CHA0 will benefit by the activation of the GacS/A system due to the high cellular densities achieved on the rhizoplane/rhizosphere, resulting on good expression of biocontrol genes for suppression of root pathogens (Figure 2).

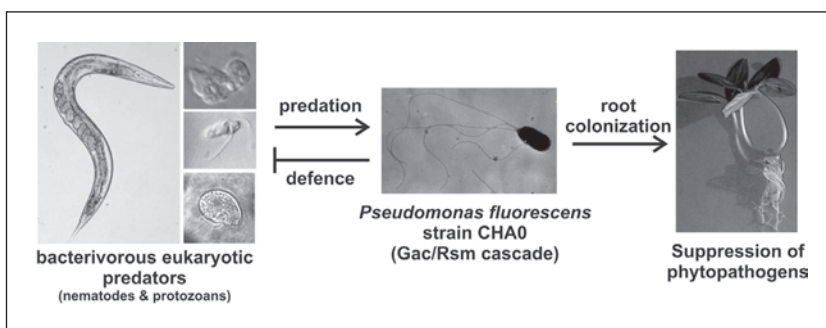


Figure 2: Central role of the Gac/Rsm regulatory cascade in *P. fluorescens* strain CHA0 for biocontrol of plant root pathogens and for avoidance of eukaryotic predation. The correct functioning of the Gac/Rsm cascade provides a selective advantage to *P. fluorescens* CHA0 cells to escape predation from nematodes, ciliates, flagellates and amoebae and simultaneously, it confers protection to colonized roots against pathogens through activation of antibiotic and lytic enzyme synthesis.

Cell-to-cell communication through the Gac/Rsm is critical to escape predation

Prokaryotes in soil and rhizosphere are exposed to eukaryotic predation pressure, which contributes to shape bacterial community structure. Many protists and nematodes feed on bacteria, and, as a consequence, several

bacterial species have developed strategies to overcome predation (e.g., morphological adaptations, cell surface modifications, biofilm formation and toxin secretion) (Matz, Kjelleberg 2005). Isolated soil protists like the amoeba *Valkhampfia* sp. And12, the flagellate *Neobodo designis* And31 and the ciliate *Colpoda steinii* Sp1, can not grow in co-culture with wild type cells of *P. fluorescens* strain CHA0, because protist cells are killed or induced to enter into a dormant state (encystment) (Jousset et al. 2006). However, either *gacS*, *gacA* or *rsmXYZ* mutants, are excellent source of food for the same protists (Jousset et al. 2006). These three types of mutants have one thing in common: they produce neither extracellular antibiotics nor lytic enzymes (see above). Consequently, disarmed CHA0 *gac* mutant cells are exposed to predation in the rhizosphere (Jousset et al. 2006). Thus it follows that one or several of these extracellular compounds serves strain CHA0 to avoid protozoan grazing. For instance, DAPG induces amoebae encystation and inhibits cyst reactivation, whereas the exoprotease AprA delays encystation turning amoebae more susceptible to other toxins (Jousset et al. 2006). HCN seems to have a minor role against protists, but it is a strong toxin for the model nematode *Caenorhabditis elegans* at high CHA0 cell densities (Romanowski et al. 2011). Under these conditions, the nematodes suffer rapid paralysis without internal infection, and HCN is a major contributor to this paralytic effect (Romanowski et al. 2011). At low cell densities, *C. elegans* can feed on wild type CHA0 cells without being paralyzed, but now the death comes from within as the intestine becomes heavily colonized. As described for protists, *gacS/A* or *rsmXYZ* mutants are not at all harmful for *C. elegans* (Jousset et al. 2009; Romanowski et al. 2011). Again, cell-to-cell communication by means of the Gac/Rsm cascade turns out to be very important for strain CHA0, in this case to resist predation by bacterivorous eukaryotes (Figure 2). These and other studies suggest that predation promotes the production of bacterial defense compounds by selectively eliminating non-toxic mutants (Jousset et al. 2009).

The Gac/Rsm cascade (Figure 1) appears to be a quite effective regulatory system as it is conserved in pseudomonads, serving to impose a global control on different set of genes, which depending on the strain are either probiotic or pathogenicity-related genes (Valverde, Haas 2008). In particular, the *gacA* gene has been proposed to be a reliable phylogenetic marker within the genus *Pseudomonas* (de Souza et al. 2003), and it appears to be a suitable target for the simultaneous analysis of *Pseudomonas* community structure and function in soil (Costa et al. 2007).

Pseudomonads in soil and rhizosphere

Driving forces of pseudomonads diversity

Among soil bacteria, the genus *Pseudomonas* is one of the most diverse and widespread in major natural environments. Its physiological adaptability was recognized early (Stanier et al. 1966). With the development of molecular

techniques, the genetic diversity of the genus was realized. Different genetic factors, from the genome size to its architecture, show a significant diversity (Ginard et al. 1997; Schmidt et al. 1996; Rainey, Bailey 1996). Nevertheless, this is not reflected at the DNA sequence level, supporting that these microorganisms belong to the same bacterial genus (Spangenberg et al. 1998; Kiewitz, Tummeler 2000). The causes of this great diversity aren't clear yet. Microbiological studies tend to explain diversity at the DNA level, but they generally forget the ecological factors that are certainly involved in shaping biological diversity, like ecological opportunity and competition (Darwin 1859). Ecological studies have been performed to elucidate which factors influence the patterns of pseudomonads diversity. For instance, in a spatially heterogeneous environment, the *P. fluorescens* SBW25 isolate rapidly diverges into different colony morphologies with a marked niche preference (Rainey, Travisano 1998). These niche-adapted classes, which bear mutations, had competitive relationships, so that this diversity is durable.

Despite ecological opportunity and competition are considered the most significant ecological causes of diversity, others like productivity, disturbance and parasitism do also have an influence. Studies with strain SBW25 revealed that the unimodal relationship between diversity and both productivity (Kassen et al. 2000) and disturbance (Buckling et al. 2000) occurs in heterogeneous environments, but not in homogeneous ones. Hence, these unimodal relationships can be caused by selection of specialized types in the heterogeneous environments, and they modulate the biological diversity. With regards to parasites, the phage SBW25f2 has an important effect on diversification of *P. fluorescens* SBW25 as it causes a reduction in sympatric diversity but an increase in allopatric diversity (Buckling, Rainey 2002). So, the exploiters (phages) can drive diversification between populations but may inhibit diversification within populations by opposing diversifying selection that arises from resource competition.

Obviously, evolution is not possible without genetic processes that affect diversification. Mutation and recombination are the principal resources of variation, and the pseudomonads have an enhanced capacity of evolutionary divergence, i.e. evolvability. There is no evidence for a single mutational mechanism or a main strategy for recombination in pseudomonads. However, strains with elevated mutation rates (mutators) have been isolated (Oliver, Mena 2010), and recombination pathways occur in this genus of bacteria (Kiewitz et al. 2000). Long-term infections, like those in lungs of cystic fibrosis patients, are an excellent source of heterogeneous *P. aeruginosa* mutator isolates that are defective in the DNA mismatch-repair system (Oliver et al. 2000; Moyano et al. 2007). An interesting related genetic event is phase variation, which occurs in various *Pseudomonas* species. Phase variation consists in the diversification of a single bacterial population into subpopulations with phenotypic and genotypic differences. This is typical of bacteria occupying heterogeneous environments such as the soil or rhizosphere. Phase variation often affects cell surface

components as a result of reversible genomic rearrangements caused by several mechanisms (Sánchez-Contreras et al. 2002). For example, *P. aeruginosa* suffers the mucoid to non-mucoid colony transformation due to a number of point mutations at different chromosomal loci (Govan, Deretic 1996); *P. tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease of the mushroom *Agaricus bisporus*, undergoes phenotypic variation between pathogenic (wild type) and non-pathogenic (phenotypic variant) forms, as a result of DNA rearrangement of the *pheN* locus, a region involved in the regulation of gene expression (Grewal et al. 1995); *P. fluorescens* F113 experiences phase variation during colonization of alfalfa roots, and this is caused by both the activity of a site-specific recombinase encoded by the *sss* gene (the main factor of phase variation) and by a point mutation in the *gacA* gene that alters the phenotype (Sánchez-Contreras et al. 2002).

The large size of *Pseudomonas* genomes (5.9-7.0 Mb) likely reflects the ability of most strains to colonize a broad range of ecological niches, as in a larger genome there could be more catabolic pathways as well as more regulatory genes which could control their expression. *Pseudomonas* genomes are particularly rich in regulatory genes, mainly members of TCSs (Stover et al. 2000). Because a central idea of adaptability is that regulatory pathways have special properties relevant to evolutionary change, including versatile protein elements and weak linkage among components (Kirschner, Gerhart 1998), this property of *Pseudomonas* genomes may be a special factor affecting the ability of these bacteria to take advantage of foreign DNA. It appears that pseudomonads are not naturally competent to acquire novel DNA by transformation in the lab (Spiers et al. 2000). However, mobile accessory genetic elements are one of the main tools for movement and integration of foreign DNA sequences in pseudomonads. Isolated plasmids usually have a broad host range and they encode complete pathways, often related to virulence or catabolic activities (Thomas 2000).

Pseudomonads in the rhizosphere, a close relationship

One of the most interesting properties of *Pseudomonas* spp. is their ability to form intimate associations with plants and animals, which can contribute to health or disease in the host. As proven for other microorganisms (Whipps 2001), pseudomonads are quantitatively enriched in the rhizosphere (Figure 3). In a gnotobiotic experiment with wheat plants individually inoculated with 150 strains of fluorescent pseudomonads isolated from wheat rhizosphere, 40% of the isolates inhibited plant-growth, 40% stimulated plant growth, and only 20% did not produce any effect (Campbell, Greave 1990). Most probably, these percentages would differ in natural soil, due to the presence of lots of other competitor bacteria. In line with this idea, the suppressive ability of a biocontrol strain was higher in a gnotobiotic system than in soil (Lugtenberg et al. 2001).

Among factors that influence the rhizospheric microbial community, soil type, soil management, plant species and root zone location are the major modeling agents. Soil type affects the microbial community because the combination of soil texture and structure, organic matter content, microaggregates, stability, pH, and available key nutrients determines the habitable niches in soil (Latour et al. 1996). Crop rotation, tillage, irrigation, and herbicide and fertilizer application are also key determinants of microbial community structure (Picard, Bosco 2008). Through their root exudates, different plants provide different carbon sources, ions, enzymes and mucilages. The utilization of root exudates is the nutritional basis for the colonization ability of some species (Lugtenberg et al. 2001; Smalla et al. 2001; Kamilova et al. 2006). Although *Pseudomonas* is a ubiquitous genus, some degree of plant and soil specificity exists (Latour et al. 1996; Berg et al. 2002; Picard, Bosco 2008). When considering the entire root system, pseudomonads show a heterogeneous colonization pattern (Garbeva et al. 2004; Chin-A-Woeng et al. 1997). Electron microscopy allowed visualizing a preferential colonization of epidermal root cell junctions, indented parts of the epidermal surface, or root hairs, which are all presumed sites for exudation (Chin-A-Woeng et al. 1997), resulting in microcolonies in which cell density dependent regulatory mechanisms are likely to enhance production of secondary metabolites, most of them involved in antagonism, and bacterial conjugation (Chin-A-Woeng et al. 1997; van Elsas et al. 1998).

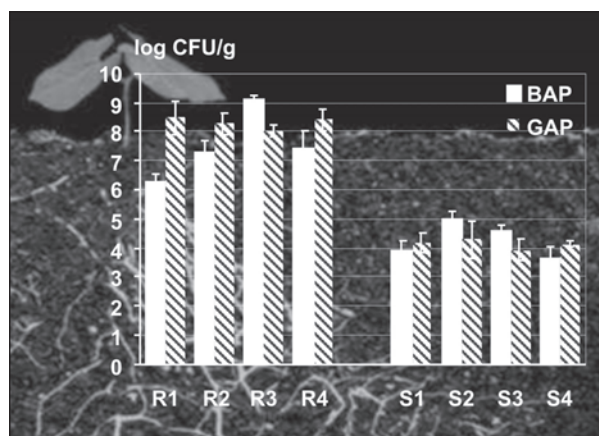


Figure 3: The rhizosphere effect for pseudomonads. The graph shows the average load of pseudomonads ($\log \text{CFU/g}^{-1}$) in top soil (S) and rhizosphere (R) at different geographical locations (1-4) in the humid Pampa, in agricultural plots under no till management. BAP, plots selected by their «bad agricultural practices»; GAP, plots selected by their «good agricultural practices» (AAPRESID). The crops present at time of sampling (summer 2010) were: maize (R1) and soybean (R2, R3, R4) for BAP; soybean (R1, R2, R4) and maize (R3) for GAP. Error bars indicate $\pm \text{SD}$.

The ability of inoculated bacteria to reach the root tip during colonization is considered of primary importance to cope with competition with the indigenous soil microflora and with propagules of fungal plant pathogens that can be found at different soil depths. So, the colonization competence is defined as the ability of seed or seedling inoculated bacteria to reach the growing root tip. An effective colonization can contribute to: i) cause diseases (pathogenicity); ii) control disease by production of certain metabolites (biocontrol); iii) direct plant growth promotion (phytostimulation); iv) increasing availability of nutrients for plants, like phosphate, nitrogen and micronutrients (biofertilization); v) phytoremediation, through degradation of toxic organic compounds (Lugtenberg, Dekkers 1999).

Genetic approaches suggest that the colonization ability of pseudomonads is a very complex process, implicating various mechanisms and multiple genetic factors. Either by targeted mutagenesis of genes presumed to be involved in colonization or by random mutagenesis, several mutants have been isolated with an altered colonization competence. These mutants with impaired root colonization suffered mutations in genes associated with motility, chemotaxis, growth rate, carbon source usage, outer membrane proteins as OprF and efflux pumps, and production of different cellular compounds, like the LPS O-antigen, cellulose, thiamine, amino acids, and biotin (Lugtenberg et al. 2001; Haas, Défago 2005; Weller 2007). Interestingly, most of these factors involved in root colonization are also critical for pathogenicity of other Gram negative bacteria. Conversely, the opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* PAO1 can function like a biocontrol bacterium on cucumber and wheat plants (Walker et al. 2004). Furthermore, it has been found the type III secretion system (TTSS) in non-pathogenic *P. fluorescens* (Lugtenberg et al. 2001; Kimbrel et al. 2010). TTSS is a specialized protein transport pathway induced in response to contact with eukaryotic host cells, involved in secretion of effector proteins into the cytoplasm of eukaryotic cells. The plant pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 employs a TTSS to inject particular proteins into plant cells, and the bacterium specificity by the host plant is carried out by the effectors protein it produces and brings into to the cell plant (Fouts et al. 2003). As TTSS have been previously described only for parasitic bacteria (Alfano, Collmer 1997), it is still unknown the real function of this pathway in plant probiotic bacteria, like *P. fluorescens*; a role in defense against eukaryotic grazers may be speculated. Thus, similar strategies and mechanisms seem to be used by plant beneficial as well as plant pathogens to colonize hosts.

Plant growth promotion (plant probiosis) by pseudomonads

Due to the negative environmental effects of chemical pesticides and fertilizers, commercial agriculture is looking for alternative solutions to enhance crop yield and health, like the use of microorganisms and the development of genetically modified plants. As the last one is frowned upon by the general

public, the first one seems to be the more acceptable option (Adesemoye et al. 2009). Pseudomonads have several mechanisms for promoting crop growth and health (Valverde, Ferraris 2010). Several properties make them interesting candidates as plant growth-promoting rhizospheric (PGPR) or plant probiotic agents, i.e.: high growth rate, wide carbon source utilization, great rhizosphere colonization ability, important production of bioactive metabolites, aggressive competence for niche and a good adaptation to a variety of stresses. However, the fact that they do not sporulate limits formulation of commercial inoculants for long term storage (Weller 2007).

Depending on the plant probiotic effect, PGPR microorganisms can be classified into: 1) biofertilizers, with a direct effect on host plants (this grouping includes phytostimulators); 2) biocontrol or biopesticide strains, that act indirectly on plant growth (Haas, Défago 2005). Biofertilizer strains can directly enhance plant growth by producing phytohormones or the ethylene lowering enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, by synthesizing siderophores, by supplying biologically fixed nitrogen, or by solubilizing minerals like phosphorous. Biocontrol strains are able to protect plants from infection by phytopathogenic organisms (Bloemberg, Lugtenberg 2001; Haas, Défago 2005). The great majority of isolated probiotic pseudomonads have biofertilizer or biopesticide properties, although biological nitrogen fixation seems to be only restricted to some *P. stutzeri* strains (Desnoues et al. 2003).

The primary mechanism of biocontrol performed by pseudomonads is the production of antibiotics, namely DAPG, phenazines, PRN, PLT, HCN (Haas, Défago 2005; Weller 2007), and cyclic lipopeptides such as viscosinamide and tensin (Nielsen et al. 1999). Secreted hydrolytic enzymes like exoproteases, phospholipase C and chitinases also contribute to antagonism (Chernin et al. 1995; Heeb, Haas 2001). In addition to antibiosis, siderophore production and induced systemic resistance (ISR) were identified as important traits for fungal inhibition (Kloepper et al. 1980; Pieterse et al. 2003). Siderophores are small molecules that can bind the poorly soluble ferric ion and make it available for its assimilation. As iron is fundamental for life, its sequestration generates a decrease of iron available for pathogen growth and germination of fungal spores (Weller 2007), but this strategy is strongly dependent on soil pH (Haas, Défago 2005). Siderophores are also implicated in iron acquisition by plants, a direct effect for their growth promotion (O'Sullivan, O'Gara 1992). Pseudomonads produce various siderophores, mainly fluorescent yellow-green molecules referred to as pyoverdines or pseudobactins, and other non fluorescent compounds like pyochelin, pseudomonine, pyridine-2,6-dithiocarboxylic acid, quinolobactin, corrugatin and nocardamine, which can also complex metals other than iron, like cobalt, copper, nickel, zinc, vanadium and molybdenum (Cornelis 2010). Finally, ISR was discovered due to the ability of some PGPR strains to protect plants from leaf pathogens, as they can react more quickly and strongly to pathogen attack, though there was not any direct contact between microorganisms (Haas, Défago 2005). This effect mimics the systemic acquired resistance (SAR) mechanism, even though they are regulated

by different signal pathways (Pieterse et al. 2003). Several metabolites have been identified as ISR elicitors, like phenazines, 2R,3R-butanediol and 4-(aminocarbonyl)-phenylacetate (Park et al. 2008).

Despite the diverse probiotic properties already characterized in pseudomonads, its commercial use as inoculant is incipient. This is mainly due to the lack of formulations that ensure bacterial viability over long-time periods (Haas, Défago 2005). Another problematic issue is the large number of abiotic and biotic soil factors that regulate bacterial performance, that make excellent results in laboratory and greenhouse experiments to be not always reproducible in the field (Nelson 2004). We now have the tools to screen for the best isolates in terms of their widest spectrum of probiotic activities; therefore, a much deeper understanding about the expression of biocontrol traits in natural environments is required, to improve microbial utilization in favor of chemical compounds moving towards a sustainable agriculture (Haas, Défago 2005; Weller 2007).

Studying pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina

In Argentina, no-till management (NT) is the agricultural technique utilized in mostly all agricultural plots (AAPRESID), as a result of the demonstrated better crop yield results associated with the conservation of soil structure and water infiltration, among some others factors (Derpsch 2008). Despite of our knowledge about the benefits provided by this agricultural practice, there is very few information available about the biology of NT soils. As *Pseudomonas* is a prevailing bacterial genus recovered from diverse soils and plant rhizospheres, we decided to study the pseudomonad community in NT plots located in the humid Pampa, that is, the most productive area in Argentina. This research line is part of a large and multidisciplinary consortium dedicated to study soil biology in relation to crop productivity under sustainable agricultural management (BIOSPAS; <http://www.biospas.org>). Four geographical locations with different soil properties have been chosen, and three treatments have been defined: 1) good agricultural practices (GAP), as defined by AAPRESID; 2) bad agricultural practices (BAP), in which some or all requisites for GAP are not satisfied; 3) natural environment (NE) without human intervention as a control for the effect of agricultural practices. In each site, both soil (the first top 10 cm) and plant root systems are sampled from plots under these three treatments, in summer and winter time. Samplings started in summer 2010 and will continue at least for three years.

The culturable *Pseudomonas* community is studied upon plating soil and rhizosphere suspensions onto the highly selective S1 medium (Gould et al. 1985). We operationally define rhizosphere samples as the biological material recovered from thorough washings of roots that have been previously shaken by hand to remove loosely adhered soil. Thus, it is expected that our

«rhizosphere» suspensions contain bacteria from tightly adhered soil particles as well as from microcolonies present on the root surface. Platings on S1 medium serve both to quantitatively estimate the culturable bacterial load in soil and rhizosphere, and to select isolates for screening of plant probiotic activities and good crop colonization traits, looking for new inoculant strains. For instance, a number of pseudomonad isolates were obtained with a wide spectrum of antagonism to soil fungal pathogens also isolated from crop plants sampled at the same sites.

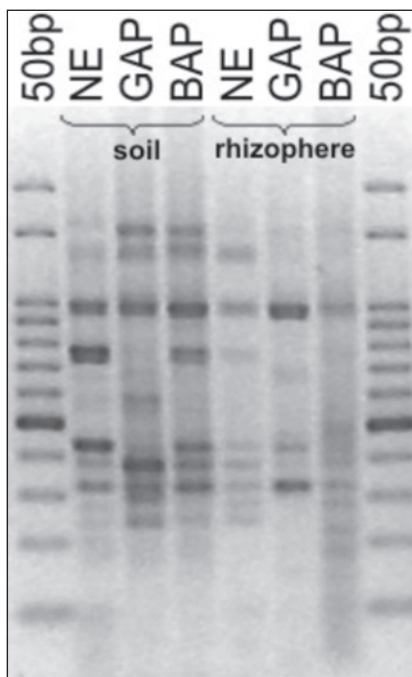


Figure 4: Molecular analysis of pseudomonad community by PCR-RFLP and selective enrichment of pseudomonads in the rhizosphere. The figure shows the *Hae* III-RFLP pattern of the *Pseudomonas* marker gene *oprF* from the most abundant pseudomonads present in soil and rhizosphere samples of all treatments from one geographical site studied in the BIOSPAS project.

In addition, S1 platings serve to obtain a source of DNA from the most abundant culturable pseudomonads to analyze its diversity at the molecular level. To this end, we resuspend all colonies from plates, lyse cells by thermal incubation, and use the supernatant as template for specific PCRs (*Polymerase Chain Reaction*). To approach the diversity of pseudomonads in the samples, we perform RFLP analyses (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) of the PCR products targeting internal fragments of two genes that are markers of

the *Pseudomonas* genus, *oprF* (encoding the major outer membrane porin OprF; Bodilis et al. 2006) (Figure 4) and *gacA* (encoding the response regulator GacA, see above). To confirm the assumption that the S1 medium is strictly selective for *Pseudomonas spp.*, and that the *oprF* PCR is genus-specific, we performed 16S rDNA and *oprF* sequencing of 50 colonies randomly picked up from S1 plates from different soil and rhizosphere sources. All 16S rDNA and *oprF* sequences confirmed that the picked S1 colonies were members of the *Pseudomonas* genus (data not shown), thus supporting the use of S1 platings and *oprF* PCR-RFLP as a mean to study the diversity of this bacterial group in NT soil and rhizosphere samples.

Plate counts of the first two samplings (summer and winter 2010) confirmed the known «rhizosphere effect» for pseudomonads, i.e., the total number of S1 CFU/g⁻¹ of rhizosphere material of different crops is higher by two orders of magnitude compared to the respective bulk soil (Figure 3). Platings also suggest a higher bacterial load in the soybean rhizosphere compared to maize, despite the plot treatment in which plants were sampled (Figure 3). In terms of diversity, PCR-RFLP analyses also revealed differences on the *Pseudomonas* community of soil and rhizosphere from the same plot in all geographical sites, suggesting that plant roots systems select specific strains from the surrounding soil. Digital processing and comparative analyses of *gacA* PCR-RFLP patterns preferentially grouped samples according to geographic sites but not by treatments (data not shown). On the other hand, *oprF* PCR-RFLP results did not reveal a defined grouping pattern yet. Overall, Shannon index calculations of soil PCR-RFLP patterns seem to indicate that the population diversity is higher in GAP plots than in BAP plots. These promising preliminary results about load and diversity of culturable pseudomonads prompted us to set up methods to evaluate the load and diversity of total pseudomonads (culturable plus unculturable) by means of direct DNA extraction from soil and rhizosphere samples, which are currently under development in our lab.

Conclusions and perspectives

Pseudomonads are members of soil prokaryotic flora and specific strains appear to be enriched in the rhizosphere of different plants. Many species display plant probiotic effects, a trait that turns these microorganisms interesting for application purposes. For some isolates, like *P. fluorescens* strain CHA0, the genetic determinants and regulatory mechanisms underlying the probiosis have been characterized in detail. This is the case of the Gac/Rsm cascade of strain CHA0, a system that serves to coordinate expression of genes related to biocontrol of plant root pathogens and escape to eukaryotic grazing, according to the cellular population density (Figures 1 and 2). Both in soils as well in the rhizosphere, *P. fluorescens* cells coexist with other micro- and macroorganisms. In this context, cellular communication is critical to coordinate biological activities for competition strategies. It sounds logic that

microcolonies with high cell densities developed in soil particles and on rhizoplane/rhizosphere, provide physiological conditions for induction of the Gac/Rsm cascade. This represents a benefit for plants colonized by this type of toxin producing bacteria, and at the same time, it favors persistence of these species over non producers that are preferentially predated by eukaryotes, thus influencing bacterial soil and rhizosphere community structure. In this regard, most of the available literature on diversity of pseudomonads in soil and rhizosphere of agricultural plots comes from foreign countries (Picard, Bosco 2008). We don't know yet how diverse are pseudomonads in agricultural soils in Argentina, which factors influence pseudomonads populations in agricultural soils, if there is any kind of specificity in crop rhizosphere colonization, if certain pseudomonad groups contribute to crop health. Hopefully, isolation and characterization of probiotic lineages locally adapted to soils and rhizospheres, will represent promising strains for agricultural purposes. The research project initiated in our lab as part of the BIOSPAS consortium, aims to provide answers to these issues, with approaches that examine pseudomonads from molecules into communities.

References

- AAPRESID. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. <http://www.aapresid.org.ar>
- Adesemoye A., Torbert H., Kloepper J. 2009. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58: 921-929.
- Alfano J., Collmer A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* 179: 5655–5662.
- Alvarez Crespo M.C., Valverde C. 2009. A single mutation in the *oprF* mRNA leader confers strict translational control by the Gac/Rsm system in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Curr Microbiol.* 58:182-188.
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50:1563-1589.
- Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A., Smalla K. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3328-3338.
- Bloemberg G., Lugtenberg B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opin Plant Biol.* 4: 343-350.

- Blumer C., Haas D. 2000. Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology*. 146:2417–2424.
- Bodilis J., Hedde M., Orange N., Barray S. 2006. OprF polymorphism as a marker of ecological niche in *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*. 8: 1544–1551.
- Buckling A., Kassen R., Bell G., Rainey P.B. 2000. Disturbance and diversity in experimental microcosms. *Nature*. 408: 961-964.
- Buckling A., Rainey P. B. 2002. The role of parasites in sympatric and allopatric host diversification. *Nature*. 420: 496-499.
- Campbell R., Greaves M.P. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. Lynch J.M., ed. *The Rhizosphere*. Chichester: Wiley & Sons. pp. 11–34.
- Chernin L., Ismailov Z., Haran S., Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1720–1726.
- Chin-A-Woeng T., de Priester W., van der Bij A., Lugtenberg B. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365 using scanning electron microscopy. *Mol Plant-Microbe Interact*. 10: 79-86.
- Cornelis P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol*. 86:1637-1645.
- Costa R., Gomes N.C., Krögerrecklenfort E., Opelt K., Berg G., Smalla K. 2007. *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environ Microbiol*. 9:2260-2273.
- Darwin C. 1859. *The Origin of Species*. London. Murray.
- Derpsch R. 2008. No-Tillage and conservation agriculture: A progress report. Goddard T, Zebisch M, Gan Y, Ellis W, Watson A, Sombatpanit S, eds. *No-till farming systems*. Special Publication nº 3, World Association of Soil Water Conservation (WASWC), Bangkok. pp. 7-11.
- Desnoves N., Lin M., Guo X., Ma L., Carreño-Lopez R., Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology*. 149: 2251–2262.
- de Souza J.T., Mazzola M., Raaijmakers J.M. 2003. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol*. 5:1328-1340.
- Dubuis C., Haas D. 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. 73:650-654.

- Fouts D., Badel J., Ramos A., Rapp R., Collmer A. 2003. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Hrp (Type III Secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:43-52.
- Garbeva P., van Veen J., van Elsas J. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol.* 42:243–270.
- Ginard M., Lalucat J., Tummler B., Romling U. 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. *Int J Syst Bacteriol.* 47:132-143.
- Govan, J.R., Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60:539-574.
- Gould C., Hagedorn T., Bardinelli R., Zablotowicz R. 1985. New Selective Media for Enumeration and Recovery of Fluorescent Pseudomonads from Various Habitats. *Appl Environ Microbiol.* 49:28-32.
- Goulian M. 2010. Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr Opin Microbiol.* 13:184-189.
- Grewal S., Han B., Johnstone K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Bacteriol.* 177:4658–4668.
- Haas D., Défago G. 2005. Biological Control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nat Rev Microbiol.* 3:307-19.
- Haas D., Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* 41:1171-53.
- Heeb S., Blumer C., Haas D. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.* 184:1046-1056.
- Heeb S., Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:1351–1363.
- Holt et al. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins; 9th edition. ISBN 0683006037.
- Jousset A., Lara E., Wall L.G., Valverde C. 2006. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol.* 72:7083-7090.
- Jousset A., Rochat L., Pechy-Tarr M., Keel C., Scheu S., Bonkowski M. 2010. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *ISME J.* 3:666-674.

- Jousset A., Rochat L., Scheu S., Bonkowski M., Keel C. 2010. Predator-prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol.* 76:5263-5268.
- Kamilova F., Kravchenko L., Shaposhnikov A., Azarova T., Makarova N., Lugtenberg B. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 19:250-256.
- Kassen R., Buckling A., Bell G., Rainey, P. B. 2000. Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. *Nature.* 406:508-512.
- Kay E., Dubuis C., Haas D. 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17136-17141.
- Kiewitz C., Tummeler B. 2000. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 182:3125-3135.
- Kirschner M., Gerhart J. 1998. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:8420-8427.
- Kimbril J., Givan S., Halgren A., Creason A., Mills D., Banowetz G. Armstrong D., Chang J. 2010. An improved, high-quality draft genome sequence of the germination-arrest factor-producing *Pseudomonas fluorescens* WH6. *BMC Genomics* .11: 522-537.
- Kloepper J., Leong J., Teintze M., Schroth M. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286:885-886.
- Lapouge K., Sineva E., Lindell M., Starke K., Baker C.S., Babitzke P., Haas D. 2007. Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Microbiol.* 66:341-356.
- Lapouge K., Schubert M., Allain F.H., Haas D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol.* 67:241-253.
- Latour X., Philippot L., Corberand T., Lemanceau P. 1996. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol Ecol.* 30:163–170
- Laville J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Défago G., Haas D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:1562-1566.
- Laville J., Blumer C., von Schroetter C., Gaia V., Défago G., Keel C., Haas D. 1998. Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol

- agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J Bacteriol. 180:3187-96.
- Lugtenberg B., Dekkers L. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? Environ Microbiol. 1:9-13.
- Lugtenberg B., Dekkers L., Bloemberg G. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. Annu Rev Phytopathol. 39:461-490.
- Matz C., Kjelleberg S. 2005. Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. Trends Microbiol. 13:302-307.
- Moyano A., Luján A., Argaraña C., Smania A. 2007. MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining *mucA* as the main target for mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 64: 547-559.
- Nelson, L. 2004. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): prospects for new inoculants. Crop Manag. doi: 10.1094-CM-2004-0310-05-RV.
- Nielsen M., Sørensen, J. 1999. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol. 30:217–227.
- Notz R., Maurhofer M., Schnider-Keel U., Duffy B., Haas D. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. Phytopathology. 91:873–881.
- Notz R., Maurhofer M., Dubach H., Haas D., Défago G. 2002. Fusaric acidproducing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl Environ Microbiol. 68:2229–2235.
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez, J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. Science. 288:1251-1254.
- Oliver A., Mena A. 2010. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect. 16:798-808.
- O’Sullivan D., O’Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol Rev. 56:662-676.
- Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S., Mavrodi D.V., DeBoy R.T., Seshadri R., Ren Q., Madupu R., Dodson R.J., Durkin A.S., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Sullivan S.A., Rosovitz M.J., Gwinn M.L., Zhou L., Schneider D.J., Cartinhour S.W., Nelson W.C., Weidman J., Watkins K., Tran K., Khouri H., Pierson E.A., Pierson L.S. 3rd, Thomashow L.S., Loper J.E. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nat Biotechnol. 23:873-878.

- Park M., Kim Y., Park J., Han S., Kim K., Lee S., Kim I. 2008. Identification of an ISR-related metabolite produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 against the wildfire pathogen *Pseudomonas syringae* pv.*tabaci* in tobacco. J Microbiol Biotechnol. 18:1659-1662.
- Picard C., Bosco M. 2008. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. Naturwissenschaften. 95:1-16.
- Pieterse C., van Pelt J., Verhagen B., Ton J., van Wees S., Léon-Kloosterziel K., van Loon L. 2003. Induced systemic resistance by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Symbiosis. 35:39-54.
- Rainey P., Bailey M. J. 1996. Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. Mol Microbiol. 19:521-533.
- Rainey P., Travisano M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. Nature. 394:69-72.
- Reimmann C., Valverde C., Kay E., Haas D. 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J Bacteriol. 187:276-285.
- Romanowski A., Migliori L., Valverde C., Golombek D. 2011. Circadian variation in *Pseudomonas fluorescens* (CHA0)-mediated paralysis of *Caenorhabditis elegans*. Microb Pathogenesis. 50:23-30.
- Sánchez-Contreras M., Martin M., Villacieros M., O’Gara F., Bonilla I., Rivilla R. 2002. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. J Bacteriol. 184:1587-1596.
- Schmidt K. D., Tummeler B., Romling U. 1996. Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. J Bacteriol. 178: 85-93.
- Schnider-Keel U., Seematter A., Maurhofer M., Blumer C., Duffy B., Gigot-Bonnefoy C., Reimmann C., Notz R., Défago G., Haas D., Keel C. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. J Bacteriol. 182:1215-1225.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Appl Environ Microbiol. 67:4742–4751.

- Sørensen J., Haubjerg Nicolaisen M., Ron E., Simonet P. 2009. Molecular tools in rhizosphere microbiology - from single-cell to whole-community analysis. *Plant Soil*. 321:483-512.
- Spangenberg C., Montie T. C., Tummeler B. 1998. Structural and functional implications of sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa* genes *oriC*, *ampC* and *fliC*. *Electrophoresis*. 19:545-550.
- Spiers A., Buckling A., Rainey P. B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*. 146:2345-2350.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., Doudoroff, M. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. 43:159-271.
- Stover C., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warren P., Hickey M., Brinkman F., Hufnagle W., Kowalik D., Lagrou M., Garber R., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y, Brody L., Coulter S., Folger K., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G., Wu Z., Paulsen I., Reizer J., Saier M., Hancock R., Lory S., Olson M. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959–964.
- Stutz E.W., Defago G., Kern H. 1986. Natural occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*. 76:81 -185.
- Thomas C.M. 2000. The Horizontal Gene Pool. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Valverde C. 2010. Cell-to-cell communication by quorum sensing in bacteria. In *Bacterial Populations: Basic and Applied Aspects of Their Structure and Evolution*. Ed. Dr. Aníbal Lodeiro. Research Signpost, India. ISBN 978-81-7895-486-8. pp. 7-35.
- Valverde C., Ferraris G. 2010. Las pseudomonas: un grupo heterogéneo con diversos mecanismos promotores del desarrollo vegetal. En «Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz». Ed. Alejandro Perticari. Editorial INTA, Argentina. ISBN 978-987-1623-46-4. pp. 23-43.
- Valverde C., Haas D. 2008. Small RNAs controlled by two-component systems. *Adv Exp Med Biol*. 631:54-79.
- Valverde C., Heeb S., Keel C., Haas D. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol*. 50:1361-1379.
- Valverde C., Lindell M., Wagner E.G., Haas D. 2004. A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulatory RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*. 279:25066-25074.

- van Elsas J., Trevors J., Starodub M. 1998. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. FEMS Microbiol Lett. 53:299–306.
- Walker T., Bais H., De'ziel E., Schweizer H., Rahme L., Fall R., Vivanco J. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* - plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol. 134:320–331
- Weller D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology. 97:250-256.
- Whipps J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J Exp Botany. 52:487-511.
- Zuber S., Carruthers F., Keel C., Mattart A., Blumer C., Pessi G., Gigot-Bonnefoy C., Schnider-Keel U., Heeb S., Reimann C., Haas D. 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol Plant Microbe Interact. 16:634-644.

Capítulo 11

Asociación entre *Azospirillum brasilense* y plantas de frutilla (*Fragaria ananassa*): quimiotaxis y colonización radicular

Association between *Azospirillum brasilense* and strawberry plants (*Fragaria ananassa*): chemotaxis and root colonization

Raúl O. Pedraza¹, María F. Guerrero-Molina¹, Beatriz C. Winik², María L. Tortora¹, Alicia L. Ragout³, Katia R. Teixeira⁴, Beatriz E. Baca⁵

¹Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900. (4000) Tucumán. Argentina. ²Centro Integral de Microscopía Electrónica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT. INSIBIO CCT-CONICET Tucumán. Chacabuco 461, (4000) Tucumán, Argentina. ³PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros. (4000) Tucumán. Argentina. ⁴Laboratório de Genética e Bioquímica. EMBRAPA Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro. Brasil. ⁵Centro de Investigaciones Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Cdad. Universitaria, Edif. 103. Col. San Manuel, 72570. Puebla, Pue. México.
E-mail: raulpedraza03@yahoo.com.ar

Introduction

The genus *Azospirillum* belongs to the so called «plant growth-promoting bacteria» (PGPB) group. PGPB were defined as free-living soil, rhizosphere, rhizoplane, and phyllosphere bacteria that, under certain conditions, are beneficial for plants (Bashan, Holguin 1998; Bashan, de-Bashan 2005). They are commonly used as inoculants to improve crop yields, and besides their agricultural utility, there are potential benefits in environmental applications (Bashan *et al.* 2008).

PGPB may promote plant growth in different ways (Bashan, Holguin 1998; Bashan, de-Bashan 2005): they can directly affect the metabolism of the plants by providing substances that are usually in short supply. For instance, they are capable of fixing atmospheric nitrogen, solubilize phosphorus and iron, and enhance production of plant hormones such as auxins, gibberellins and cytokinins. In addition, they improve the plant tolerance to stresses, such as drought, high salinity, metal toxicity, and pesticide load. One or more of these mechanisms may contribute to the increased plant growth and development, greater than plants grown under standard cultivation conditions.

In the other side, there is a group of PGPB, referred to as biocontrol-PGPB (Bashan, Holguin 1998), that indirectly promote plant growth by preventing

deleterious effects of phytopathogenic bacteria, fungi, nematodes and viruses. Added to their value as crop inoculants, the potential benefits of PGPB have been used in recent years in environmental applications. For example, *Azospirillum* species enhance bioremediation of wastewater treated with microalgae by increasing proliferation and metabolism of the microalgae; hence increasing the effectiveness of the microalgae to clean wastewater better than when used without PGPB (Bashan et al. 2008).

For many agronomic crops significant increases in growth and yield in response to inoculation with PGPB have been reported (Asghar et al. 2002; Bashan et al. 2004; Biswas, et al. 2000). The application of this type of bacteria has resulted in an evident plant growth-promotion, observing an increase in the emergence, vigour, biomass production, root system development and enhancement of up to 30% in the production of commercially important crops, such as sorghum (Raju et al. 1999; Vikram 2007), tomato (Gravel et al. 2007; Siddiqui, Shaukat 2002), maize (Kozdroja et al. 2004), wheat (Ozturk et al. 2003; Khalid 2004), and various grains (Dobbelaere et al. 2001).

Most of the bacterial-plant associations occur in the rhizosphere, the soil area that is strongly influenced by plant roots (Vanbleu, Vanderleyden 2003). These associations are initiated in response to exchange of signals triggered from the microbe-plant interaction (Vanbleu, Vanderleyden 2003). The rhizosphere is rich in nutrients, due to the accumulation of a variety of organic compounds released by roots through exudation, secretion, and deposition (Curl, Truelove 1986). These compounds can be used as carbon and energy sources by microorganisms, stimulating the microbial activity, particularly intense in the rhizosphere. This was reflected by the number of bacteria found around the roots that are generally 10 to 100 times higher than outside the rhizosphere (Weller, Thomashow 1994).

Many bacteria use a complex performance called taxis to sense specific chemicals or environmental conditions and move towards attractants and away from repellents (Adler 1966). Bacterial taxis is directly involved in interactions with plant host as a principal step in the colonization process (Kato et al. 2008; de Weert 2002). Taxis, especially chemotaxis, together with the mechanism of signal transduction and response regulation, have been well studied in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Stock, Surette 1996). Chemotactic ligands are detected by cell surface chemoreceptors called methyl-accepting chemotactic proteins (MCPs). Upon binding a chemotactic ligand, MCPs generate chemotactic signals that are communicated to the flagellar motor via a series of chemotaxis (Che) proteins (Stock, Surette 1996).

The genus *Azospirillum* belongs to the α -subdivision of Protobacteria and has been isolated from the rhizosphere of many plant species in different regions of the world, including tropical and temperate climates. The species belonging to this genus are motile and exhibit chemotaxis to several compounds found in roots exudates. The bacterial mobility in the rhizosphere responds to the

chemotaxis, which allows them to move towards the roots to obtain benefits from root exudates (mainly carbon and nitrogen compounds) (Pedraza et al. 2010).

Azospirillum was found in places where the oxygen concentration is optimal for biological nitrogen fixation (Barak et al. 1982); some bacterial strains associated on the root surface and others colonizing the root interior (Döbereiner, Pedrosa 1987), where there is less competition for available substrates, which is very important due to the high demand for the energy required for nitrogen fixation (Falk et al. 1985).

Motility provides a survival advantage under a wide variety of environments, allowing bacteria to respond to beneficial or negative conditions and to compete successfully with other microorganisms. *Azospirillum brasilense* possesses a polar flagellum in all culture conditions, and synthesizes lateral flagella when growing on semisolid media (Hall, Krieg 1983). The flagella of *Azospirillum* are one of the most complex and effective organelle for locomotion, capable of propelling the bacterium through liquids (swimming) and through viscous environments or over surfaces (swarming). Additionally, these organelles play an important role in adhesion to substrates and biofilm formation contributing to the interaction with the plant (Croes et al. 1993). The bacterial colonization of at least part of the root system is required for the favourable effects of *Azospirillum* inoculants when applied as biofertilizer and phyto-stimulators (Okon, Vanderleyden 1997).

Different varieties of strawberry are cultivated in diverse parts of the world, including tropical, subtropical, and temperate areas. Besides its commercial interest, this crop is of great social interest due to the high demand of workers required for its production and processing at the field, packing, and industry (Pedraza et al. 2007). The world production of strawberry is around three million tons per year and it has increased in the last two decades. The annual world production in 2007 was over 3.8 million metric tons, figure that is still rising (FAO agricultural data: <http://faostat.fao.org/faostat/>). Argentina produces strawberry during the 12 months of the year, being the province of Tucumán one of the most important producers (Pérez, Mazzone 2004).

Although this crop is frequently cultivated in soils with good natural fertility, chemical fertilizers, mainly nitrogen, are applied at levels greater than 290 kg.ha⁻¹.year⁻¹ to improve fruit yields (Pedraza et al. 2007). The high rate of application of fertilizers and pesticides have negative and unpredictable effects in the environment, contributing to the contamination of soils, water, and natural areas, casting serious risks to human and animal health. An attractive alternative for the total or partial substitution of nitrogen fertilizers could be the exploitation of PGPB, such as bacteria of the genus *Azospirillum*, capable of affecting growth and yield of many plant species, several of agronomic and ecological significance.

It was demonstrated the natural occurrence of *A. brasilense* colonizing strawberry plants, including inner tissues of roots and stolons (Pedraza et al.

2007). The latter would provide an additional agronomic advantage, considering the asexual propagation of strawberry plants in commercial nurseries, by stolon fixation on the ground. Thus, if strawberry plants are inoculated with *Azospirillum* strains selected by their PGPB characteristics, the presence of this bacterium could be insured in their descendants.

From the results of inoculating strawberry plants with different strains of *A. brasilense*, and considering that the best plant growth-promotion depends on the interaction between specific genotypes of bacteria and plants (Pedraza et al. 2010a), the use of this genus represents an interesting option for higher agricultural production and significant ecological advantages. Therefore, in this chapter it is considered the chemotaxis of *A. brasilense* towards root exudates of strawberry plants and root colonization as a starting point for a successful partnership between *Azospirillum* and strawberry plants.

Chemotaxis in *Azospirillum*

It has been demonstrated that *A. brasilense* polar flagellum rotates in both clockwise and counterclockwise directions. The last one causes forward movement of free-swimming cells, while the change in the direction of rotation to clockwise produce a reversal in swimming direction. When *Azospirillum* cells are exposed to malate, a strong attractant, some effects in swimming behaviour are observed: suppression of direction change, the chemotaxis, and a long term-increase in swimming speed as chemokinesis (Zhulin, Armitage 1993). In fact, *Azospirillum* strains respond chemotactically to temporal gradient of some effectors such as amino acids, sugars and organic acids, as well as to maize mucilage. This behaviour is strain dependent, suggesting that a certain degree of specificity exists in the establishment of plant-bacteria interaction (Reinhold et al. 1985; Mandimba et al. 1986). The presence of oxidizable substrates increased the number of attracted bacteria only 1.2 to 3-fold, a rather low ratio, compared with other bacteria. Further work revealed that the attraction was to oxygen gradient dissolved in water, and the exposure of the cells to an oxygen gradient followed by aerotaxis, masked the chemotactic response of the bacteria (Barak et al. 1982). Consequently, aerotaxis is an important response in *A. brasilense*, which guide the bacterium to a preferred low oxygen concentration for energy generation (3 to 5 μM). Indeed, the proton motive force was lower at oxygen concentrations that were higher or lower than the preferred oxygen concentration. It was suggested for *A. brasilense* that reaching the optimal oxygen concentration is relevant for energy generation and nitrogen fixation in the rhizosphere (Zhulin et al. 1996). Recently, it was described a quimiotactic cytoplasmic receptor noted as AerC, that was able to detect the redox status of cell via the FAD cofactor associated to its PAS domains. The expression of AerC as well as FAD content in cells were enhanced under nitrogen fixation conditions, indicating a correlation between quimiotaxis and changes in redox homeostasis necessary for nitrogen fixation (Xie et al. 2010).

There were described several ways to sense chemicals: chemotaxis usually is referred as a metabolism-independent behaviour, while the use for «energy taxis» denotes metabolism-dependent behaviour. Energy taxis is broadly defined as a behavioural response to stimuli that affect cellular energy levels. It includes responses directly linked to electron transport/energy generation, such as aerotaxis, redotaxis and phototaxis (Taylor, Zhulin 1998). The most important behaviour in *A. brasilense* is energy taxis and it was demonstrated that certain compounds that are attractants for *Azospirillum* cells are also metabolizable substrates, while their nonmetabolizable analogues are not attractants. On the other hand, the inhibition of the metabolism of a chemical attractant completely abolishes chemotaxis to this compound. Moreover, it was observed a direct correlation between the efficiency of a chemical compound as growth substrate and as chemoeffector (Alexandre et al. 2000).

Chemicals that interact directly as inhibitors of electron transport were found to be strong repellents, and most important, a mutant lacking the cytochrome *ccb₃*-type terminal oxidase had significantly diminished chemotaxis to all major attractants, but only under microaerobic conditions. When it was assayed under fully aerobic conditions, where this respiratory system is not functional, chemotactic responses in the mutant and wild-type strain were identical. The results showed that the signal for chemotaxis toward major attractants and repellents was originated within a functional electron transport system in *A. brasilense* (Alexandre et al. 2000).

It was also demonstrated that by genetic complementation of a mutant strain of *A. brasilense*, impaired in surface motility led to identification of the gene *chsA* (chemotactic signaling protein) (Carreño-López et al. 2009). The deduced translation product, ChsA protein, contained a PAS sensory domain and EAL active site domain. This latter has phosphodiesterase activity (PDE-A) for the hydrolysis of c-di-GMP [cyclic-bis (3'-5') dimeric GMP], a compound known to function as a second messenger in different cellular processes including motility, biofilm formation and cellular differentiation (Carreño-López et al. 2009). After cloning *chsA*, ChsA protein was expressed and purified by affinity chromatography. ChsA activity in presence of *bis-p*-nitro phenyl-phosphate was 0.59 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, demonstrating that it displayed phosphodiesterase activity. This suggested that ChsA is a component of the signaling pathway controlling chemotaxis in *Azospirillum*, and that the redox state of the cell is sensed through the PAS domain and directly coupled to the transmitter EAL module, showing PDE-A activity (Carreño-López et al. 2009; Pedraza et al. 2010b).

Bacterial motility and chemotaxis in *Azospirillum*-plant interaction

It was reported that certain strains of *A. brasilense* show positive chemotaxis

towards different attractants such as sugars, amino acids, organic acids (Okon et al. 1980; Barak et al. 1982; Reinhold et al. 1985; Zhulin, Armitage 1992), as well as to root exudates (Heinrich, Hess 1985; Mandiambra et al. 1986; Okon et al. 1980; Bacilio-Jiménez et al. 2003; Pedraza et al 2010a). This mobility is important as it allows bacterial access to a more suitable habitat and become more competitive about other microorganisms in the soil.

In natural environments, soil moisture is a limiting factor in the migration of *A. brasilense* to the roots (Bashan 1986). This suggests that the «swimming movement» plays an important role in such environments. The ability of *A. brasilense* to begin the root colonization of wheat was investigated with different mutant strains (Vande Broek et al. 1998). Only non-flagellated and non-chemostatic mutants showed a strong reduction in the ability for wheat root colonization (Vande Broek et al. 1998).

Bashan and Holguin (1994) compared the inter-root movement of *A. brasilense* wild-type and its isogenic non-motile strain, inoculated into the root system of soybean and wheat seedlings, in presence of chemoattractants and repellents. They found high differences between both strains; no movement of *A. brasilense* Mot⁻ cells was detected. The inoculated *A. brasilense* Mot⁻ remained at the seed inoculation and did not migrate with the root tips, whereas the wild-type strain displayed a different pattern: Mot⁺ cells migrated several centimetres from inoculated to non-inoculated roots, irrespectively of plants species. This indicate that motility and chemotaxis are active processes involved in efficient colonization (Bashan, Holguin 1994)

By using the β -galactosidase activity as a reporter system it was demonstrated that only motility and chemotactic mutants of *A. brasilense* Sp7 wild-type strain were affected in their capacity to initiate wheat root colonization at the root hair zone (van Rhijn et al. 1990). Indeed, the β -galactosidase activity determined by qualitatively and quantitatively assays from NM313 mutant strain (altered in chemotaxis to succinate and citrate), and Sp7p90D84 strain (a non-flagellated mutant) (van Rhijn et al. 1990), differed significantly from Sp7 wild-type strain in colonization to root wheat. This also indicates that chemotactic movement is important in the initiation of wheat root colonization (Vande-Broek et al. 1998).

In the rhizosphere, it may be advantageous to respond positively to any compound that increases metabolic rates, such as organic acids and oxygen. Low oxygen concentrations, typically in the rhizosphere, are seen to be one of the main stimuli that attract bacteria to plant roots. Thus, aerotaxis in the rhizosphere would be also expected to provide a real advantage to bacteria when searching for nutrients and in competition with other microorganisms (Barak et al. 1982; Zhulin, Armitage 1993).

Chemotaxis of *A. brasilense* towards strawberry root exudates

The positive chemotactic response of different strains of *A. brasilense*

towards root exudates of three cultivars of strawberry plants ('Milsei', 'Selva', 'Camarosa') was visualized by halo formation on culture medium surface (Pedraza et al. 2010a). Results showed that the main effects of the factor variety ($p < 0.01$) and the dilution factor ($p < 0.05$) were statistically significant, as well as the interaction between bacterial strain and strawberry variety ($p < 0.05$), indicating that the chemotactic response of the strain depended on the variety of the plant.

Also, the effect of time in collecting root exudates from different strawberry varieties in the chemotactic response of different strains of *Azospirillum brasilense* was assessed (Pedraza et al. 2010a). In all cases, it was observed higher number of positive responses to root exudates collected at 7 and 14 days of plant growth. Furthermore, endophytic strains, isolated from sterile roots, showed higher chemotactic response with halo formation areas greater than 200 mm². A low chemotactic activity was observed in strains isolated from the rhizosphere and the first stolon of strawberry plants, which showed in all cases halos surfaces minor to 200 mm². The best chemotactic response was obtained with strain *A. brasilense* REC3, which showed halos greater than 200 mm² for root exudates taken at 7 and 14 days of plant growth, from variety 'Camarosa'. The strain RLC3 showed halo formation with surfaces smaller than 200 mm², being the one with less chemotactic response towards the root exudates of the three strawberry varieties collected at different times (Pedraza et al. 2010a).

From the results obtained in testing agarose-plates (Pedraza et al. 2010a), three bacterial strains were chosen to quantify the chemotactic response by capillary method and determine the R_{chem} (chemotaxis index) of them: REC3 as the strain of higher chemotactic response, RLC3 as the lowest response, and Sp7 as control. The quantification of the chemotactic effect was performed by using the capillary method according to Guocheng and Cooney (1993). The strain REC3 showed the highest chemotactic activity with exudates from the three varieties of plants taken after 7 days of growth. The highest values were obtained with the variety 'Camarosa' (11.98 ± 2.39), followed by the variety 'Milsei' (6.33 ± 0.59) and 'Selva' (3.11 ± 0.45). These results agree with those obtained by the plate method. The minimum value obtained for this strain was 1.47 with exudates of the variety 'Selva' taken at 28 days.

The results determined by the capillary method confirmed that the chemotactic activity depends on the bacterial strain, plant variety, and time of collection of the exudates (Pedraza et al. 2010a). Although the chemotactic response towards strawberry root exudates was performed through two approaches: the method of plates and the quantitative method of capillaries, similar results were obtained in both cases (Pedraza et al. 2010a).

To explain the chemotactic behaviour previously observed, total sugars and proteins content of root exudates were determined (Pedraza et al. 2010a).

The higher amount of sugars was detected in root exudates obtained at 7 days of plant growing of the three varieties ('Milsei', 'Selva', 'Camarosa'), then, a decrease of them was observed at 14 and 28 days. The amount of total sugars varied among plant varieties, being 'Milsei' the highest producer at 7, 14 and 28 days as compared with 'Camarosa' and 'Selva'. The maximum concentration of sugar ($0.0806 \text{ mg.ml}^{-1}$) was found in root exudates of the variety 'Milsei' taken at 7 days of plant growth, followed by exudates from the variety 'Selva' ($0.0629 \text{ mg.ml}^{-1}$), taken in the same period, and finally in the variety 'Camarosa' ($0.0466 \text{ mg.ml}^{-1}$). The minimum value of sugar concentration ($0.0219 \text{ mg.ml}^{-1}$) was determined in root exudates taken at 28 days from variety 'Camarosa'. The variety 'Selva' showed its lowest concentration ($0.0245 \text{ mg.ml}^{-1}$) in exudates obtained at 14 days and in the variety 'Milsei' the lowest value ($0.0358 \text{ mg.ml}^{-1}$) was detected at 28 days of plant growth. The decrease in total sugar concentration determined in hydroponic culture after the second week, probably was caused by two potential mechanisms: the accumulation of high levels of organic substances in the vicinity of the roots that suppressed the release of additional organic compounds (Jones, Darrah 1993; Prikryl, Vankura 1980), and the re-absorption of organic compounds by the plant (Guckert et al. 1991; Jones, Darrah, 1993).

In contrast, protein concentration of the root exudates was only detected after 14 and 28 days of plant growth. At 28 days, in 'Camarosa' it was determined the maximum value (0.030 mg.ml^{-1}), followed by the variety 'Milsei' (0.024 mg.ml^{-1}) and finally the variety 'Selva' with a concentration of 0.019 mg.ml^{-1} . The minimum detected value was 0.018 mg.ml^{-1} in the variety 'Selva', then 'Milsei' with 0.024 mg.ml^{-1} and finally 'Camarosa' (0.025 mg.ml^{-1}), all determined at 14 days of plant growth.

Colonization of strawberry plants by *A. brasilense*

Azospirillum spp. are generally referred to as rhizosphere bacteria, displaying strain-specific differences concerning root colonization. They colonize mainly the root surface; however, some strains are able to colonize plant internal tissues as endophytic bacteria that invade tissues of living plants showing no external sign of infection or negative effect on the host (Steenhoudt, Vanderleyden 2000; Schulz, Boyle 2006). Ultrastructural studies of *Azospirillum* localization on roots surface revealed that it can be found all along inoculated root systems (Okon, Vanderleyden 1997), but they are concentrated on the elongation zone, root hairs (Levanony et al. 1989; Bashan, Levanony 1989a; Bashan et al. 1986), root tips (Bashan, Levanony 1989b), the base of root hairs (Katpulkan et al. 1985) and in few cases on root hair tips (Bashan, Levanony 1989a). The attachment of *Azospirillum* to the plant roots is essential for efficient association with

the host plant; although much evidence indicates that extracellular polysaccharides and proteins are involved in the root attachment process, the precise mechanism of colonization remains unclear (Vanbleu, Vanderleyden 2003).

The endophytic and rhizosphere colonization of strawberry roots by *Azospirillum brasilense* was studied by using fluorescence microscopy and scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM) (Guerrero-Molina et al. 2010a). With this purpose, the wild type (wt) strain of *A. brasilense* REC3 (BR12242) was used to inoculate plants for SEM and TEM analysis. For fluorescence microscopy studies, the plants were inoculated with the same strain tagged with the broad-host-range vector pHRGFPTC expressing green fluorescent protein (*gfp*) gene constitutively from the *p_{gen}* promoter. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH10B and then mobilized into *A. brasilense* REC3 strain by triparental matting using *E. coli* pRK2013 as helper. Strawberry *in vitro* plants var. 'Camarosa' and 'Selva' were aseptically grown on test tubes containing 20 ml 50% Hoagland solution (Hoagland 1975) and they were independently inoculated with 1 ml of bacterial suspension (about 10^6 CFU·ml⁻¹) containing wt REC3 or REC3::*gfp* strains (Guerrero-Molina et al. 2010a).

SEM observations of inoculated strawberry roots showed bacteria firmly attached to the root surface by a network of fibrillar-like material (Fig. 1a) produced by bacterial cells as it can also be observed over *Azospirillum* pure colony cells (Fig. 2). According to Vanbleu and Vanderleyden (2003), the fibrillar network allows the bacteria to anchor to roots for better access to plant exudates, and reciprocally, allows the plant to reach substances excreted by the bacteria before consumption by other bacteria. Additionally, it provides resistance against external physical forces applied to the root, such as washing and agitation (Bashan et al. 1991). The fibrillar-like connections observed over *A. brasilense* REC3 and PEC5 (Winik et al. 2009; Guerrero-Molina et al. 2010a) were similar to those exhibited by *A. brasilense* Cd adsorbed to wheat roots (Bashan et al. 1986), grass roots (Umali-Garcia et al. 1980) and sand particles (Bashan et al. 1991). Although this material was demonstrated to participate in the attachment of bacterial cells to biotic and abiotic surfaces, its chemical composition is still discussed. Numerous studies affirm that proteinaceous compounds may be involved in *A. brasilense* aggregation (Madi, Henis 1989; Burdman et al. 1999), bacterial binding to roots (Bashan, Levanony 1988; Michiels et al. 1991) and sand particles (Bashan et al. 1991). Likewise, many authors affirm the involvement of extracellular polysaccharides in the attachment process to roots (Michiels et al. 1991; Burdman et al. 1998). Besides the fibrillar-like connections, bacterial cells were also found associated with granular-like material accumulated on the root surface of strawberry plants (Fig.1b); these may probably correspond to rhizodepositions that participate in the bacteria-plant association (Winik et al. 2009; Guerrero-Molina et al.

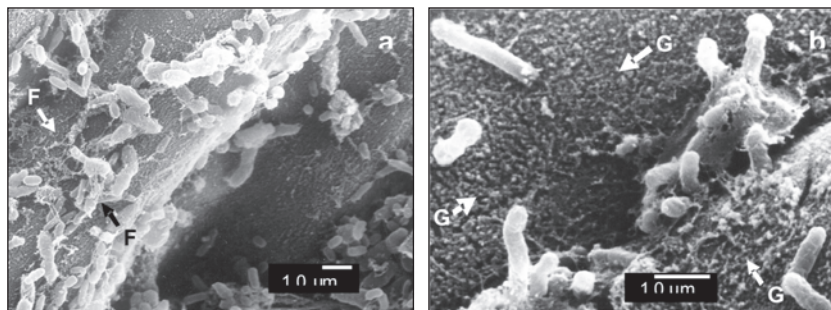


Figura 1 (a, b): SEM of *A. brasilense* REC3 attached to the surface of strawberry roots; arrows indicate the fibrillar-like **F** and granular-like **G** material over the root surface.

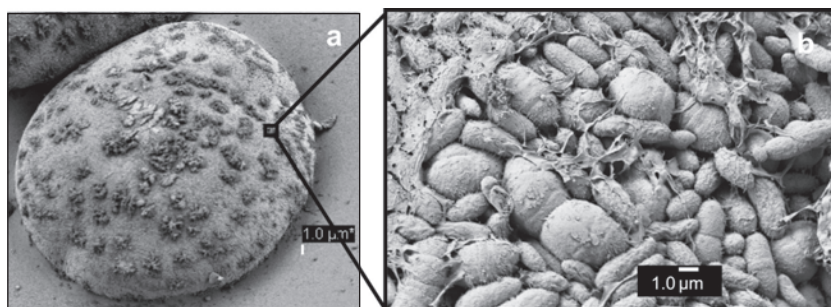


Figura 2: (a) Single pure *A. brasilense* colony grown on Nfb solid medium observed by TEM. **(b)** Enlargement of framed area in **(a)** showing the fibrillar-like material on top of bacterial cells.

2010a). Considering that strawberry plants are asexually reproduced at nursery by fixing stolons into the soil, the translocation of *Azospirillum* through stolons from inoculated mother-plants to uninoculated new-born daughter plants represents an important agronomic advantage. According to this latter only one inoculation would allow the producers to have many plant generations already inoculated with selected bacteria, thus, these plants would have better conditions to be placed at field.

A. brasilense REC3 showed three patterns of bacterial cell adsorption to strawberry root surfaces: single-cells randomly dispersed along the root, small bacterial aggregates and biofilm formation (Fig. 3) (Winik et al. 2009; Guerrero-Molina et al. 2010a). These different adsorption patterns, observed by SEM, are probably common features of this genus as they have been previously described (Levanony, Bashan 1991; Levanony et al. 1989; Bashan et al. 1986; Umali-Garcia et al. 1980). Also, the random and non polar orientation of *A. brasilense* cells over the root surface has been observed by other authors (Levanony et al. 1989; Bashan et al. 1991; Umali-Garcia et al. 1980).

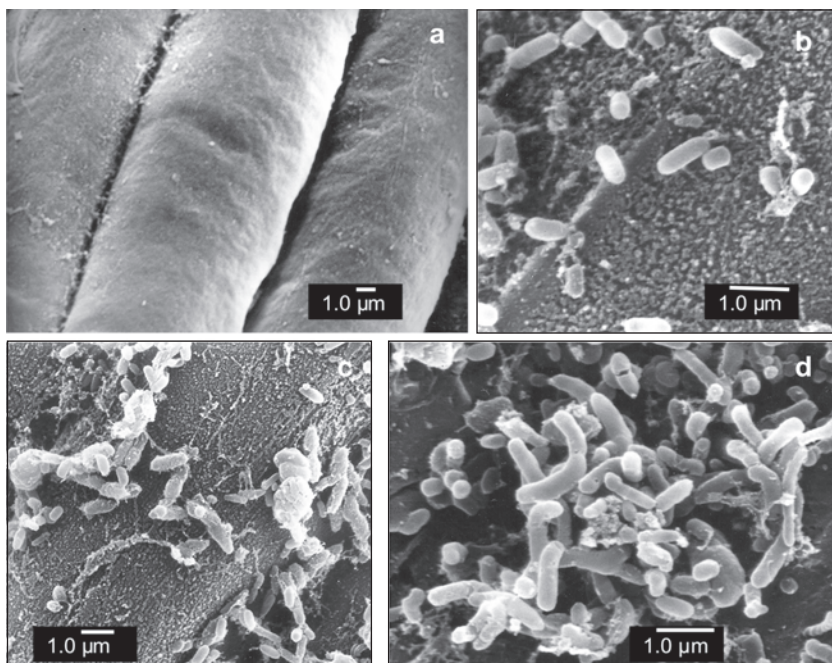


Figura 3: Scanning electron micrographs of strawberry roots colonized by *A. brasilense*. (a) roots without associated bacteria; (b) bacteria as single cells on the root surface; (c) small bacterial aggregates; (d) *A. brasilense* biofilm.

To confirm the endophytic root colonization by this strain, fluorescence microscopy and TEM were carried out. Fig. 4a shows *Azospirillum* colonization of inner tissues of strawberry roots observed by TEM, in comparison to uninoculated roots without associated bacteria (Fig 4b). Besides confirming the endophytic colonization, fluorescence microscopy allowed the localization of *A. brasilense* in intercellular spaces of the cortex (Guerrero-Molina et al. 2010a).

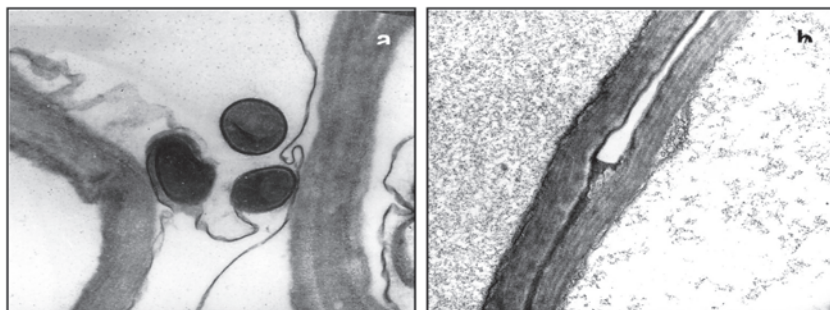


Figura 4: (a) Transmission electron micrographs of bacteria colonizing inner tissues of strawberry roots (x18,700); (b) root without associated bacteria(x33,300).

Considering that strawberry plants are asexually reproduced at nursery by fixing stolons into the soil, the translocation of *Azospirillum* through stolons from inoculated mother-plants to uninoculated new-born daughter plants represents an important agronomic advantage. According to this latter only one inoculation would allow the producers to have many plant generations already inoculated with selected bacteria, thus, these plants would have better conditions to be placed at field.

The endophytic translocation of *Azospirillum brasilense* through strawberry stolons was studied by microbiological, ultraestructural and molecular methods (Guerrero-Molina et al. 2010b). Three commercial cultivars of strawberry ('Camarosa', 'Milsei', 'Selva') were inoculated with two strains of *A. brasilense*, REC3 and PEC5, isolated from sterilized roots and stolons of strawberry plants respectively (Pedraza et al. 2007).

Microbiological studies demonstrated that it was possible to re-isolate *A. brasilense* REC3 and PEC5 from roots and stolons of all inoculated mother-plants and non-inoculated daughter-plants. In all cases, most probable number (MPN) values of *Azospirillum* isolated from roots were higher than values obtained from stolons. The MPN determinations ranged from $1.5 \cdot 10^3$ bacteria·g⁻¹ to $4.5 \cdot 10^6$ bacteria·g⁻¹ for fresh root samples and from $1.1 \cdot 10^1$ bacteria·g⁻¹ to $4.5 \cdot 10^4$ bacteria·g⁻¹ for fresh stolon samples (Guerrero-Molina et al. 2010b). This demonstrates that roots are the most advantageous ecological niche for the development of these bacterial strains (Guerrero-Molina et al. 2010b).

Electron microscopy observations of colonized strawberry stolons showed clear attachment of *A. brasilense* to the stolon inner tissues. SEM also revealed *Azospirillum* cells gathered on groups and enclosed with a condensed capsular material in the vascular vessels area (Fig. 5). Similar ultrastructural characteristics were observed in pure colonies grown on NFb solid medium (Fig. 2b). The presence of *A. brasilense* inside stolons and its isolation from uninoculated daughter-plant roots confirmed the translocation of the bacteria throughout stolons from inoculated mother plants to the new-born plants (Guerrero-Molina et al. 2010b).

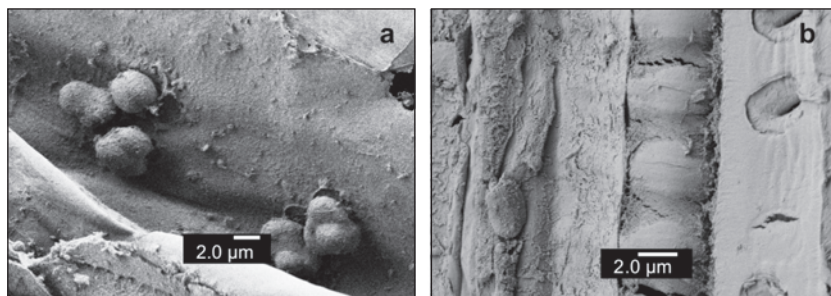


Figura 5: (a) SEM of bacteria colonizing inner structures of strawberry stolon; note bacterial cells gathered on groups in the stolon vascular zone; (b) stolon of strawberry plants without bacterial inoculation.

The preferential bacterial colonization of roots can be explained considering that the root area is filled with nutrients and has adequate microaerobic conditions for biological nitrogen fixation (Steehnoudt, Vanderleyden 2000). Conversely, the low stolon colonization (expressed as low MPN and few associated bacteria observed in their inner structures) and the condensed capsular material showed by *A. brasilense* inside the stolons, could reflect an ecological adaptation of *A. brasilense* strains to an unfavourable environment. Therefore, Guerrero-Molina et al. (2010b) stated that *A. brasilense* uses strawberry stolons only as a path in its way to colonize the roots of a new-born daughter plant.

Additionally, the presence of the bacteria within strawberry plant tissues was also demonstrated by molecular results as a 710 bp fragment of the gene *nifD* of the nitrogenase enzyme, essential for the biological N₂-fixing process, was amplified by PCR from DNA samples of stolons and roots colonized by *A. brasilense* (Guerrero-Molina et al. 2010b).

Conclusions

Root exudates from different varieties of strawberry plants can produce positive chemotaxis of different strains of *A. brasilense*. This effect was greater with endophytic strains than with those that colonize the root surface. Similar results were observed by Bacilio-Jiménez et al. (2003) about the chemostatic response of endophytic and rhizosphere bacteria toward root exudates in rice.

In the case of strawberry, the chemotactic behaviour of different strains of *A. brasilense* towards strawberry root exudates depends on the plant variety, where the best chemostatic response was obtained with exudates of the variety 'Camarosa'. However, differences in responses may be due to the origin of the bacterial strains (rhizosphere or endophytic). Furthermore, the specificity of strains probably reflects the adaptation of the bacterium to the nutritional conditions provided by the plant and can, thus, play an important role in the establishment of *Azospirillum* in the rhizosphere of the host, as previously indicated by Reinhold et al. (1985).

The concentration of strawberry root exudates can affect chemotactic response, as the best response was observed when using a low concentration. This agrees with other studies regarding the ability of *Azospirillum* to detect potential sources of nutrients at lower concentrations than other soil microorganisms, favouring its survival in natural environments (Chet, Mitchell 1976; Roszak, Colwell 1987). In addition, the time elapsed in the root exudates production has effects on chemotaxis as a major chemotactic response was observed towards the exudates produced within the first two weeks of plant growth.

Root exudates obtained from strawberry plants cultured in hydroponic conditions showed a decreased concentration of carbohydrates with the

production time, and an increase in protein concentration. This would indicate that probably the sugar residues have a greater attractive effect than protein, at least in the early stages of this partnership.

SEM observations of inoculated strawberry roots demonstrated colonizing bacteria firmly attached to the root surface by a network of fibrillar-like material, and also associated with granular-like material accumulated on the root surface. Bacterial cells were observed by SEM on the root surfaces as single-cells randomly dispersed along the root, small bacterial aggregates and biofilm formation.

Fluorescence microscopy and TEM revealed the colonization of strawberry inner root tissues by *A. brasilense*, being located in intercellular spaces of the cortex. Besides, SEM observations showed bacterial colonization of stolon inner tissues. *A. brasilense* was reisolated from inoculated strawberry mother-plants, uninoculated daughters and stolons. In all cases, the MPN from root samples was higher than from stolons, indicating that the effective colonization of the root system leads towards bacterial translocation throughout stolons. In addition, a 710 bp fragment of the bacterial *nifD* gene was PCR-amplified using DNA from roots and stolons, confirming the presence of the inoculated bacteria within these tissues.

By assessing the chemotactic activity of different strains of *A. brasilense* and by microscopy methods it was possible to observe the affinity of certain genotype in the association *Azospirillum*-strawberry plants. Considering that *A. brasilense* posses biotechnological application, addressing to a sustainable agriculture, the determination or the screening of the chemotactic activity of different strains towards root exudates may represent an initial step in selecting them for use as inoculants in different crops.

References

- Adler J. 1966. Chemotaxis in bacteria. *Science*. 153:708-716.
- Alexandre G., Greer S.E., Zhulin I.B. 2000. Energy taxis is the dominant behaviour in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol*. 182:6042-6948.
- Asghar H.N., Zahir Z.A., Arshad M., Khaliq A. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol Fertil Soil*. 35:231-237.
- Bacilio-Jimenéz M., Aguilar Flores S., Ventura-Zapata S., Pérez-Campo S., Bouquelet Zenteno E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*. 249: 271-277.

- Barak R., Nur I., Okon Y., Henis Y. 1982. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. J Bacteriol. 152:643-649.
- Bashan Y. 1986. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. Appl Environ Microbiol. 51:1067-1071.
- Bashan Y., Levanony H., Klein E. 1986. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. J Gen Microbiol. 132:3069-3073.
- Bashan Y., Levanony H. 1988. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. J Gen Microbiol. 134:1811-1820.
- Bashan Y., Levanony H. 1989a. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. Can J Microbiol. 35:936-944.
- Bashan Y., Levanony H. 1989b. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. J Gen Microbiol. 135:2899-2908.
- Bashan Y., Mitiku G., Whitmoyer R.E., Levanony H. 1991. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. Plant Soil. 132:73-83.
- Bashan Y., Holguin G. 1994. Root-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl Environ Microbiol. 60:2120-2131.
- Bashan Y., Holguin G. 1998. Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30:1225-1228.
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. Can J Microbiol. 50:521-577.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. 2005. Bacteria/plant growth-promotion. Ed. D. Hillel. Encyclopedia of soils in the environment. Elsevier, Oxford, UK. pp. 103-115.
- Bashan Y., Puente M.E., de-Bashan L.E., Hernández J.P. 2008. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. Eds. Ait Barke E. and Clément C. Plant-Microbe Interactions. Research Signpost, Kerala, India. pp. 69-93.
- Biswas J.C., Ladha L.K., Dazzo F.B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. J Soil Sci. 64:1644-1650.
- Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Okon Y. 1999. Involvement of outer membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. Microbiol. 145:1145-52.

- Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Hampel M., Okon Y. 1998. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: Effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. Microbiol. 144:1989-1999.
- Carreño-López R., Sánchez A., Camargo N., Elmerich C., Baca B.E. 2009. Characterization of *chsA*, a new gene controlling chemotactic response in *Azospirillum brasilense*. Arch Microbiol. 191:501-507.
- Chet I., Mitchell R. 1976. Ecological aspects of microbial chemotactic behaviour. Annu Rev Microbiol. 30:221-239.
- Croes C., Moens S., Van Bastelaere E., Vanderleyden J., Michiels K.M. 1993. The polar flagellum mediates the adsorption to wheat roots. J Gen Microbiol. 139:2261-2269.
- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., De Mot R., Lugtenberg B.J.J. 2002. Flagella driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. Mol Plant-Microbe Interact. 15:1173-1180.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labendera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y. 2001. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust J Plant Physiol. 28:871-879.
- Döbereiner J., Pedrosa F. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plant. Brock/Spring. Contemporary/Bioscience. pp. 155.
- Falk E.C., Döbereiner J., Johnson J.L., Krieg N.R. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães *et al.* 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. Int J Syst Bacteriol. 35:117-118.
- Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indoleacetic acid (IAA). Soil Biol Biochem. 39:1968-1977.
- Guckert A., Chavanon M., Mench M., Morel J.L., Villenium G. 1991. Root exudation in *Beta vulgaris*: A comparison with *Zea mays*. Eds. Michael, B.V.B.L. and Person, H. Plant roots and their environment. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 449-445.
- Guerrero-Molina M.F., Tortora M.L., Winik B.C., Teixeira K.R.S., Pedraza R.O. 2010a. Root colonization of strawberry plants (*Fragaria ananassa*) by *Azospirillum brasilense*. International Microscopy Congress. Río de Janeiro, Brazil. Extended abstract L13.40.

- Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Pedraza R.O. 2010b. Endophytic translocation of *Azospirillum brasilense* through stolons of strawberry plants (*Fragaria ananassa*). International Microscopy Congress. Río de Janeiro, Brazil. Extended abstract L13.39.
- Guocheng H., Cooney J.J. 1993. A modified capillary assay for chemotaxis. J Industrial Microbiol. 12:396-398.
- Heinrich D., Hess D. 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. Can J Microbiol. 31:26-31.
- Hoagland D.R. 1975. Mineral nutrition. In laboratory experiments in plant physiology. Eds. P. B. De Kaufman, J. Labavich, A. Anderson-Prouty and N.S. Ghosheh. Macmillan Publishing Co. Inc., New York. pp. 129-134.
- Jones D.L., Darrah P.R. 1993. Resorption of organic compounds by roots of *Zea mays* L. and its consequences in the rhizosphere. Plant Soil. 153:47-59.
- Kato J., Kim H.E., Takiguchi N., Kuroda A., Ohtake H. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviours in ecosystem. J Biosc Bioeng. 106:1-7.
- Kapulnik Y., Okon Y., Henis Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can J Microbiol. 31:881-887.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. J Appl Microbiol. 96:473-480.
- Kozdroja J., Trevorsb J.T., van Elsasc J.D. 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. Soil Biol Biochem. 36:1775-1784.
- Levanony H., Bashan Y., Romano B., Klein E. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immuno-gold labeling. Plant Soil. 117, 207-218.
- Madi L., Henis Y. 1989. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: Conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. Plant Soil. 115:89-98.
- Mandimba G., Heulin T., Bally R., Guckert A., Balandreau J. 1986. Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. Plant Soil. 90:129-139.
- Michiels K.W., Croes C.L., Vanderleyden J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J Gen Microbiol. 137:2241-2246.
- Okon Y., Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News. 63:366-370.

- Okon Y., Cakmakci L., Nur I., Chet I. 1980. Aerotaxis and chemiotaxis of *Azospirillum brasilense*. Microbiol Ecol. 6:277-280.
- Ozturk A., Caglar O., Sahin F. 2003. Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. J Plant Nutr Soil Sci. 166:262-266.
- Patriquin D.G., Döbereiner J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can J Microbiol. 24:734-742.
- Pedraza R.O., Motok J., Tortora M.L., Salazar S.M., Díaz Ricci J.C. 2007. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. Plant soil. 295:169-178.
- Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Díaz-Ricci J.C. 2010a. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. World J Microbiol Biotechnol. 26:265-272.
- Pedraza R.O., Mentel M.I., Ragout A.L., Xiqui M.L., Segundo D.M., Baca B.E. 2010b. Plant growth-promoting bacteria: the role of chemotaxis in the association *Azospirillum brasilense*-plant. Ed. T.C. Williams. Chemotaxis: Types, Clinical Significance, and Mathematical Models. Nova Science Publisher Inc. New York. ISBN 978-1-61728-495-3.
- Pérez D., Mazzone L. 2004. La actividad frutillera en la provincia de Tucumán y Argentina. EEAOC Publicación Especial N 26, 100 pp.
- Prikryl Z., Vankura V. 1980. Roots exudates of plant. VI. Wheat root exudation as Dependent on growth. Concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. Plant Soil. 57:1287-1290.
- Raju N.S., Niranjana S.R., Janardhana G.R., Prakash H.S., Shetty H.S., Mathur S.B. 1999. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. J Sci Food Agric. 79:206.212.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I. 1985. Strain-Specific Chemotaxis of *Azospirillum* spp. J Bacteriol. 162:190-195.
- Roszak D.B., Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in natural environments. Microbiol Rev. 51:365-379.
- Siddiqui I.A., Shaukat S.S. 2002. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. Biol. Fertil Soil 36:260-268.
- Schulz B., Boyle C. 2006. What are endophytes? Eds. Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C. and Sieber, T.N. *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag. Berlin. pp. 1-13.

- Steehnoudt O., Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum* a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev. 24:481-506.
- Stock J.B., Surette M.G. 1996. Chemotaxis. Eds. Cutiss, R. III., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Rezinikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology, 2nd ed. Am Soc Microbiol. Washington D.C. pp. 1103-1129.
- Taylor B.L., Zhulin I.B. 1998. In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria. Mol Microbiol. 28:683-690.
- Umali-García M., Hubbell D.H., Gaskins M.H., Dazzo F.B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl Environ Microbiol. 39:219-226.
- Van Rhijn P., Vanstockem M., Vanderleyden J., De Mot R. 1990. Isolation of behavioural mutants of *Azospirillum brasilense* by using *Tn5-lacZ*. Appl Environ Microbiol. 4:990-996.
- Vanbleu E., Vanderleyden J. 2003. Molecular Genetics of rhizosphere and plant root colonization. Kluwer Academics Publishers. Netherlands. pp. 11.
- Vande Broek A., Lambrecht M., Vanderleyden J. 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. Microbiol. 144:2599-2606.
- Vikram A. 2007. Efficacy of phosphate solubilizing bacteria isolated from vertisols on growth and yield parameters of sorghum. Res J Microbiol. 2:550-559.
- Weller D.M., Tamashow L.S. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. Eds. O'Gara F., Dowling D.N., Boesten B. Molecular ecology of rhizosphere microorganism. Biotechnology and the release of GMOs. VCH Verlags Gesellschaft mbH. Weinheim. Germany. pp 1-18.
- Winik B.C., Guerrero-Molina M.F., Pedraza R.O. 2009. Colonization of strawberry (*Fragaria ananassa*) plant tissues by *Azospirillum brasilense*. Acta Microscópica. 18:675-676.
- Xie Z., Ulrichb L.E., Zhulin I.B., Alexandre G. 2010. PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. PNAS-USA 107:2235-2240.
- Zhulin I.B., Bessalov V.A., Johnson M.S., Taylor B.L. 1996. Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 178:5199-5204.
- Zhulin I.B., Armitage J.P. 1992. The role of taxis in ecology of *Azospirillum*. Symbiosis 13: 199-206.
- Zhulin I.B., Armitage J.P. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 175:952-958.

Capítulo 12

Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias

Ethylene as a mediator of direct and indirect mechanisms carried out by plant growth promoting rhizobacteria

Claudia M. Ribaudó¹, Daniela S. Riva¹, José A. Curá¹, Clara Ponds², Antonio Granell-Richart², María L. Cantore¹

¹Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, UBA. Av San Martín 4453. DSE1417. C.A.B.A.

²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC, Valencia, España.

E-mail: ribaudó@agro.uba.ar

Introducción

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son un grupo de bacterias que interactúan con las plantas favoreciendo su crecimiento y/o controlando los fitopatógenos que puedan infectarlas aumentando así la productividad vegetal. El grupo más estudiado son las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPRs). Entre los microorganismos con actividad PGPR más conocidos se encuentran especies de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Glick 1995). Los mecanismos que utilizan estas bacterias para promover el crecimiento de las plantas son numerosos y variados, y no solo difieren de un microorganismo a otro sino que también pueden diferir de una cepa a otra. A diferencia de *Rhizobium*, donde la principal contribución de la bacteria al crecimiento de la planta parece ser la fijación de nitrógeno por la bacteria, las PGPRs de vida libre probablemente no cuentan con un solo mecanismo para promover el crecimiento de la planta. Se postula que en la mayoría de los casos opera más de un mecanismo, y que los efectos en las plantas tratadas son aditivos (Bashan, Dubrovsky 1996). Los mecanismos directos de la promoción del crecimiento son los que se encuentran en juego cuando los metabolitos producidos por algunas cepas son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta. Son ejemplos de estos mecanismos la fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum* en asociación con plantas de maíz y de trigo (Ribaudó et al. 2001); asimilación

de nitratos (García de Salamone, Döbereiner 1996; Ribaudó et al. 1998); producción de hormonas y solubilización de fosfatos (Shoebitz, Ribaudó et al. 2009; Nico et al. 2012). Los mecanismos indirectos son los utilizados por las PGPR con capacidad de control biológico que evitan el daño que los fitopatógenos ocasionan en las plantas; los mecanismos de control biológico son variados por ejemplo competencia con el patógeno, secreción de sideróforos, (Glick et al. 1999) y síntesis de antibióticos (Raaijmakers et al. 2002) e inducción de una respuesta sistémica en la planta (ISR), en la cual no se evidencian daños sobre la planta y que resulta en una inmunización contra el ataque de patógenos. El mecanismo bioquímico que media a ISR se describe en detalle más adelante.

Mecanismos directos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por las PGPRs

Entre los mecanismos directos de acción ejercidos por las PGPRs, se encuentra la síntesis de hormonas que resultan reguladores del crecimiento vegetal. Tien et al. (1979) sugirieron que un aumento en los niveles de las fitohormonas podría ser responsable del mejor crecimiento de la raíz y de la parte aérea de las plantas ya que los efectos de la inoculación son similares a los que se observan cuando las plantas son tratadas con fitohormonas. El mecanismo de la producción de auxinas es el más estudiado especialmente el del ácido indol acético (AIA) (Jain, Patriquin 1985). El AIA producido por las bacterias puede modificar el contenido endógeno de AIA de la planta y este a su vez incrementar el contenido de ET (Glick et al. 1999). En cultivos de *Azospirillum*, además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos que aún no han sido identificados (Perrig et al. 2007). Se ha demostrado que *A. lipoferum* Op33 es capaz de metabolizar formas inactivas de giberelinas a sus formas con actividad biológica, por ejemplo GA20 a GA1 y GA9 a GA3, confirmando la capacidad del microorganismo para aumentar en la planta el pool endógeno de formas activas de GAs por la eliminación de glucosa a partir de conjugados sin actividad biológica (Piccoli et al. 1998). Bottini et al. (2004) demostraron que *A. lipoferum* tiene además la capacidad de producir giberelinas (GAs, GA1, GA3 e iso-GA3) en medio de cultivo químicamente definido. Estos resultados permitirían suponer que la promoción del crecimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum* se debería, al menos en parte, a la capacidad bacteriana de metabolizar precursores inactivos de GAs a sus formas activas. Por otro lado Perrig et al. 2007 demostraron en medios de cultivo definidos que *A. brasilense* AZ39 y *A. brasilense* Cd son capaces de sintetizar ET y que esta síntesis es dependiente de la concentración de metionina en el medio. Es posible entonces que la promoción del crecimiento de la raíz estuviera afectado positivamente por el nivel de ET endógeno, al cual contribuyen el ET sintetizado por la bacteria y el producido por la misma planta.

Biosíntesis y degradación del etileno en plantas

El ET es una hormona vegetal difusible que tiene un rol sumamente importante en la integración entre los eventos metabólicos y del desarrollo y los estímulos externos. El ET está involucrado en procesos muy diversos en el desarrollo de las plantas tales como germinación de las semillas, desarrollo de pelos radicales, nodulación de la raíz, maduración de los frutos, abscisión y senescencia. También es un importante mediador en la respuesta a distintos tipos de estrés tanto bióticos (por ejemplo ataque por patógenos) como abióticos (como daño, hipoxia, frío, sequía). A nivel génico, en respuesta a los estímulos mencionados, el ET induce la transcripción de un gran número de genes.

En las plantas superiores el ET es sintetizado a partir de metionina vía los intermediarios S-adenosil-L-metionina (SAM), y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Las enzimas involucradas secuencialmente en el proceso son SAM sintetasa, ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa.

La ACS es una enzima citosólica, exclusiva de plantas superiores, que está presente en concentraciones extremadamente bajas en los tejidos vegetales y que regula el paso limitante de la síntesis del ET. Actualmente están clonadas ACSs de una gran variedad de especies vegetales como tomate, manzana y *Arabidopsis* lo que ha permitido establecer que los genes que codifican para esta enzima pertenecen a familias multigénicas (Jonson, Ecker 1998). Los miembros de las familias multigénicas de la ACS se expresan diferencialmente en respuesta al desarrollo, a factores ambientales y a hormonas. En el caso de tomate se ha visto que la expresión de una determinada isoforma aumenta en la maduración del fruto, otra en respuesta al daño y una tercera en respuesta a auxinas (Kende, Zeevart 1997). La ACS está regulada tanto a nivel transcripcional como postraducciona. En tomate la fosforilación/defosforilación de la ACS2 regula su recambio aguas arriba del sendero de degradación vía ubiquitina. Se ha demostrado que esta isoforma se estabiliza por fosforilación y se degrada después de la defosforilación. Se vio que la cantidad de LeACS2 es afectada por inhibidores de quinasas y fosfatasa y afecta significativamente la actividad celular de la ACS, el contenido de ACC y la producción de ET en frutos de tomate, sugiriendo que la regulación postraducciona por fosforilación juega un rol importante en el control de la producción de ET (Kamiyoshihara et al. 2010).

La **ACC oxidasa** cataliza la última etapa de la biosíntesis de ET, requiere O_2 , Fe^{2+} y ascorbato como cofactores dando como producto ET. Se expresa constitutivamente a bajos niveles en la mayoría de los tejidos vegetales y su actividad aumenta durante la maduración del fruto, la senescencia floral, el daño mecánico y la presencia de efectores fúngicos (Wang, Woodson 1992; Fluhr, Mattoo 1996). También se ha encontrado aumento de la actividad de ACC oxidasa en respuesta a ACC y a hormonas como auxinas (y el mismo ET) (Kende 1993). Así, el tratamiento de los tejidos con ET estimula la actividad

ACC oxidasa a través de un feedback positivo: la inducción de ACC sintasa por ET lleva a la producción de ACC que a su vez estimula la ACC oxidasa constitutiva del tejido y produce más ET. El aumento de la actividad está asociado a regulación de la transcripción de la enzima (Fluhr, Mattoo 1996). La **ACC deaminasa** degrada el ACC a amonio y α -cetobutirato. Es una enzima citoplasmática, trimérica, exclusiva de microorganismos y ha sido detectada en un gran número de cepas bacterianas, principalmente *Pseudomonas* spp, aisladas de suelo, muchas de las cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Glick et al. 1995). Esta actividad enzimática les permite a estas bacterias utilizar el ACC como fuente de nitrógeno en medio mínimo. Actualmente están clonados los genes de ACC deaminasa de un gran número de especies de *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Del estudio de la relación existente entre la presencia de actividad ACC deaminasa en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y del efecto inhibitorio del ET sobre este, se ha propuesto un posible rol de la enzima en el mecanismo de interacción PGPR/planta. La capacidad de promover el crecimiento vegetal de las cepas con actividad de ACC deaminasa se manifiesta, por ejemplo, en el aumento de la elongación de las raíces en plantas sensibles al ET inoculadas con estas bacterias (Shah et al. 1997); este efecto es comparable al logrado utilizando el inhibidor de la ACC sintasa aminoetoxivinilglicina (AVG) (Hall et al. 1996). Por otro lado, las cepas mutantes defectivas en ACC deaminasa pierden su capacidad promotora de la elongación de las raíces (Glick et al. 1994). Asimismo, el contenido de ACC en las raíces provenientes de plantas tratadas con la PGPR *P. putida* es menor que en las semillas no tratadas y no varía cuando se utiliza una mutante defectiva en ACC deaminasa (Glick et al. 1995). Estas observaciones permitieron proponer un modelo que explicaría de qué manera las PGPRs podrían disminuir los niveles de ET en las plantas promoviendo así su crecimiento (Glick et al. 1999). Según este modelo, la bacteria se une a la superficie de la semilla o de la raíz de la planta y en respuesta a triptofano y otros exudados de la planta, sintetiza y excreta AIA que es tomado en parte por la planta. Este AIA, junto con el endógeno generado en la misma planta puede estimular la proliferación y la elongación celular e inducir la actividad de ACC sintasa para convertir SAM en ACC y finalmente en ET. Se postula que parte del AIA es exudado junto con otras moléculas y podría ser incorporado por la bacteria cuya actividad ACC deaminasa lo degrada a amonio y α -cetobutirato promoviendo el aumento de la liberación de AIA por la planta y en consecuencia disminuyendo su concentración interna y la inducción de la síntesis de ET. Dado que la regulación de los niveles de ET es de suma importancia en muchos cultivos para regular la maduración de los frutos y prevenir los efectos deletéreos en vegetales y flores, la manipulación de los niveles de ACC deaminasa es una herramienta potencialmente importante para este fin. De hecho, la enzima ha sido utilizada para obtener plantas de tomate transgénicas que muestran una fase de maduración más prolongada y un menor nivel de ET desencadenado por la infección por patógenos (van Loon et al. 2006).

Percepción del etileno y señalización

Después de su síntesis el ET es percibido por receptores específicos y se gatilla un sendero de transducción que finalmente desencadena respuestas biológicas específicas. Si bien la mayoría de los componentes de este sendero han sido identificados y su función estudiada en *Arabidopsis*, la estructura básica del sendero de señalización parece ser universal en otras plantas aunque puede variar el número de componentes del sendero de una especie a otra. El ET es censado por una familia de receptores unidos a la membrana del retículo endoplásmico que presentan similitud de secuencia con los sistemas bacterianos de dos componentes con actividad de histidina quinasa involucrados en la detección de cambios ambientales. La Figura 1 muestra un esquema resumido del sendero de transducción que media la señal de ET en *Arabidopsis*. El ET se une a una región hidrofóbica del dominio N terminal de los receptores, localizada dentro del retículo endoplasmático, y requiere la presencia de Cu^{2+} . En *Arabidopsis* existen cinco de estos receptores, denominados ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4, que se clasifican en dos familias, I y II, dependiendo de la presencia o ausencia del dominio canónico de histidina quinasa. La ausencia de fenotipos para las distintas mutantes deficientes en uno solo de estos genes sugiere que pese a las diferencias estructurales, son funcionalmente redundantes. De los resultados de estudios bioquímicos y genéticos se concluyó que el mecanismo de transducción mediado por ET sigue el modelo del agonista inverso, es decir en ausencia de ET el receptor es constitutivamente activo en la transducción y cuando el ET se une al receptor estos son inactivados. Los receptores actúan como reguladores negativos a través de CTR1 que codifica una Raf-like MAPKKK. Estudios genéticos y de co-localización sugieren que CTR1 es parte del complejo de receptores y que media la señalización convergente de varios receptores que activan su actividad quinasa de proteínas en ausencia de ET. En respuesta a ET es probable que CTR1 sea inactivado por un cambio conformacional. La proteína EIN2 regula, por un mecanismo aún no conocido, la disponibilidad del factor de transcripción clave del sendero EIN3. Otras dos proteínas con actividades redundantes EBF1 y EBF2 se unen a EIN3 activando permanentemente su degradación a través del proteasoma S26. En respuesta al ET, EIN3 se estabiliza y se acumula en el núcleo activando la transcripción primaria: EIN3 y una proteína homóloga EIL1, activan la transcripción del factor de transcripción que responde a ET (ERF1) y de otros genes de respuesta primaria que contienen los sitios de unión de EIN3 en sus promotores. ERF1 y factores de transcripción relacionados con actividad de unión a boxes GCC inducen la expresión de los genes de respuesta secundaria en la cascada de transcripción del ET. Estos productos génicos están involucrados en la resistencia, defensa y crecimiento de la planta como las proteínas de la patogénesis (PRs). Es notable que la expresión de ERS1, ERS2 y ETR2 aumentan en respuesta al ET. Los receptores recién sintetizados que no han interactuado aún con la hormona podrían suprimir la señal del ET y disminuir o anular la respuesta hormonal como una forma de mecanismo de

retroinhibición. El regulador génico EIN5 (EIN7, XRN4, AIN1) es una 5'-3' exorribonucleasa que podría modular el metabolismo del RNAm de EBF1, 2. Si bien se han identificado un gran número de componentes del sendero de señalización del ET, no está claro de qué manera se conectan los complejos receptor-CTR1 con los factores de transcripción nucleares EIN3 y EIL1. Se han identificado recientemente dos quinasas MPKK9 (MAPKquinasa 9) y MPK3 (MAPK3) activadas por ET en la mutante CTR1 que podrían constituir una segunda cascada de MAPK actuando positivamente en la señalización aguas debajo de CTR1. Solamente cuando la activación de la cascada MPKK9-MPK3 y 6 es simultánea con la inactivación de CTR1, el sendero del ET puede ejecutarse correctamente. Actualmente existe un cúmulo de información que indica que los componentes del sendero de señalización por ET descrito en *Arabidopsis* se encuentran altamente conservados en otras plantas como ser tomate (Yoo et al. 2009.)

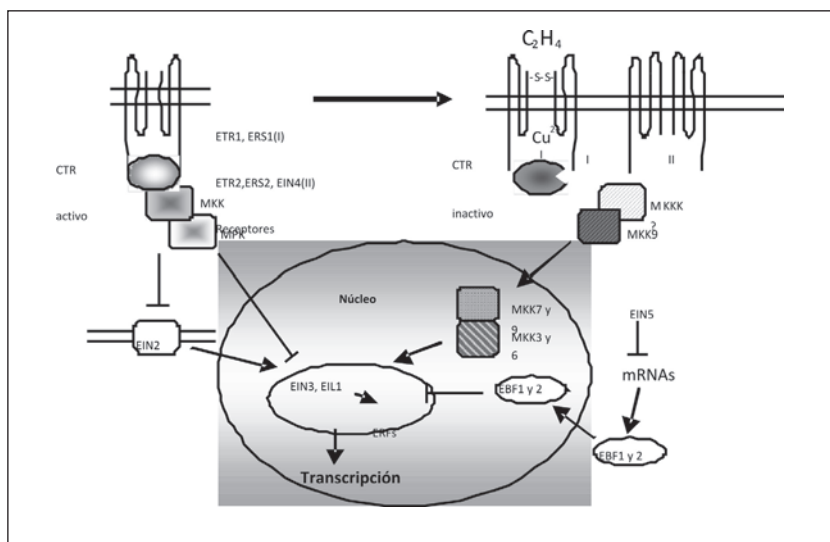


Figura 1: Esquema del sendero de transducción que media la señal del ET.
Modificado de Yoo et al. 2009, Trends in Plant Science 14: 270-279.

EIN3 se une al promotor del factor de transcripción inducible ERF1 que pertenece a la familia de genes EREBPs (por *Ethylene Response Binding Proteins*). Experimentos de sobre expresión sugieren que ERF1 participa en la regulación de una serie de genes que se expresan en respuesta a ET y JA.

Rol del etileno en la promoción del crecimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum*

Los mecanismos bioquímicos que median la respuesta de las plantas de

arroz a tres especies bacterianas de las que por las cuales se conoce su capacidad promotora del crecimiento de plantas de maíz y arroz fue asignada fundamentalmente a la capacidad que las PGPRs poseen de fijar el nitrógeno atmosférico (FBN) y hacerlo disponible para los cultivos (Ribaud et al. 2000; Ribaud et al. 2001; Curá et al. 2005; Ribaud et al. 2006 a, Curzi et al. 2008). Sin embargo no es el único mecanismo ejercido por las mismas. El efecto hormonal ejercido por las bacterias como se describió anteriormente se debe a la acción de AIA, GAs, ABA, y ET entre otras. Como ya se mencionó, el ET tiene un rol preponderante como mediador y coordinador de las señales internas y externas que modulan la dinámica del crecimiento y los programas de desarrollo en las plantas (Santner, Estelle 2009). También juega un papel importante en la señalización que media algunas interacciones planta/bacteria como la formación de nódulos en la simbiosis rizobio/leguminosa (Penmetsa, Cook 1997) y en el modelo de estudio *Arabidopsis Pseudomonas* sp., o en la defensa frente a patógenos. Partiendo de la base de que gran parte del control de los eventos mediados por una hormona ocurre a nivel de su síntesis la medición de la cantidad de ET producida por las plantas en respuesta a la inoculación es un buen parámetro del efecto ejercido por estas sobre los cultivos. *A. irakense*, *A. brasilense* y *Herbaspirillum seropedicae* resultan en el establecimiento de una relación beneficiosa para las plántulas de arroz. Estas PGPRs promueven muy tempranamente un aumento en los niveles de ET, que se hace francamente evidente a las 24 h, se mantiene hasta las 72 h después de la inoculación y luego disminuye (Ribaud et al., 2000). Como era esperable esta respuesta no fue igual en las tres asociaciones estudiadas. En el caso de *A. irakense* los resultados fueron concluyentes ya que solo las mediciones de 24 horas indicaron diferencias estadísticamente significativas. En cambio la inoculación con *A. brasilense* resultó en los mayores incrementos significativos a las 48 y 72 horas (entre 4 y 5 veces) seguido de *H. seropedicae*. Este aumento en el nivel de la hormona coincidió con un aumento en la actividad y en la expresión de ACS (Curzi et al., 2008). La familia ACS en arroz comprende a seis miembros *OsACS1-6* cuya regulación transcripcional depende de varios factores ambientales, tales como la hipoxia o de los niveles de hormonas, por ejemplo *OsACS1* y *OsACS3*, cuyos mensajeros son inducidos por hipoxia y por anaerobiosis en tejido aéreo y en raíces respectivamente. *OsACS1*, *OsACS3* y *OsACS2* son inducidos por auxinas y este aumento se acompaña por un aumento en la liberación de ET. Los aumentos registrados en la expresión de *OsACS* en plantas de arroz inoculadas con *H. seropedicae* y *A. brasilense* indican, en ambos casos, un aumento de entre 50 y 60% en la cantidad de mensajero para *OsACS1*. La amplificación con los cebadores para *OsACS3* no indicaron diferencia en la expresión de este gen (Ribaud, comunicación personal).

Tomados en conjunto los resultados de expresión (tanto a nivel de proteína como de mensajero de ACS) los de actividad enzimática y los de niveles de ET sugieren fuertemente que la inoculación con *H. seropedicae* y *A. brasilense* promueve una activación del sendero biosintético de la hormona en la planta

de arroz. En consecuencia podría pensarse como hipótesis que el ET tiene algún rol mediador en el mecanismo promotor del crecimiento de estas PGPRs sobre arroz, tal como se ha demostrado en otras asociaciones PGPRs/huésped (Baldani et al. 2000).

De acuerdo a nuestras mediciones las concentraciones de ET en las plantas inoculadas están en el rango considerado, como de alto ET el cual de acuerdo a la hipótesis bifásica de respuesta a la hormona corresponde a concentraciones inhibitorias para la mayoría de las plantas excepto para algunas especies de plantas acuáticas y para arroz en condiciones de inundación (Pierik et al. 2006). La relación entre los niveles de ET y la expresión de *OsACS1* con los cambios observados en la morfología radicular parecen sugerir un rol intermediario del ET en el sendero de transducción que lleva a una respuesta fisiológica a la inoculación. Cuando el nivel de ET se aumentó artificialmente inyectando la hormona en el ambiente de crecimiento de las plantas, este fue estimulador del crecimiento y el bloqueo de su percepción revirtió el efecto. Estos resultados indican que la respuesta de las plántulas de arroz, aún no sumergidas, a la presencia de ET es positiva en un amplio rango de concentraciones de la hormona y que el aumento de esta, provocado por la inoculación, favorece el crecimiento.

El rol del ET en la interacción planta/bacteria promotora del crecimiento tiene que ser analizado desde dos puntos de vista: su efecto como promotor del crecimiento vegetal una vez establecida la asociación y anterior a este, su función en el establecimiento mismo de la asociación. A nivel celular los mecanismos que podrían explicar la estimulación del crecimiento en respuesta al ET son prácticamente desconocidos. Una enorme cantidad de trabajos relacionan al ET con modificaciones de la expansión celular regulada por proteínas como expansinas, con cambios en la división celular y en la orientación de microfibrillas y microtúbulos (Pierik et al. 2006). A nivel molecular la interacción del ET con otras hormonas ha recibido especial interés en relación con el efecto estimulador del ET en el crecimiento. Por ejemplo, una alta concentración de ET en el crecimiento sumergido de *Rumex palustris* y arroz lleva a un fuerte aumento en el crecimiento que ha sido asociado funcionalmente a una disminución de los niveles endógenos de ABA. En ambos sistemas la disminución del nivel de ABA va acompañada de un aumento en los niveles de GA activo y en la sensibilidad a esta hormona que resultan finalmente en la elongación del tallo inducida por ET. Si bien no se conoce la naturaleza de la interacción entre estas hormonas se propone que en última instancia lo que se modifica es la estabilidad de las proteínas DELLA cuya degradación regula la elongación celular. La estabilidad de DELLA también está controlada por auxina, una hormona que frecuentemente interacciona con ET. La interacción entre estas dos hormonas ha sido descrita para el crecimiento de pelos radiculares, formación de raíces adventicias y elongación de la raíz y otros eventos relacionados con el crecimiento. Estos resultados implican una estrecha relación entre el transporte, señalización y biosíntesis de ET y auxinas. De hecho, es bien sabido que auxina estimula la síntesis de

ET a través de la regulación transcripcional de varias isoformas de la ACS (Tsuchisaka, Theologis 2004).

Entre los múltiples efectos que el ET tiene sobre las plantas, está el efecto sobre el desarrollo radicular (Glick et al., 1996). Como se discutió anteriormente, la síntesis de esta hormona está estimulada por la presencia de AIA. En el estudio de la promoción del crecimiento de tomate inoculado con *Azospirillum brasilense* FT326 se observó un aumento en el crecimiento de las plantas medido en la biomasa de tallos y raíces, altura de los tallos y superficie total de la raíz. Estos resultados concuerdan con los informados previamente por Bashan (1998) relativos al efecto de diferentes especies de *Azospirillum* sobre plantas de tomate. Además el contenido de AIA en las plantas inoculadas, aumentó 7 y 19 veces en tallos y raíces respectivamente. Junto con el aumento de AIA se encontró que también las plantas inoculadas producían más ET. La actividad de ACS aumentó en tallo y raíces después de la inoculación. En tomate la familia *LeACS* tiene 9 miembros (Lin et al. 2009). Cuando se midió la expresión de ACS utilizando un anticuerpo de la isoforma ACS2, se vió claramente un aumento en la cantidad de proteína presente en tallos; en raíz debido a la baja cantidad de proteína presente, esta no pudo ser detectada por el anticuerpo. Los datos de actividad y expresión de ACS sugieren que ambas podrían estar moduladas en el proceso. La observación microscópica de las raíces de las plantas inoculadas mostró que además de los cambios en la densidad de los pelos radiculares su distribución a lo largo de la raíz principal estaba alterada (Ribaudó et al. 2006 b). Como las auxinas tienen un rol en el desarrollo de los pelos radiculares es posible que la alteración del balance AIA/ET sea responsable de esta localización anormal de los pelos radiculares observados en plantas inoculadas con *A. brasilense*. El ET suministrado exógenamente reprodujo el efecto de la inoculación, induciendo un aumento en la superficie de la raíz y de la longitud de los pelos radiculares. El uso de bloqueantes de la percepción del ET resultó de gran utilidad. Los experimentos llevados a cabo utilizando 1-MCP, permitieron demostrar que esta hormona es un regulador positivo del desarrollo de los pelos radiculares y en consecuencia del aumento de la superficie radicular y que es al menos una de las señales que median el efecto de la inoculación con *A. brasilense* FT326 en plántulas de tomate.

En estudios más recientes, como resultado del análisis transcriptómico de tomate inoculado con *A. brasilense*, se observó que la isoforma 4 de tomate, *LeACS4*, aumentó dos veces la expresión con respecto al control sin inocular. Este resultado fue confirmado posteriormente por PCR semicuantitativa (Ribaudó et al. 2010). También la isoforma 2, *LeACS2*, apareció sobreexpresada como resultado de la inoculación. Posteriormente esto fue confirmado por análisis de expresión de la proteína usando anticuerpos contra la isoforma 2 de tomate. Se demostró un aumento de ACS2 a nivel de proteína presente en las muestras de parte aérea de plantas inoculadas. De hecho, las plantas de tomate línea A11.1 antisentido para el gen de ACS2, derivadas de las Cv VF36

usadas en el análisis transcriptómico tuvieron una producción de ET 40 % menor que la cepa salvaje y además las plantas son más sensibles a la infección por el hongo necrotrofico *Sclerotium rolfsii* (Riva et al. 2012, enviado para su publicación). Se ha propuesto un modelo según el cual uno de los roles de las PGPRs sería modular el nivel de ET en las plantas evitando así el efecto inhibitorio de un alto nivel de ET. El nivel de ET en la planta sería resultado del balance entre su síntesis, estimulada por un alto nivel de AIA inducido por la PGPR y su degradación mediada por la ACC deaminasa bacteriana (Glick et al. 1999). De acuerdo a este modelo, la capacidad de una bacteria de actuar como PGPR dependería, al menos en lo que respecta a la elongación de la raíz, de la presencia de actividad ACC deaminasa. Nuestros resultados le asignan al ET un rol intermediario en el sendero de señalización que lleva a un desarrollo aumentado de la densidad de los pelos radiculares en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* (Ribaudó et al., 2006 b). Para profundizar estos estudios a nivel de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados, se encaró un estudio del perfil transcripcional de las plántulas inoculadas con *A. brasilense* cuyos resultados se comentan más adelante.

Mecanismos moleculares de defensa en la planta. Rol del etileno

Todos los organismos vivos evolucionan continuamente adquiriendo diversas características adaptativas que le permiten sobrevivir en un ambiente particular. Como las plantas son inmóviles y carecen del sistema inmune de los vertebrados, han desarrollado complejos mecanismos de defensa que reconocen a los agentes bióticos y abióticos generadores de diferentes tipos de estrés minimizando así los daños que pudieran ocasionarle (para una revisión del tema ver Ausubel, 2005). Los sistemas de defensa incluyen defensas preformadas como ceras, algunos componentes de la pared y metabolitos secundarios. Una vez detectada la presencia del patógeno la planta activa otros mecanismos que involucran un aumento en la expresión de genes relacionados con la defensa, producción de compuestos antimicrobianos, formación de lignina y producción de especies reactivas de oxígeno. Una proporción relativamente pequeña de microorganismos han evolucionado como patógenos eficientes que logran suprimir y/o evitar los mecanismos de defensa, son los que causan enfermedad y pueden provocar pérdidas severas en los cultivos (De Wit, 2007). La magnitud de los daños causados por estos patógenos ha estimulado un rápido progreso en la investigación de los mecanismos de defensa de las plantas. Los patógenos pueden liberar localmente compuestos efectores que son percibidos por el huésped o penetrar la pared y/o la membrana de la célula vegetal. Para responder rápidamente a la infección de un patógeno la planta posee un sofisticado sistema de vigilancia que debe distinguir entre las señales generadas por ella misma de las emitidas por los patógenos. Más aún, cuando una señal es reconocida como no propia, la planta debe discriminar

entre los patógenos y los organismos benéficos como es el caso de *Rhizobium* para las leguminosas, las micorrizas y las PGPRs. Los mecanismos que permiten esta discriminación han comenzado a estudiarse recientemente.

Las plantas han desarrollado un sistema defensivo innato contra los patógenos que tiene dos niveles: **la resistencia basal o primaria** y la **resistencia secundaria**. La resistencia basal es la primera línea de defensa y se induce cuando ciertos compuestos derivados del patógeno (conocidos también como efectores generales o del inglés *microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) son reconocidos por receptores no específicos de la membrana plasmática. La resistencia secundaria se induce cuando los productos de los genes de avirulencia del patógeno (genes *avr*) son reconocidos por el producto del gen de resistencia correspondiente de la planta, específico de un determinado cultivar. Este último mecanismo, también conocido como inmunidad inducida por efector, desencadena una fuerte respuesta hipersensible (HR) que resulta en la muerte celular localizada en la zona del ataque y restringe el crecimiento del patógeno (Jones, Dangl 2006). Las respuestas primaria y secundaria que llevan a generar resistencia se basan en la activación rápida de cascadas de transducción de señales, de las cuales los cambios intracelulares generados por las respuestas secundarias son los más importantes.

Los efectores generales son compuestos vitales para el funcionamiento de los microorganismos, por lo tanto están constitutivamente presentes en los mismos y están conservados en una misma clase de microorganismos. Varios de ellos han sido identificados en patógenos de plantas incluyendo flagelina, lipopolisacáridos (LPS) y factor de elongación Tu (EF-Tu) para bacterias Gram negativas, lo mismo que quitina y α -glucanos para hongos y oomicetes (Zipfel, Felix 2005). El reconocimiento de los patógenos por las plantas está mediado por un grupo de proteínas receptoras que pueden agruparse en unas pocas clases importantes. Las proteínas símil receptor (RLPs) y los receptores con actividad de quinasa (RLKs) están localizados en la membrana plasmática y contienen dominios con repeticiones ricas en leucina (LRRs). Los RLPs carecen de dominios intracelulares de transducción de señales y los RLKs contienen un dominio citosólico con actividad de quinasa que media la transducción. Otras dos clases de receptores están formadas por proteínas con localización citoplasmática que además del dominio LRR contienen un dominio de unión de nucleótidos (NB). Una clase se conoce como TIR-NB-LRRs ya que contiene un extremo N terminal similar al receptor Toll de *Drosophila* y al receptor de interleuquina 1 (TIR). La otra clase se refiere como CC-NB-LRRs ya que el dominio N terminal contiene un motivo «coiled coil» o leucine zipper además de los otros dominios nombrados. Es llamativo que la respuesta primaria de defensa (non-host) inducida por MAMPs y la respuesta secundaria inducida por factores específicos (race-specific inductors) están mediadas por receptores muy parecidos. Actualmente se los conoce como receptores PRRs y proteínas R (RP) respectivamente (Bent, Mackey 2007). En la Figura 2 se muestra un esquema de las estructuras modulares, ubicación y función de algunos de estos receptores.

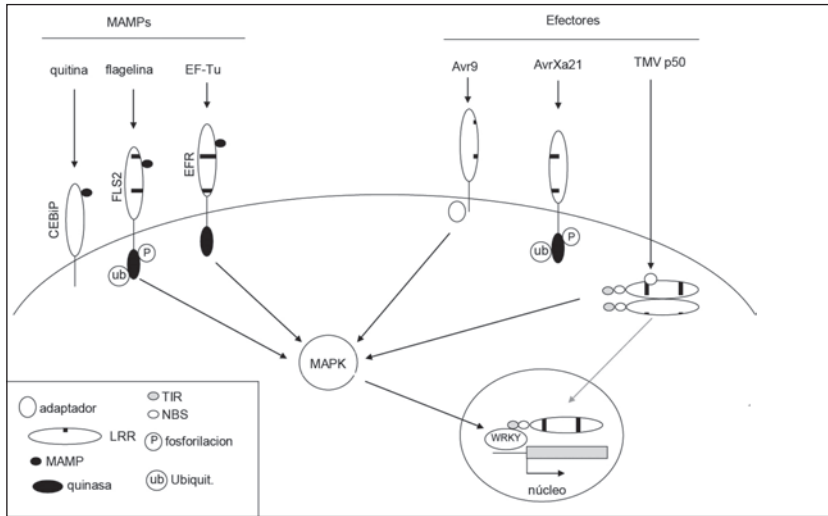


Figura 2: Ubicación celular y señalización de los receptores que median la inmunidad en plantas. Modificado de Bent, Mackey 2007. Annu. Rev. Phytopathol. 45, 399-436.

Los verdaderos patógenos tanto de plantas como de animales son capaces de suprimir o sobrepasar la defensa basal activada por el sistema innato de inmunidad primaria. Las bacterias patógenas de animales y de plantas contienen cuatro sistemas secretorios de los cuales el sistema secretorio tipo III (TTSS III) parece ser el más importante para la virulencia. A través de este sistema las bacterias patógenas de plantas inyectan múltiples efectores en la planta huésped. Si el TTSS es no funcional solo se puede inducir la respuesta primaria de defensa y la bacteria no es patogénica (Grant et al. 2006). Se han descrito un gran número de efectores de bacterias patógenas y para algunos de ellos se han dilucidado sus mecanismos de acción; por ejemplo, los efectores de *P. syringae* AvrPto, AvrRpt2 y AvrRpm1 comprometen las respuestas inducidas por MAMPs, y AvrPtoB también induce el sendero de ABA favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (de Wit, 2007).

Para defenderse de los patógenos que suprimen o rebasan la respuesta defensiva primaria las plantas han desarrollado una respuesta defensiva secundaria que se induce cuando los efectores o sus efectos son detectados por el huésped (Jones, Dangl 2006). Las proteínas de resistencia (RPs) registran a estos efectores o a algunas proteínas blanco de la planta que han sido alteradas por estos efectores y disparan la respuesta de defensa secundaria (también llamada respuesta mediada por RPs) que usualmente culminan en una respuesta HR (una respuesta localizada de muerte celular) que asociada a otras respuestas localizadas de defensa bloquea el crecimiento posterior del patógeno. La detección de los efectores o de sus efectos por las proteínas RPs del huésped es específica mientras que la HR inducida no lo es y en general es efectiva contra muchos patógenos de plantas. Los efectores

son específicos de una determinada cepa de patógeno y algunas veces modifican distintos dominios de un mismo componente del huésped que a su vez es controlado por diferentes RPs. Por lo tanto la especificidad y diversidad del reconocimiento de los patógenos podría lograrse por la interacción combinatoria de distintos dominios y/o proteínas del huésped. Como se dijo más arriba, los RPs tienen localización tanto citoplasmática como transmembrana de manera que algunas pueden sensar ligandos secretados o componentes de la superficie del patógeno y otras reconocen ligandos que aparecen en el interior de la célula (Figura 2). En algunos casos los mecanismos de inducción de defensa mediados por RPs han sido dilucidados. El caso de las proteínas RIN4 de *A. thaliana* y Pto de tomate son un ejemplo de mecanismo indirecto de inducción de la respuesta. RIN4 es blanco de tres efectores bacterianos (AvrRpm1, AvrB, y AvrRpt2) y es controlada por dos RPs intracelulares diferentes (RPM1 y RPS2) y Pto es reconocida por dos efectores bacterianos Avrpto y AvrptoB y controlada por una RP también intracelular (PRF). Este mecanismo indirecto de reconocimiento de las modificaciones inducidas por un efector se conoce también como modelo de guarda (Van der Hoorn et al. 2002). Los efectores AvrRpm1 y AvrB fosforilan a RIN4 y Avrpto y AvrptoB fosforilan a Pto que a su vez activan las proteínas receptoras citoplasmáticas RPM1 (del tipo CC-NB-LRR) en el caso de RIN4 o PRF (del tipo NB-LRR) en el caso de Pto. Finalmente estas proteínas activadas median la respuesta secundaria de defensa (Mackey et al. 2002; Axtell, Staskawicz 2003). En la Figura 3 se muestra un esquema simplificado de los mecanismos en que están implicadas RIN4 y Pto (se esquematiza uno solo de los mecanismos descriptos para cada proteína intermediaria).

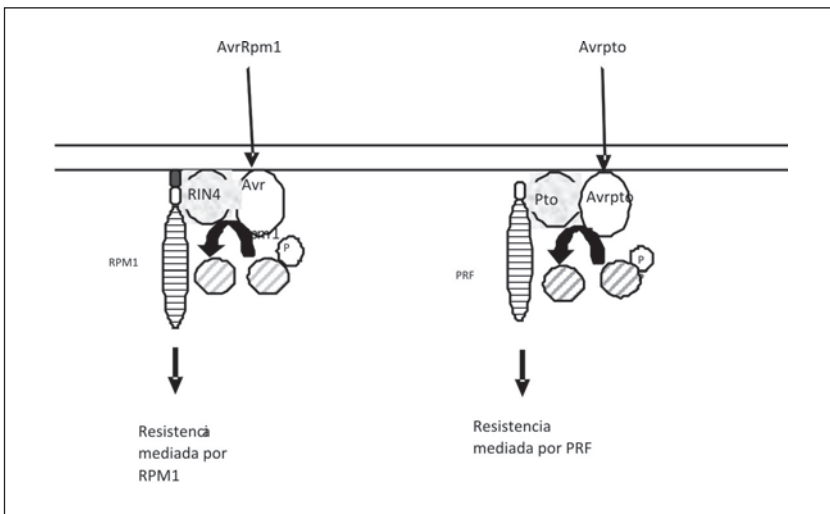


Figura 3: Mecanismo de defensa mediado por RIN4 y Pto.

Modificada de Gómez-Gómez 2004. Molecular Immunology 41 (2004) 1055–1062.

En otros casos el reconocimiento efector/receptor es directo como en el caso de los efectores de la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum* (Deslandes et al. 2003).

Respuesta sistémica adquirida (SAR) e inducida (ISR)

El ácido salicílico (SA), es un conocido inductor de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) en la interacción planta/patógeno. El SA se acumula rápidamente en el sitio de la infección durante la reacción hipersensible y es luego distribuido en el resto de la planta donde induce una cantidad de respuestas de defensa entre ellas la inducción de genes relacionados con la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Mikkelsen et al. 2003). El ácido jasmónico (JA) y sus derivados son transductores de las señales de inductores para la síntesis de metabolitos secundarios de distinta naturaleza química como terpenoides, flavonoides, alcaloides, etc. y se los relaciona con la respuesta a patógenos (Farmer et al. 2003). Todos estos compuestos pueden activar la síntesis de metabolitos secundarios que juegan roles defensivos en la planta. El ET regula varios procesos muy importantes en las plantas como se describió anteriormente y la producción puede ser inducida por diferentes situaciones de estrés. Contrariamente a lo que ocurre con JA y sus derivados, el ET en contados casos está asociado a la acumulación de metabolitos secundarios de defensa (Zhao et al. 2004).

SAR es especialmente efectiva frente a los microorganismos biotróficos como *P. syringae* que colonizan tejidos vegetales vivos (Glazebrook 2005). JA y ET, por otro lado, están involucrados en la resistencia contra patógenos fundamentalmente necrotróficos, como *Botrytis cinerea* y *Erwinia carotovora*, a través de la inducción de genes de defensa y la activación de complejos senderos de señalización (Devoto, Turner 2003). Estas hormonas no participan en forma aislada en los procesos que regulan sino que interactúan entre sí y con otras moléculas señalizadoras. Se han descrito un importante número de interacciones entre los JAs y otras rutas de señalización como las de ET, auxinas, SA o ABA.

Ambos tipos de respuesta comparten ciertas características bioquímicas y moleculares aguas abajo como ser activación del sendero de señalización de MAPK, modificación post traduccional de proteínas preexistentes (Stulemeijer, Joosten 2008), activación transcripcional de los genes relacionados con la patogénesis (PRs), producción de proteínas antimicrobianas, inducción de la aparición de las formas reactivas de oxígeno (ROS) para el reforzamiento de las paredes celulares y de compuestos tóxicos contra los invasores. Bacterias rizosféricas como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* despiertan en la planta una ISR similar a SAR pero sin daños visibles sobre el huésped (Sharma, Nowak 1998). Los microorganismos que disparan la vía ISR a diferencia de los que inducen el SAR son benéficos. La mayoría de ellos son rizosféricos como *Pseudomona fluorescens* que resulta ser el organismo modelo. Los MAMPs

como flagelina y los lipopolisacáridos presentes en los microorganismos patógenos se encuentran también en estos benéficos y resultan ser potentes inductores de ISR. Además los antibióticos producidos por varios de estos microorganismos también funcionan como MAMPs en el encendido de esta respuesta inmune, un ejemplo de esto es el 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) producidos por cepas de *P. fluorescens*. Así como la vía SAR es dependiente de SA, ISR requiere componentes de JA y ET (Pieterse et al. 1998). Las dos vías son controladas por el regulador transcripcional NPR1. La expresión de los genes PRs en el camino SAR es dependiente de este regulador, en cambio en ISR no lo es, y depende de una molécula señal que está río arriba de NPR1 (Van Wees et al. 2000). El análisis transcriptómico de *A. thaliana* inoculada con *Pseudomonas fluorescens* cepa WCS417 reveló la expresión diferencial

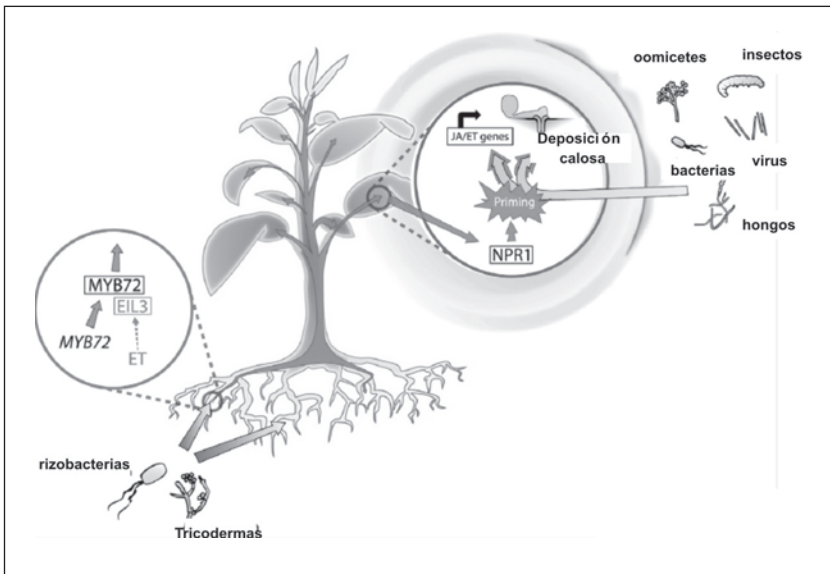


Figura 4: Modelo del camino ISR. El reconocimiento de MAMPs por los microorganismos benéficos rizosféricos como *Pseudomonas fluorescens* WCS417 o *Trichoderma asperellum* T34 conduce a la activación local en la raíz del factor de transcripción MYB72, el cual posiblemente interacciona con el factor de transcripción EIL3. Río abajo o paralelamente con MYB72/EIL3 un componente no identificado aún del camino de transducción del ET, es necesario en la raíz para activar un juego de genes en la parte aérea del camino ISR. La cascada de transducción del camino ISR requiere NPR1 probablemente en los tejidos sistémicos. La resistencia sistémica está asociada con un *priming* para la expresión aumentada de genes que responden a JA y o ET y una formación aumentada de papila conteniendo calosa en el sitio de entrada del patógeno. El ataque por patógenos o insectos activa la respuesta de defensa de la planta (borde superior de la figura en amarillo), la cual se acelera en plantas cebadas en ISR (flechas amarillas combinadas con azul). Modificado de Van der Ent et al. 2008, Current Opinion in Plant Biology, 11:443–448.

de 94 genes localmente expresados en raíces. El factor de transcripción MYB72 tiene un papel clave en los primeros pasos de la vía ISR y éste a su vez interacciona, al menos in vitro, con otro factor de transcripción EIL3, del tipo EIN3-like que responde a ET. Además la resistencia inducida en *Arabidopsis* por el hongo benéfico *Trichoderma asperellum* T34 parece depender de MYB72. MYB72 funciona como un nodo de convergencia en la defensa inducida por los microorganismos benéficos del suelo (Van der Ent et al. 2008). En la Figura 4 se resume la participación de los componentes del sendero ISR.

El estado inducido de defensa que despiertan estas bacterias en la planta, dispara una aumentada sensibilidad a JA/ET, hecho que se conoce como *priming* o potenciación de la planta para responder más rápidamente y con mayor intensidad al ataque de patógeno.

La interacción entre las plantas y sus patógenos ha llevado a distintos modos de adaptación a las respuestas defensivas primarias, secundarias y probablemente sistémicas. La co evolución de las plantas y sus patógenos ha llevado a la generación de nuevos efectores que ya no interaccionan con las RPs o que perturban a las proteínas blanco de las plantas de una forma tal que ya no son sensadas por las RPs en los casos de mecanismos indirectos de inducción de la respuesta defensiva. Distintos tipos de mutaciones son responsables de estos cambios; dependiendo de su importancia y modo de acción los genes de algunos efectores pueden ser completamente removidos por delección y otros sufren leves cambios en su secuencia aminoacídica que disminuye o impide su reconocimiento por las RPs pero que mantienen algunas funciones de virulencia (Arnold, 2007).

Mecanismos indirectos de la promoción del crecimiento ejercido por las PGPRs

Las plantas que establecen interacciones endofíticas deben mantener el número de endófitos bajo estricto control para asegurar la no patogenicidad de la infección. Resultados recientes indican que las respuestas defensivas de las plantas regulan su colonización por las bacterias endofíticas y que el ET, mediador de la respuesta ISR, disminuye la colonización en varios modelos planta/microorganismo (León-Kloosterziel et al. 2005). En caña de azúcar se llevó a cabo una caracterización molecular de algunos integrantes del camino de señalización del ET en relación con la colonización por bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno (Cavalcante et al. 2007). Se encontró que un receptor de ET, ER1, y dos factores de transcripción que responden a ET, ERF1 y ERF2, se expresan diferencialmente en respuesta a la interacción con bacterias benéficas y patógenas: la expresión de ER1 y de ERF2 aumenta drásticamente y la de ERF1 disminuye en la infección con endófitos fijadores de nitrógeno y estos cambios se invierten en la asociación con patógenos. Los receptores de ET son reguladores negativos del sendero (Ciardi et al. 2000) y su sobre expresión en tomate y *L. japonicus* produce una disminución en la capacidad

defensiva de la planta (Ciardi et al. 2000; Nukui et al. 2004). Por lo tanto, el aumento específico del receptor ER1 en la infección disminuiría la sensibilidad al ET y por lo tanto la defensa de la planta frente a la colonización. De estos resultados se puede concluir por un lado, que la inoculación no gatilla una respuesta general sobre los receptores de ET y por otro que ER1, ERF1 y ERF2 podrían participar en cascadas de transducción alternativas, todas mediadas por ET, con la capacidad de discriminar entre los dos tipos de asociaciones (beneficiosas y patógenas). Es importante señalar que de la comparación de secuencias de los dos factores de transcripción con las del banco de datos del NCBI surge que las secuencias con mayor identidad (98% para ScERF1 y 85% para ScERF2) corresponden a dos ERFs de arroz.

Los transcritos de numerosas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) se acumulan rápidamente en muchas especies de plantas después de minutos u horas de la infección con hongos, bacterias o virus o de ataques por insectos. Las PRs son de naturaleza muy variada y se han agrupado en 17 familias (PR1 a PR17). También su localización celular es variada: se las ha encontrado en los fluidos xilemáticos, lo que sugiere que habría una secreción hacia el sistema de transporte, pero otras tienen una localización citoplasmática. Algunas pueden aparecer solo en el órgano en que se dio la infección. Los senderos de transducción de señales mediados por SA, JA y ET regulan la activación transcripcional de numerosos genes PR. Algunas de estas proteínas son quitinasas (PRs 3, 4, 8 y 11) y glucanasas (PR2) que degradan polisacáridos estructurales de las paredes de los hongos perturbando así su proliferación. Algunos miembros de la familia PR8 tienen actividad de lisozima que limita el crecimiento de las bacterias.

A. brasilense puede limitar el crecimiento de bacterias no patógenas (Romero et al. 2003). La capacidad de biocontrol estaría relacionada con la producción de bacteriocinas, de sideróforos y la síntesis de ácido fenilacético con actividad antimicrobiana (Somers et al. 2005). Además hay evidencias que señalan la inducción de una respuesta sistémica de defensa en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* (Ribauda et al. 2010). El análisis transcriptómico de la respuesta sistémica de tomate a la inoculación con *A. brasilense* Cd ponen de manifiesto un gran número de genes que cambian su expresión en forma diferencial debido a la inoculación. Tomados en conjunto los resultados indican que la inoculación de tomate con *A. brasilense* moduló la expresión de un número importante de genes involucrados en la regulación de diferentes aspectos fisiológicos de la planta. Los más interesantes para nuestros objetivos son los relacionados con el metabolismo y la defensa. Entre estos últimos varias PRs (como PR1, PR2, PR5) algunas de las cuales responden a ET aparecen tempranamente sobreexpresadas en plantas inoculadas a los 7 días posteriores a la inoculación y se mantienen en este estado hasta los 14 días posteriores a la inoculación. Esto está en concordancia por lo señalado por Wang et al., 2005, en plantas de *A. thaliana* inoculada por la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* FPT 9601. Varios factores de transcripción como los de la familia WRKY, bZIP o ERF que responden a JA/ET se han encontrado

sobreexpresados como respuesta a la inoculación. Haciendo un estudio comparativo de nuestros resultados con los hallados por Alba et al. 2005 sobre el transcriptoma de tomate en respuesta a ET encontramos varias coincidencias en los genes que cambiaron su perfil de expresión como resultado al tratamiento con ET. Además la expresión de las ACS también se vio afectada por la inoculación. En el caso particular de LeACS2 encontramos que esta enzima cumple un papel importante en los primeros estadios de la infección de *S. rolf sii* con plantas de tomate (Riva et al. 2012). Los perfiles de inducción y represión de genes de defensa obtenidos en nuestro estudio muestran similitudes y diferencias con los sistemas planta/microorganismos benéficos. Verhagen et al. (2004) y Cartieaux et al. (2008) analizando la respuesta de *A. thaliana* a la inoculación con PGPRs no relacionadas como *P. fluorescens* WCS 4175 y *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278 respectivamente, encontraron que ambas inducían la expresión de genes asociados a la respuesta ISR, dependiente de JA/ET, típica de la inoculación con PGPRs, y que esta inducción sólo era detectada después que la planta había sido desafiada con un patógeno. Este estado de las plantas inoculadas, conocido como estado cebado, le proveería una mayor capacidad de respuesta frente a un patógeno invasor en cuanto a la rapidez y a la intensidad de la misma. En cambio, Wang et al. (2005) en un análisis transcriptómico llevado a cabo tres semanas después de la inoculación de *A. thaliana* con una especie endofítica de *Pseudomonas*, encontraron que se modulan genes pertenecientes al sistema ISR y también al sistema SAR. Como en nuestro caso, se sobreexpresan algunos genes relacionados con las reacciones de defensa (como proteínas PRs) y se subexpresan otros y todos estos cambios ocurren sin que las plantas inoculadas hayan sido infectadas con patógenos. En otro estudio menos extensivo, Conn et al. (2008) analizaron la expresión de PR1 y PR5 como representativas de respuesta SAR y de PDF1.2 y Hel como representativas de ISR en el sistema *A. thaliana*/actinobacterias endofíticas a las siete semanas de la inoculación. Si bien no todas las especies utilizadas en el estudio respondieron cuali y cuantitativamente de la misma forma, en tres de las cuatro se evidenció una inducción relativamente baja de genes SAR y de genes dependientes de JA/ET aún cuando las plantas no habían sido infectadas con patógenos. Después de la infección con un patógeno estos mismos genes se sobreexpresan fuertemente y aparecen sobreexpresados una gran cantidad de otros genes relacionados con la defensa. Se propone que la sobreexpresión de genes de defensa como resultado de la inoculación con la PGPR prepara a la planta para una respuesta de mayor intensidad y más rápida cuando es atacada por un patógeno. Resultados recientes de Niu et al. (2011) indican que el fenómeno de inducción paralela de respuestas dependientes de SA e ISR no está limitado a las PGPRs endofíticas; en efecto, *Bacillus cereus* AR156 induce resistencia sistémica en *A. thaliana* activando simultáneamente senderos de defensa dependientes de SA y de JA/ET que resulta en un efecto aditivo en el nivel de protección en *A. thaliana*. van Wees et al. (2000) por su parte demostraron que la activación simultánea de los senderos SAR e ISR resulta en un mayor nivel de protección frente a la infección de *Arabidopsis* por *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 que la activación de cada uno de ellos individualmente. Es decir, las PGPR capaces de inducir simultáneamente respuestas sistémicas que compartan características de ambos senderos son capaces de establecer un nivel de resistencia mayor y más versátil en el huésped.

A. brasilense comparte la característica de estas PGPRs de inducir una respuesta de defensa en la que se solapa la expresión de genes pertenecientes a las vías ISR y SAR. En consecuencia es de esperar que *A. brasilense* tenga la capacidad de proteger a las plantas contra la infección por patógenos que operan por diferentes mecanismos. Cuando evaluamos esta hipótesis llevando a cabo experimentos de biocontrol utilizando plantas de tomate infectadas con diferentes patógenos como un hongo necrotrófico (*Sclerotium rolfsii*), un hongo biotrófico (*Fusarium solani* pv *solani*) y una bacteria hemibiotrófica (*Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*) encontramos que *A. brasilense* disminuyó la incidencia de la infección (15%) y la mortalidad (40%) en plantas de tomate infectadas con *S. rolfsii* (Riva 2009). Las plantas infectadas con *F. solani* resultaron protegidas contra el daño (evaluado como peso de la planta) en un 100% a los 40 días después de la infección (Pardo 2006). Con respecto a la infección con *X. campestris* el parámetro evaluado fue el área foliar y se observó que en las plantas tratadas con *A. brasilense* no hubo inhibición del crecimiento en tanto que plantas control se inhibieron en un 40%. Es decir la hipótesis elaborada en base a la expresión de genes de defensa en plantas de tomate inoculadas según la cual *A. brasilense* debería comportarse como inductor de ISR se ve apoyada por los resultados comentados.

Conclusiones

Es muy poco lo que se conoce acerca de los genes que median el reconocimiento y la asociación efectiva de *A. brasilense* con plantas de interés agronómico. Gran parte de los estudios de expresión génica global en respuesta a la inoculación con PGPRs han sido llevados a cabo utilizando como modelo *A. thaliana* debido a que los senderos de defensa en esta planta han sido muy estudiados. Es importante destacar que nuestros trabajos más recientes se llevaron a cabo utilizando plantas de tomate que tienen una importancia económica relevante como fuente de alimento y los patógenos utilizados para evaluar su potencial capacidad de biocontrol son causantes de enfermedades que, debido a las prácticas habituales de cultivo, tienen una alta incidencia en el rendimiento económico. El ET tiene un rol importante en este sistema *A. brasilense*-tomate, tanto desde la promoción directa del crecimiento como desde la inducción de una respuesta defensiva en la planta que en algunos casos resultó ser efectiva aún después de 60 días de la inoculación (Riva, 2009).

Bibliografía

- Alba R., Payton P., Fei Z., McQuinn R., Debbie P., Martin G., Tanksley S.D., Giovannonia J.J. 2005 Transcriptome and Selected Metabolite Analyses Reveal Multiple Points of Ethylene Control during Tomato Fruit Development The Plant Cell, Vol. 17. 2954–2965.
- Arnold D.L., Jackson R.W., Waterfield N.R., Mansfield J.W. 2007. Evolution of microbial virulence, the benefits of stress. Trends Genet. 23: 293-300.

- Ausubel F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plant and animals conserved? *Nat Immunol.* 6:973-979.
- Axtell M.J., Staskawicz B.J. 2003. Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis thaliana* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112: 369-377.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. 2000. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fertil Soil.* 30: 485–491.
- Bashan Y., Dubrovsky J.G. 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biol. Fertil Soils.* 23:435-440.
- Bashan Y. 1998. *Azospirillum plant* growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can J Microbiol.* 44:168-174.
- Bent A., Mackey D. 2007. Elcitors, effectors and R genes: the new paradigm and life time supply of questions. *Annu Rev Phytopathol.* 45: 399-436.
- Bottini R., Cassan F., Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:497-503.
- Bent A., Mackey D. 2007. Elcitors, effectors and R genes: the new paradigm and life time supply of questions. *Annu Rev Phytopathol.* 45: 399-436.
- Cartieaux F., Contesto C., Gallou A., Desbrosses G., Kopka J., Taconnat L., Renou J.P., Touraine B. 2008. Simultaneous Interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS278 and *Pseudomonas syringae pv.tomato* DC3000 Leads to Complex Transcriptome Changes *Molec Plant Microbe Interaction.*
- Cavalcante J.J.V., Vargas C., Nogueira E.M., Vinagre F., Schwarcz K., Baldani J.I., Ferreira P.C.G., Hemerly A.S. 2007. Members of the ethylene signaling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J Exp Bot.* 58: 673-686.
- Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ (2000). Response to *Xantomonas campestris pv. vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol.* 123: 81-92.
- Conn VM, Walker AR, Franco, MM (2008). Endophytic actinobacteria induces defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 21. 2: 208-218.
- Curzi MJ, Ribaudó CM, Trinchero GD, Curá JA, Pagano EA (2008). Changes in the content of amino and organic acids and ethylene production of rice plants in response to the inoculation with *Herbaspirillum seropedicae*. *J Plant Interactions* 3. (3) 163-173.

- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S., Marco Y. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100: 8024-8029.
- Devoto A., Turner J.G. 2003. Regulation of jasmonate plant responses in *Arabidopsis*. *Ann Bot.* 92: 329-337.
- De Wit, P.J.G.M. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 2726-2732.
- Finlayson S.A., Reid D.M. 1994. Influence of CO₂ and ACC oxidase activity from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Phytochemistry.* 35: 847-851.
- Fluhr R., Mattoo A.K. 1996. Ethylene- biosynthesis and perception. *Crit Rev Plant Sci.* 15:479-523.
- García de Salomone I., Döbereiner J. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol Fertil Soils.* 21: 193-196.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20:338-343.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopatol.* 43, 205-227.
- Glick B.R., Jacobson G.B., Schwarze M.K., Pastenak J.J. 1994. 1-aminocyclopropano 1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation *Can. J Microbiol.* 40,911-915.
- Glick B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol.* 41:109-117.
- Glick B.R., Karaturović D.M., Newell P.C. 1995. A novel procedure for isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Can J Microbiol.* 41, 533-536.
- Glick B.R., Penrose D.M., Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol.* 190, 63-68.
- Glick B.R., Patten C.L., Holguin G., Penrose D.M. 1999. Biochemical y genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria, Imperail College Press.
- Gomez-Gómez L. 2004. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol Immunol.* 41 1055–1062.
- Grant S.R., Fisher E.J., Chang J.H., Mole B.M., Dangl J.L. 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 60, 425-449.
- Guo H., Ecker J.R. 2002. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 40-49.

- Hall J.A., Peirson D., Ghosh S., Glick B.R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Isr J Plant Sci.* 44:37-42.
- Jackson M.B. 1991. Ethylene in root growth and development. In: Mattoo A.K., Suttle J.C. (Eds). *The plant hormone ethylene*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 65-80.
- Jain D.K., Patriquin D.G. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can J Microbiol.* 31: 206-210.
- Johnson P.R., Ecker J.R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu Rev Genet.* 32, 227-254.
- Jones J.D.G., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444, 323-329.
- Kamiyoshihara Y., Iwata M., Fukaya T., Tatsuki M., Mori H. 2010. Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *The Plant Journal.* 64, 140–150.
- Kende H. 1993. Ethylene Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 44, 283-307.
- Kende H., Zeevart J.A.D. 1997. The five «classical» plant hormones. *Plant Cell.* 9, 1197-1210.
- León-Kloosterziel K.M., Verhagen B.W., Keurentjes J.J., Van Pelt J.A., Rep M., Van Loon L.C., Pieterse C.M. 2005. Colonization of *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle *Plant Mole Biol.* 57, 731-748.
- Li N., Mattoo A.K. 1994. Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key enzyme in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme. *J Biol Chem.* 269, 6908-6917.
- Lin Z., Zhong S., Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot.* 60, 12: 3311-3336.
- Mackey D., Holt B.F., Wiig A., Dangl J.L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108, 743-754.
- Mikkelsen M.D., Petersen B.L., Glawischnig E., Jensen A.B., Andreasson E., Halkier B.A. 2003. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiol.* 131, 298–308.
- Nico M., Ribaudó C.M., Gori J.I., Cantore M.L., Curá J.A. 2012. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Appl Soil Ecol.* 61:190-195.

- Niu Dong-Dong, Liu Hong-Xia, Jiang Chun-Hao Wang, Yun-Peng, Wang Qing-Ya, Jin Hai-Ling, Guo Jian-Hua. 2011. The Plant Growth–Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways MPMI.24, 5, 533-542.
- Nukui N., Ezurra H., Minamisawa K. 2004. Transgenic *Lotus japonicus* with an ethylene receptor gene CM-ERS1/H70A enhances formation of infection threads and nodule primordium. Plant Cell Physiol. 45, 427-435.
- Pardo M.A. 2006. Promoción del crecimiento y control de enfermedades en plantas de tomate mediante Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Tesis de grado FAUBA.
- Penmetsa R.V., Cook D.R. 1997. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. Science. 275, 527-530.
- Perrig D., Boiero M.L., Masciarelli O.A., Penna C., Ruiz O.A., Cassán F.D., Luna M.V. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. Appl Microbiol Biotechnol. 75:1143–1150.
- Piccoli P., Lucangeli C., Schneider G., Bottini R. 1998. Hydrolysis of 17,17-[2H₂]-Gibberellin A20-Glucoside and 17,17-[2H₂]-Gibberellin A20-Glucosyl Ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. Plant Growth Regul. 23: 179-182.
- Pieterse C.M., van Wees S.C., van Pelt J.A., Knoester M., Laan R. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 10:1571–80.
- Pierik R., Tholen D., Poorte H., Visser E.J.W, Voesenek L.A.C.J. 2006. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. Trends in Plant Science. 11, 176-183.
- Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. 2002. Antibiotic production by bacteria biocontrol agents. Antonie Leeuwenhoek. 81:537-547.
- Ribaudo C.M., Castilla R., Trinchero G.D., Vasallo G.J., Cantore M.L., Curá J.A. 2000. *Azospirillum irakense* induces a rise in biomass and changes in the SDS-phosphoprotein pattern in rice seedlings. Annu Meeting of Plant Physiol. San Diego, California U.S.A.
- Ribaudo C.M., Paccusse A.N., Curá J.A., Fraschina A.A. 1998. *Azospirillum*-maize association: effects on yield dry matter content and the nitrate reductase activity. Agricultura Tropica et Subtropica. 31:61-69. ISBN 80-213-0441-3.
- Ribaudo C.M., Rondanini D.P., Curá J.A., Fraschina A.A. 2001. Response of *Zea mays* to the inoculation with *Azospirillum* on the nitrogen metabolism under greenhouse conditions. A.A. Biologia Plantarum. 44 (4): 631-634. ISSN00063134.

- Ribaudó C.M., Rondanini D.P., Trincheró G.D., Curá J.A. 2006a. Influence Of *Herbaspirillum seropedicae* On Maize Nitrogen Metabolism Maydica. 51:481-485.
- Ribaudó C.M., Krumpholz E.M., Cassán F.D., Bottini R., Cantore M.L., Curá J.A. 2006b. *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. J Plant Growth Regulation.
- Ribaudó C., Hueso L., Ponds C., Granell A., Cura J., Cantore M., 2010. Respuesta sistémica de *Solanum lycopersicum* a la inoculación con *A. brasilense*. XII Congreso Argentino De Microbiología. pp. 18-19.
- Riva D.S. 2009. Evaluación de la respuesta sistémica en *Solanum lycopersicum* infectado con *Sclerotium rolfsii*: Aspectos bioquímicos y moleculares. Tesis de grado FAUBA.
- Riva D.S., Curá J.A., Cantore M.L., Ribaudó C.M. 2012. Early responses of tomato plants to the infection with *Sclerotium rolfsii*. Involvement of ethylene and *LE-ACS2* expression on the disease development. Enviado a MPML.
- Romero A., Correa O.S., Moccia S., Rivas J.G. 2003. Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion n the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. J Appl Microbiol. 2003, 95, 832-838.
- Santner A., Estelle M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. Nature. 459(7250):1071-8.
- Shah S., Li J., Moffat B.M., Glick B.R. 1997. ACC deaminase genes from plant growth promoting *Rhizobacteria*: present status and future prospects. (Eds) A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino, OECD, Paris. pp. 320-324.
- Sharma V.K., Nowak Y.J. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro coculture of seedlings with a plant growth-promoting *rhizobacterium* (*Pseudomonas* sp. strain PsJN) Can. J. Microbiol. 44:528-536.
- Shoebitz M., Ribaudó C.M., Pardo M.A., Cantore M.L., Ciampi L., Cura J.A. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biol Biochem. 41, pp. 1768–1774.
- Somers E., Ptacek D., Gysegom P., Srinivasan M., Vanderleyden J. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 71:1803–10.
- Stulemeijer I.J.E., Joosten M.H.A.J. 2008. Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. Mol Plant Pathol. 9 (4) 545-560.

- Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl Environ Microbiol. 37:1016-1024.
- Tsuchisaka A., Theologis A. 2004. Unique and Overlapping Expression Patterns among the *Arabidopsis* 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene Family Members [w]. Plant Physiol. 136, pp. 1-19.
- Van der Ent S., Verhagen B.W.M., Van Doorn R., Bakker D., Verlaan M.G., Pel M.J.C., Joosten R.G., Proveniers M.C.G., Van Loon L.C., Ton J., Pieterse C.M.J. 2008. MYB72 Is Required in Early Signaling Steps of *Rhizobacteria*-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 146. pp. 1293-1304.
- Van der Hoorn R.A.L., Wulff B.B.H., Rivas S., Durrant M.C., Van der Ploeg A., De Wit P.J.G.M., Jones J.D.G. 2005. Structure-function analysis of Cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmatic leucine-rich repeats. Plant Cell. 17, pp. 1000-1015.
- Van Wees C.M.S., Van der Ent S., Pieterse C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Curr Opin Plant Biol. 11:443–448.
- Van Loon L.C., Geraats B.P.J., Linthorst H.J.M. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. Trends in Plants Sci. 11,4 184-191.
- Verhagen B.W., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., van Loon L.C. 2004. The transcriptome of *rhizobacteria*-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Mol. Plant Microbe Interact. 17:895–908.
- Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C.G., Hemery A.S. 2006. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant–N₂-fixing endophytic bacteria association. J Exp Bot. Vol. 57, No. 3, pp. 559–569.
- Wang H., Woodson W.R. 1992. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the ethylene-forming enzyme from *Petunia* corollas. Plant Physiol. 100, 535-536.
- Wang Y., Ohara Y., Nakashiki H., Tosa Y., Ayama N.S. 2005. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. Mol. Plant-Microbe Interactions. 18 385-396.
- Welbaum G., Sturz Z., Nowak J. 2004. Fertilizing soil.
- Yoo S.D., Cho Y., Sheen J. 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. Trends Plant Sci. May; 14(5): 270–279.
- Zhao J., Guo Y., Fujita K., Sakai K. 2004. Involvement of cAMP signaling pathway in elicitor-induced phytoalexin accumulation in *Cupressus lusitanica* cell cultures. New Phytol. 161,723–733.
- Zipfel C., Felix G. 2005. Plant and animal: a different taste for microbes. Curr Opin Plant Biol. 8, 353-360.

Capítulo 13

Más allá del tratamiento a las semillas: Evolución de productos basados en PGPRs que contienen complejas comunidades microbianas

Beyond seed treatments: evolution of PGPR products containing complex microbial communities

Joseph W. Kloepper¹, Juan David Castillo, Marleny Burkett-Cadena, Katheryn S. Lawrence

Department of Entomology and Plant Pathology, 209 Life Science Building, Auburn University, Auburn AL 36849 USA. ¹Corresponding author. E-mail: kloeppjw@auburn.edu

Introduction

Various groups of microorganisms have been investigated for their capacity to improve plant growth or reduce plant disease. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial root-colonizing bacteria that elicit increased plant growth or reduced damage due to plant diseases. These benefits that result from inoculation of seeds or plant parts with PGPR are due both to production of bacterial metabolites such as plant growth regulators and antibiotics that alter the plant or the native rhizosphere community. In addition, some PGPR alter the host plant's physiology in a way that induces resistance to diseases (Kloepper et al. 2004b) and stress (Yang et al. 2009). Several reviews (de Bashan 2010; Kloepper et al. 2004b; Persello-Cartiaux et al. 2003; Vissey 2003) summarize the theoretical basis of PGPR, their mechanisms of action, and efficacy in greenhouse and field trials.

Early applications of PGPR focused on their use as biological control agents more than growth promotion. Recently with the growing global concern about reducing fertilizer run-off and contamination of surface and ground waters, there is a renewed interest in growth promotion. The goal is to select PGPR that increase root growth; because an increased root system will enable the plant to enhance the uptake of applied fertilizers while reducing application rates (Adesemoye et al. 2009). This use of PGPR to raise nutrient uptake is termed integrated nutrient management (Adesemoye et al. 2008) and is a common current aim in many countries.

Over the past decade, there has been a proliferation in PGPR-based products in the United States. The majority of these products contain a single purified

strain of PGPR applied as a seed treatment. Seed treatments have been the preferred delivery system in the U.S. partly due to integration of agricultural inputs into the seed. Growers tend to prefer purchasing inputs from a single source, such as the seed supplier, rather than purchasing multiple inputs from various sources. Hence, companies developing microbial inoculants have focused on seed treatment. A decision to limit the delivery system to a seed treatment has profound implications and limitations for which kinds of PGPR can be developed. For example, many strains of *Pseudomonas* are active as PGPR, however, they cannot be formulated as seed treatments. This is because the sales and distribution network of seeds requires that a bacterial seed treatment remain viable for 12-18 months and that it be compatible with seed treatment chemicals such as fungicides and insecticides which are also «stacked» onto seeds. This requirement means that for all practical purposes, only spore-forming PGPR, such as *Bacillus* spp. or *Streptomyces* spp. can be formulated as seed treatments. Examples of such PGPR that have been registered by the U.S. Environmental Protection Agency and that are sold as seed treatment products include *Bacillus pumilus* strain INR-7 (Hu et al. 2003; Kloepper et al. 2004b), *Bacillus subtilis* strain GB03 (Brannen, Backman 1993 and 1994; Hammon, Berrada 2001; Koepper et al. 2004a; Turner, Backman 1991), and *Bacillus subtilis* strain MBI 600 (Bennett et al. 2003; Kumar et al. 2009; Rossall, McKnight 1991).

Applying PGPR as seed treatments has been a successful approach for the products that are currently registered. However, as stated above, the PGPR which can be used as seed treatments are limited. In addition, seed treatments are obviously only applied once per year, thereby eliminating the potential to apply additional dosages, commonly referred to as «boosters», of PGPR during the growing season. Also, many research studies demonstrate that a combination of the living cells of PGPR and their metabolic products produced by fermentation can have more consistent or stronger beneficial effects on plants than application of only spores of the PGPR. Hence, there have been many attempts to produce PGPR products that are not limited to seed treatments.

Our aim in this manuscript is to present the evolution of products containing a common core consortium of PGPR strains which have recently been blended into a thixotropic formulation. This is done by presenting results of studies done at Auburn University over a 10 year period with various previous formulations of the main bacterial mixture currently used in the evolved thixotropic formulation. This formulation represents a new advancement in application of PGPR, since it allows PGPR to be applied multiple times during the growing season.

Methods

Description and origin of PGPR-based products tested

Beginning in 2002, tests at Auburn were conducted with an evolving group of products, all of which contained a core group of 50 PGPR strains which

were originally selected, maintained, and formulated by Organica Biotech in Norristown, Pennsylvania. The core bacterial group included 39 strains of spore-forming bacilli, 6 strains of *Pseudomonas* spp., and 5 strains of *Streptomyces* spp. The historical development and evolution of products containing this core microbial group is as follows. The company Naturize Inc. in Jacksonville, Florida developed Equity™ as an aqueous flowable formulation for use in transplant water or in irrigation water, using the core group of bacteria from Organica Biotech.

After developing Equity, the same company developed Naturize Potted Plant Food which was a water-soluble fertilizer (14-29-14) containing spores of the same *Bacillus* spp. strains that were in Equity and that were produced by Organica Biotech. At the same time that Equity and Naturize Potted Plant Food were being developed and marketed, Organica Biotech produced and marketed Plant Growth Activator™ (PGA). PGA was a powdered formulation of the same microbial mixture used in Equity and Naturize, aimed mainly at the home garden market.

The company Pathway Holdings in Palmetto, Florida purchased Organica Biotech in 2008. Personnel from Pathway Holdings had contributed to the original design of the PGPR mixtures and formulation of products from Naturize and Organica Biotech. During 2010, Pathway Holdings reformulated the same core group of PGPR into a thixotropic formulation, and this product is named Restore. Thixotropy is the property of certain gels and thick fluids to become soluble when exposed to shearing forces, such as those caused by moving water. Thixotropic technology utilizes chemical properties of metals, organic compounds, and phosphorus to produce a positionally stable material. Two or more liquids or solids are combined whereby a thickening reaction occurs. The resulting material is stable until friction, water movement, or mechanical force is applied. Another property of the thixotropic mixture is the ability to add both liquid and dry materials together that would otherwise not be feasible due to materials falling out of solution and segregating in the mix. Hence, mixing PGPR into a thixotropic formulation creates a slow and constant release of PGPR. Restore can be applied in the irrigation water or as in-furrow formulations based on extrusions of the thixotropic formulation.

Tests with Equity

Two routine growth promotion assays were developed to allow quality control testing of different batches of manufactured Equity. In Equity test 1, these bioassays were used to assess efficacy of a new batch of Equity and a batch that had been manufactured one year earlier and stored at room temperature. The first bioassay involved planting seeds of tomato cultivar Florilina in 248 Speedling Styrofoam trays in Promix soilless potting mix from Premier Peat, Riviere-du-Loup, Quebec, Canada. Each seed of the Equity treatments received 0.3 ml of a stock suspension of 33 ml Equity in 1.0 L

water. Controls consisted of seeds that received 0.3 ml of water. In the second bioassay, cucumber cultivar Diva seeds were planted in 128 Speedling trays, and each seed received 0.5 ml of the same stock suspension of Equity; controls received 0.5 ml water. After 21 days of growth in the greenhouse, 10 replicate plants per treatment were removed from trays, washed, blotted dry, and the fresh weight of the entire plant, roots, and shoots were recorded. Data were analyzed using ANOVA in JMP (SAS, Cary North Carolina) with comparison of treatment means using LSD at $P \leq 0.05$.

Equity test 2 used the routine tomato bioassay described above to assess growth promotion potential of Equity at several stages of a production run. The treatments were Equity sampled at the beginning, middle, and end of the production as well as a mixture of the final product. Stock suspensions of each treatment were prepared and applied to seeds as described above. The control received the same volume of water on each seed. In addition to the data collected in Equity test 2, the R/S ratio (root/shoot ratio) was calculated by dividing the mean weight of roots by the mean weight of shoots for each treatment. R/S ratios are important in the transplanted vegetable industry as a way of insuring that transplants have sufficient root systems to minimize transplant shock. Data were analyzed as in Equity test 1.

Five field trials were also conducted with Equity to determine if increased root system development that was noted in bioassays with Equity would result in reduced severity of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Trial 1 in 2001 was at the North Alabama Horticultural Research Center of the Alabama Agricultural Experiment Station in Cullman, Alabama. Trial 2 in 2002 was at the Sand Mountain Research and Education Center in Crossville, Alabama. Each of the selected fields had infestations of root-knot nematodes in the year prior to the test. Each trial consisted of 6 replicate plots of Equity and a water control, with each plot containing 10 transplanted tomato plants. At the time of transplanting, Equity was applied at a rate of 37 L/ha (1 gallon/acre). Root systems of 36 plants in 2001 and 54 in 2002 were sampled after harvest from within 6 replicate blocks of each treatment and rated for gall severity using a 0 – 10 scale, where 10 is most severe according to the procedure described by Zeck (1971). Means were analyzed using the paired *t*-test with calculation of LSD at $P \leq 0.05$ from the calculated *t*-value. The number of plants that received each rating (0 – 10) was recorded to examine frequency of severe gall ratings.

In 2003, trials 3, 4 and 5 were conducted at the Cullman Research Center. These trials were part of a sustainable agriculture test, and hence, they differed in aspects of the cover crop or tillage used. Trials 3 and 4 were in fields that had a mixture of three cover crops the winter preceding the test; in trial 3, tomato plants were transplanted using a mechanical no-till transplanter; in trial 4, tomato plants were transplanted using strip-tillage. Trial 5 was in a field that had no cover crops and was cultivated with raised beds covered

with polyethylene tarp. There were 6 replicate plots, each with 10 plants. At the time of transplanting, Equity was applied at a rate of 2 quarts/acre (18.5 L/ha) — half the rate of the initial trials in 2001 and 2002. Plants were sampled and rated, and data were analyzed as in the initial trials.

Tests with Naturize Potted Plant Food

Two experiments were conducted with this product that contained the same mixture of PGPR strains as Equity, but now formulated by mixing spores with a water-soluble fertilizer. Both experiments were designed to determine the effects of the product with and without 1% humate on tomato and pepper growth, in comparison to a control of 14-29-14 (N-P-K) fertilizer without bacteria. These tests were designed as quality control tests for the manufacturing company which was considering adding 1% humate to the product formulation.

In experiment Naturize 1, tomato and pepper seeds were planted into 128 Speedling transplant trays containing Promix and were treated immediately by watering with a solution containing the label rate of 1 tablespoon/gallon (3.9 cc/L) of Naturize potted plant food with and without humate or the same concentration of 14-29-14 fertilizer without bacteria as the control. The treatment and control fertilizer applications were applied once again at 14 days after planting. After 21 days for tomato and 24 days for pepper, 10 replicate plants per treatment were removed from each tray, washed, and blotted dry. Measurements were recorded for total plant weight, root weight, and shoot weight. The R/S ratio was calculated for each treatment. With tomato, measurements were also made for height of the seedlings and the stem caliper. Data were analyzed using ANOVA with comparison of treatment means using LSD at $P = 0.05$.

Experiment Naturize 2 tested the effects of the same treatments on tomato and pepper seedlings transplanted to 10-cm square pots containing Promix. The seedlings had been grown for 3 weeks in Speedling trays and had received one treatment of 14-29-14 fertilizer without bacteria at 7 days after seeding. Plants were treated with the same concentration of Naturize potted plant food with and without humate or the fertilizer control immediately after transplanting and once again 14 days after transplanting. At 21 days after transplanting, 6 replicate plants per treatment were removed and processed as described for experiment Naturize 1 to determine total plant weight, root weight, and shoot weight. Data were analyzed as in the previous experiment. Pepper transplants treated with Naturize potted plant food with and without humate had previously shown a marked increase growth rate compare to the fertilizer control without bacteria; hence, in experiment Naturize 2, the height and width of each plant was measured at 2, 9, and 14 days after planting, and the plant growth index was calculated as height (cm) X width (cm).

Tests with Plant Growth Activator

Two experiments were conducted with Plant Growth Activator (PGA). Experiment PGA-1 was designed to detect effects of Plant Growth Activator (PGA) on sunflower seedling growth and other parameters related to flower quality in the greenhouse. The MPN (most probable number) test was used to quantify the total bacterial population in the product, and then spore concentrations were adjusted to three final densities (10^6 , 10^7 , and 10^8 CFU/ml). PGA was applied by submerging sunflower cv. 'Valentine' seeds for five minutes in the bacterial suspension prior to planting in 128 Speedling trays in Promix. One ml of the appropriate spore concentration was placed over each seed after planting. Eight days after planting, seedlings were fertilized with 20-10-20 soluble fertilizer at a rate of 2.5 g/L of water. After initial application, plants were not fertilized again and were watered as needed. Twelve days after planting, seedlings were removed from trays, dipped into bacterial suspensions, and transplanted into 10-cm square pots, with 30 replicate pots per treatment. A control without PGA was included. The experiment was a completely randomized design. Plants were sampled three times, with 10 plants being sampled per treatment at each time. At 12 and 35 days after seeding, roots were washed, blotted dry, and total plant weight, root weight, and shoot weight were measured. Caliper diameter was recorded at the first sampling time. The third sample was taken 48 days after seeding, when chlorophyll content and leaf surface area were measured as indicators of photosynthetic capacity, and stem length (plant height) and flower diameter were measured as indicators of quality. Chlorophyll content was measured using a SPAD-502 Chlorophyll Meter (Spectrum Technologies, Inc. Plainfield, IL 60544); the mean of three readings per leaf from two mature leaves per plant was recorded. Leaf surface area was calculated with the AgVision system (Decagon Devices Inc., Pullman, WA 99163) by sampling two mature upper leaves of each plant. Stem length and flower diameter were measured on plants with market-quality flowers. Data were analyzed using ANOVA and were subjected to the paired Student's t-test ($P \leq 0.05$) comparing treatments means by using Fisher's protected LSD.

Experiment PGA-2 was designed to evaluate effects of PGA on tomato seedling growth and root architecture. Seeds of tomato cv. 'Juliette' were planted in 128 Speedling trays in Promix. PGA was applied by mixing 1 tablespoon of product/gallon water (3.9 cc/L) and watering trays with this suspension. Controls received only water. Seedlings were fertilized at 1, 7, and 14 days after seeding with 20-20-20 soluble fertilizer. Six replicate seedlings were removed from the trays at 6, 10, 14, and 30 days after planting. Roots were carefully washed and blotted dry prior to recording the fresh weight of roots and shoots. Root systems of each plant were then examined for root architecture as previously described using scanner model LA 1600+ and WinRhizo software. Data from the resulting analyses were collected for root surface area, root volume, mean root diameter, root length, and number of root tips. Data were analyzed as described for experiment PGA-1.

Tests with Restore from Pathway Holdings

Five tests were conducted in the greenhouse with Restore. Restore test 1 was designed to calculate the populations of PGPR that are delivered to plants when the product is applied through irrigation. Two application methods were used, a tank mix and a process column, which represent the two common ways in which farmers are now using the product in irrigated agriculture. For the test, small scale models were designed of the actual tank mix and process columns used by farmers. The model for the tank mix application consisted of a 20 L container with a circulating pump and a section of pipe (PVC - polyvinylchloride) 8 cm diameter X 20 cm long, capped at the bottom end with slits in the cap. Using products and rates provided by the manufacturer, a thixotropic formulation of nutrients for the microorganisms was placed into the pipe and a powdered formulation of the Restore microorganisms was placed into container. The mixture was incubated at room temperature with the circulating pump for 10 hrs. The resulting suspension was diluted 1:20 with water to recreate the concentration applied through irrigation systems, and the population was determined using most probable number (MPN) technique in tryptic soy broth with two replications and three tubes of each dilution per replication. The model for the process column was a section of PVC pipe 20 cm diameter X 75 cm long with caps on both ends and an output line that delivered the contents in the same concentration used in field irrigation systems. Populations were determined in the process column by inserting into the column a thixotropic formulation that contained both the microorganisms and the microbial nutrients, pressurizing the system by connecting it to a residential water hose, and collecting the suspension that flowed from the output line for a 15 min. period. Aliquots were removed and used to determine the population using MPN. Each of tests with the tank mix and process column was conducted three times, and populations were calculated as means of the three tests.

Restore tests 2-5 evaluated the effects of the PGPR consortia applied in a manner designed to replicate the commonly used system in vegetable production, by alternating applications of PGPR from the tank mix and the process column. Each experiment was a randomized block with 3 treatments and 8- 10 replications. Treatments were 1) tank mix alone, 2) tank mix + process column and 3) water control. Each replicate consisted of a 25-cm-diameter pot containing a soilless potting mix. Applications began one week prior to planting 10 cucumber seeds in each pot, by adding 100 ml of formulation per pot. Treatment 1 was applied three times during each test: 7 days before planting, day of planting, and 7 days after planting (DAP). With treatment 2, the application from the process column was applied at the same times as treatment 1, and the application from the tank mix was applied 4 days after each of these. Treatment 3 was treated with water on the same schedule.

Restore test 2 evaluated seedling growth promotion using the PGPR applications. The experimental design was doubled so that the test could be destructively sampled at 7 and 14 days after planting. At these times, seedlings

were washed and weighed to determine whole seedling and root weights. Then, using WinRhizo analysis, the mean total root length, surface area, and number of root tips were determined as measurements of root architecture.

Restore tests 3-5 were biological control assays of the PGPR applications against three soilborne pathogens: *Pythium ultimum* (test 3), *Pythium aphanidermatum* (test 4), and *Rhizoctonia solani* (test 5). Pathogens were applied at the time of planting by pipetting 5 ml of inoculum over the cucumber seeds before covering. Inoculum was prepared by growing cultures on corn meal agar (*Pythium* sp.) or potato dextrose agar (*R. solani* for 5 days and then homogenizing agar from 4 plates in 400 ml sterile water. All of the pathogens can cause both pre- and post-emergence damping off and stunting of plant growth. Hence, data were collected on emergence at 5 DAP, final stand of healthy seedlings at 14 DAP, and disease incidence calculated as the number of missing, dead, or wilted seedlings at 20 DAP.

Results

Tests with Equity

In Equity test 1, both the freshly prepared batch of Equity and the one-year-old batch increased ($P = 0.05$) the total plant weight, root weight, and shoot weight of tomato and cucumber, compared to the control in (Table 1). On tomato, the one-year-old batch of Equity induced a 45% increase in root weight, and on cucumber, the corresponding increase in root weight was 48%.

Table 1.

Promotion of tomato and cucumber plant growth with a new and 1-yr old batch of Equity.^a

Treatment	Tomato			Cucumber		
	Total	Root	Shoot	Total	Root	Shoot
	Fresh weight (g)	fresh weight (g)	fresh weight (g)	fresh weight (g)	fresh weight (g)	fresh weight (g)
Equity new ^b	3.82*	1.24*	2.58*	6.45*	1.96*	4.49*
Equity 1-yr ^c	4.52*	1.34*	3.18*	7.61*	2.24*	5.37*
Control	3.00	0.92	2.08	5.48	1.51	3.97
LSD _{0.05}	0.76	0.50	0.38	0.67	0.39	0.45

^a Tomato seeds were planted in a 248 Speedling tray with Promix soilless medium. Equity was applied by adding to each seed 0.3 ml of a stock suspension of 33 ml Equity in 1.0 liter of water. Cucumber seeds were planted in a 128 Speedling tray using 0.5 ml of the same stock suspension of Equity. Ten replicate plants of each treatment were assessed 21 days after planting.

^b Equity new indicates a fresh batch of Equity from the manufacturer.

^c Equity 1-yr indicates Equity that was stored at room temperature one year after manufacturing.

* Indicates significant increase relative to the control at $P \leq 0.05$.

Equity test 2 was a typical quality control bioassay testing the growth-promoting potential of samples of Equity taken at various times during the production run. Results (Table 2) indicate that all samples of Equity increased ($P \leq 0.05$) total plant weight, root weight, shoot weight, and the R/S ratio, compared to the water treated control.

Table 2.
Quality control bioassay for growth promotion of tomato with Equity.^a

Treatment ^b	Total fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot fresh weight (g)	Root/shoot ratio
Start of run	1.89*	0.73*	1.16*	0.64*
Middle of run	2.07*	0.77*	1.30*	0.59*
End of run	1.96*	0.73*	1.23*	0.60*
Mixed final product	2.00*	0.78*	1.23*	0.64*
Control	1.28	0.36	0.92	0.40
LSD _{0.05}	0.28	0.14	0.18	0.11

^a Tomato seeds were planted in a 248 Speedling tray with Promix soilless medium. Equity was applied by adding to each seed 0.3 ml of a stock suspension of 33 ml Equity in 1.0 liter of water. Ten replicate plants of each treatment were assessed 21 days after planting.

^b Treatments represent samples taken at various stages of the preparation of the product. Start of run is at the beginning of the mixing, middle of run is half-way through the mixing, end of run is near the final mixing, and mixed final product is a sample from the final mixing.

* Indicates significant increase relative to the control at $P = 0.05$.

Results of 5 field trials demonstrated that the PGPR mixture in Equity can reduce damage from root-knot nematodes. In trial 1, the nematode pressure – gall rating of the control – was relatively low, and Equity reduced ($P \leq 0.01$) the mean gall rating of the control from 2.2 to 0.7. In trial 2 where nematode pressure was higher, Equity reduced ($P = 0.01$) the mean gall rating of the control from 4.1 to 2.3. In addition to lowering the mean gall rating, treatment with Equity resulted in a marked change in frequency of gall ratings. In trial 1 (Figure 1), 92% of the plants sampled from the Equity treatment had a gall rating of 0 or 1, while 69% of the control plants had a gall rating of 2 or 3. In trial 2 (Figure 2), this same trend was noted; 51% of the plants sampled from the Equity treatment had a gall rating of 1 or 2, while only 18% of control plants had a rating of 1 or 2, and 27% of control plants had a rating of 5 – 8.

Reductions ($P = 0.05$) in gall ratings also occurred with Equity in all three tests conducted in 2003 (Table 3). The nematode pressure in trials 3, 4, and 5 was similar to that in trial 2, with mean gall ratings of the controls ranging from 3.64 to 4.11. In each of the field trials, the following observation was made: Equity-treated plants produced new roots after nematode infection while control plants generally did not (Figure 3).

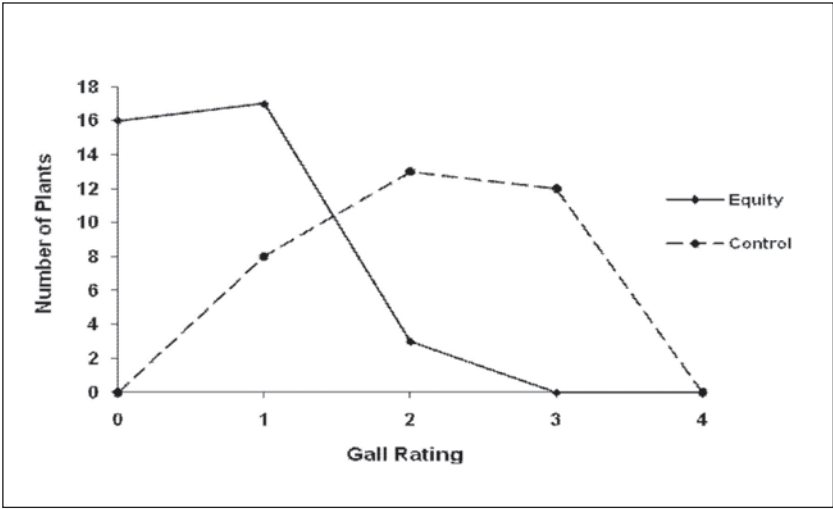


Figure 1: Reduction in root-knot nematode damage on tomato by Equity in field trial 1. Root systems of 36 plants sampled from within 6 replicate blocks of each treatment were dug after harvest and rated for gall severity using a 0 – 10 scale (Zeck 1971), where 10 is most severe. The mean gall rating for Equity was 0.7 and it was 2.2 for the control (significant difference at $P \leq 0.01$).

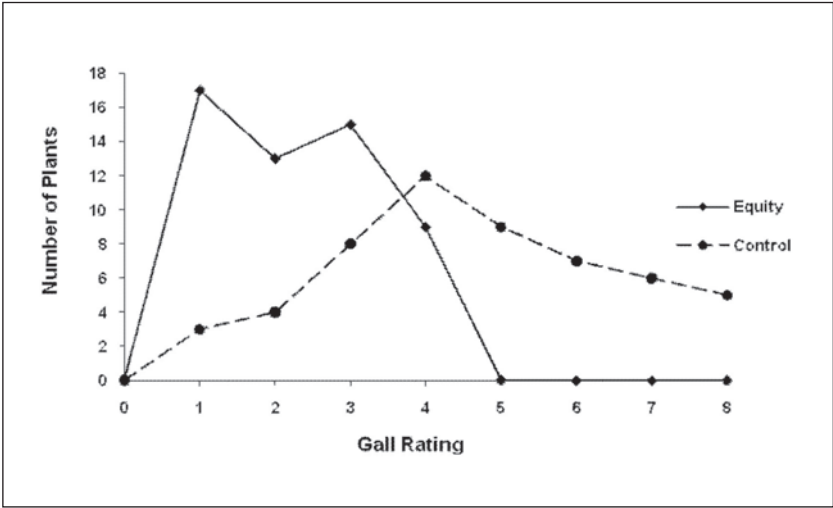


Figure 2: Reduction in root-knot nematode damage on tomato by Equity field trial 2. Root systems of 54 plants sampled from within 6 replicate blocks of each treatment were dug after harvest and rated for gall severity using a 0 – 10 scale (Zeck 1971), where 10 is most severe. The mean gall rating for Equity was 2.3 and it was 4.1 for the control (significant difference at $P \leq 0.01$).

Table 3.
Reduction in severity of root-knot nematode galls on tomato treated with Equity in three field trials in 2003.

Field Trial	Treatment	Gall Rating ^a
3	Equity	1.00*
3	Control	3.64
	LSD _{0.05}	0.64
4	Equity	1.30*
4	Control	4.11
	LSD _{0.05}	0.78
5	Equity	2.76*
5	Control	3.92
	LSD _{0.05}	0.88

^aRoot systems of 36 plants sampled from within 6 replicate blocks of each treatment were dug after harvest and rated for gall severity using a 0 – 10 scale (Zeck 1971), where 10 is most severe.

* Indicates significant increase relative to the control at $P \leq 0.05$.

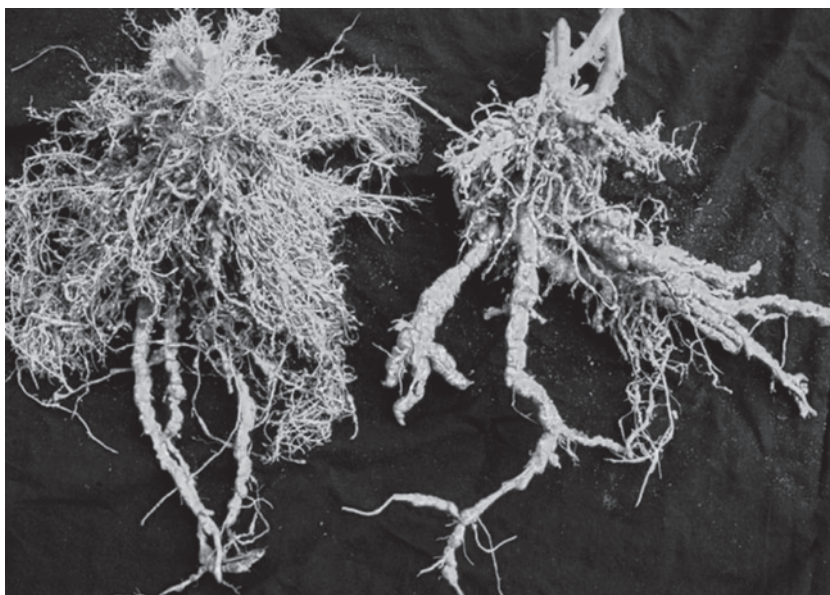


Figure 3: Production of new roots after nematode infection on Equity-treated tomato plants. Photograph depicts common observation in field trials 3, 4, and 5 in which Equity treated plants (left) continued producing new roots after nematode infection while control plants (right) did not.

Tests with Naturize Potted Plant Food

Naturize Potted Plant Food (NPPF) was evaluated on seedlings and on transplants of tomato and pepper. In experiment Naturize 1 (Table 4), NPPF with and without 1% humate increased ($P = 0.05$) total plant weight, root weight, shoot weight, and R/S ratio of tomato and pepper seedlings, compared to the control treatment of the corresponding fertilizer without bacteria. In addition, the treatments with the bacterial consortia in NPPF also increased height and stem caliper of tomato seedlings. The effect of humate on seedlings depended on the crop. There were no statistical differences among treatments on any growth parameters of pepper, but on tomato, the addition of humate increased, compared to NPPF without humate, all parameters except R/S ratio and significantly increased shoot weight.

Table 4.

Promotion of tomato and pepper seedling growth with Naturize Potted Plant Food containing PGPR (experiment Naturize 1).

Crop	Treatment ^a	Total weight (g)	Root weight (g)	Shoot weight (g)	R/S ^b	Height (cm)	Stem caliper (mm)
Tomato	NPPF	1.08*	0.42*	0.66*	0.64*	3.67	2.01*
	NPPF + humate	1.19*	0.45*	0.74*	0.61*	3.84*	2.08*
	Control	0.59	0.20	0.39	0.51	3.48	1.21
	LSD _{0.05}	0.13	0.09	0.08	0.10	0.28	0.22
Pepper	NPPF	0.70*	0.26*	0.45*	0.58*	ND ^c	ND
	NPPF + humate	0.64*	0.22*	0.42*	0.52*	ND	ND
	Control	0.48	0.14	0.34	0.41	ND	ND
	LSD _{0.05}	0.11	0.06	0.07	0.09	ND	ND

^a NPPF = Naturize Potted Plant Food

^bR/S is the root/shoot ratio.

^cND indicates that the value was not determined.

* Indicates significant increase relative to the control at $P \leq 0.05$.

On transplants in experiment Naturize 2 (Table 5), NPPF with and without humate increased ($P = 0.01$) tomato total plant, root, and shoot weights and pepper total and root weights, compared to the fertilizer control without bacteria. The addition of humate did not further increase the measured weights compared to NPPF without humate. Pepper transplants treated with NPPF with or without humate exhibited a faster growth rate, compared to plants treated with the fertilizer control without bacteria, as indicated by divergent growth indexes beginning at 9 days after transplanting (Figure 4).

Table 5.
Growth promotion of tomato and pepper transplants with Naturize
Potted Plant Food containing PGPR (experiment Naturize 2).

Crop	Treatment ^a	Total weight (g)	Root weight (g)	Shoot weight (g)
Tomato	NPPF	49.3*	16.2*	33.2*
	NPPF + humate	47.7*	15.8*	31.2*
	Control	26.7	10.2	16.6
	LSD _{0.05}	4.8	2.2	0.28
Pepper	NPPF	9.6*	3.2*	6.4
	NPPF + humate	9.5*	3.3*	6.2
	Control	7.2	2.2	5.1
	LSD _{0.05}	2.0	0.6	1.4

^a NPPF = Naturize Potted Plant Food.

* Indicates significant increase relative to the control at $P \leq 0.05$.

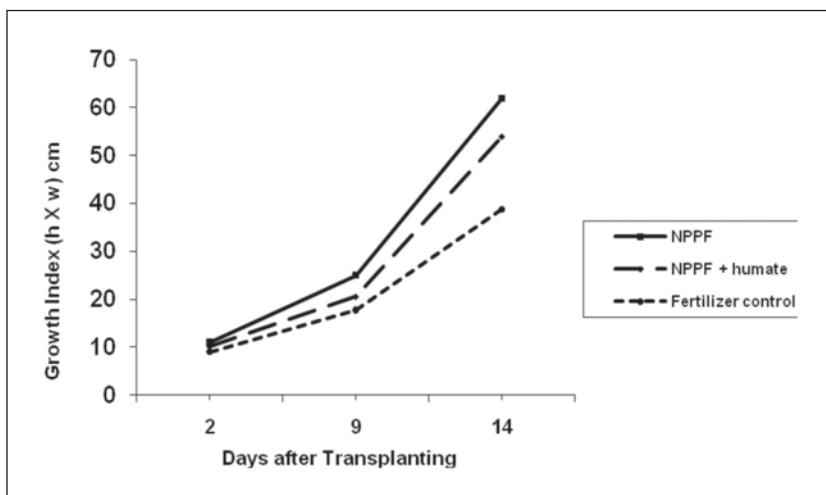


Figure 4: Stimulation of pepper transplant growth rate by Naturize Potted Plant Food (NPPF) with and without 1% humate. NPPF contains 14-29-14 soluble fertilizer plus spores of the same *Bacillus* spp. strains that were in Equity. The fertilizer control is 14-19-14 soluble fertilizer without bacteria.

Tests with Plant Growth Activator

Treatment of sunflower seeds with PGA at concentrations of 10^6 , 10^7 , and 10^8 CFU/ml in experiment PGA-1 resulted in increased ($P = 0.05$) total plant, shoot, and root weights (Table 6A), while stem caliper was increased with the two highest

rates of PGA. This increased plant growth continued through 35 days after planting, when all three PGPR concentrations also increased total plant, shoot, and root weights. At 48 days after planting, plants that received all concentrations of PGA had enhanced ($P = 0.05$) photosynthetic capacity, as indicated by chlorophyll content and leaf area (Table 6B). Quality of flowers, as measured by stem length and flower diameter, were also generally greater with PGA-treated plants.

Table 6A.

Effects of PGA on sunflower seedling growth (experiment PGA-1).

Treatment	12 Days After Seeding				35 Days After Seeding			
	Total plant weight (g)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Stem caliper (mm)	Total plant weight (g)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	
PGA 10 ⁶	1.75 *	1.08*	0.67 *	7.86	52.84*	33.93*	18.91*	
PGA 10 ⁷	1.74 *	1.14*	0.60 *	8.59*	54.26*	36.18*	18.07*	
PGA 10 ⁸	1.78 *	1.11*	0.67 *	8.91*	55.65*	35.30*	20.35*	
Control	1.09	0.85	0.22	7.53		39.39	25.91	10.53
LSD _{0.05}	0.27	0.16	0.15	0.91	10.96	5.97	6.42	

Values shown are means of two experiments with 10 replicate plants.

* Indicates significant difference from the control value of the same column at $P \leq 0.05$.

Table 6B.

Effects of PGA on photosynthetic capacity and quality of sunflower 48 days after planting (experiment PGA-1).

Treatment	Stem caliper (mm)	Chlorophyll content (SPAD meter readings)	Mean leaf area (cm ²)	Mean stem length (cm)	Flower diam. (cm)
PGA 10 ⁶	7.86	34.94 *	58.99*	92.35*	9.16
PGA 10 ⁷	8.59 *	37.66 *	61.46*	97.07*	9.85*
PGA 10 ⁸	8.91 *	35.12 *	64.19*	98.35*	10.15*
Control	7.53	28.50	44.09	78.93	8.46
LSD _{0.05}	0.91	3.70	10.96	9.30	1.11

Values shown are means of two experiments with 10 replicate plants.

* Indicates significant difference from the control value of the same column at $P \leq 0.05$.

In experiment PGA-2, PGA increased ($P = 0.05$) parameters of tomato plant growth and root architecture from 6 through 30 days after planting (Table 7). Growth promotion on plants treated with PGA was evident as early as 6 days after planting, when the mean root weight was increased, which resulted in a higher R/S ratio. At

the subsequent sampling times (10, 14, and 30 days after planting) PGA-treated plants had higher shoot and root weights than control plants. Significant ($P = 0.05$) changes in root architecture on PGA-treated plants were also evident as early as 6 days after planting, when root surface area, root length, length of fine roots (those with a diameter of 0 – 0.5 mm), and number of root tips were greater than on control plants. At 30 days after planting, significant increases existed in all measured parameters of root architecture on PGA-treated plants except root volume.

Table 7.

Effects of PGA on tomato seedling growth and root architecture (experiment PGA-2).

6 days after planting									
Treatment	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	R/S	Root surface area (cm ²)	Mean root diam. (mm)	Root volume (cm ³)	Root length (cm)	Length of fine roots ^a (mm)	Number of root tips
PGA	0.027	0.047*	1.65*	0.88*	1.04	0.02	2.62*	1.11*	13.33*
Control 1.20	0.028	0.012	0.45	0.35	1.21	0.02	1.50	0.44	7.33
LSD _{0.05}	0.019	0.023	1.05	0.29	0.22	0.02	0.11	0.37	3.34

30 days after planting									
Treatment	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	R/S	Root surface area (cm ²)	Mean root diam. (mm)	Root volume (cm ³)	Root length (cm)	Length of fine roots ^a (mm)	Number of root tips
PGA	0.37*	0.63*	1.71	36.92*	1.13*	1.11	117.53*	75.63*	766*
Control 1.20	0.21	0.36	1.80	15.97	0.89	0.75	74.75	52.57	439
LSD _{0.05}	0.18	0.22	0.77	9.21	0.22	0.61	26.41	18.96	296

Values shown are means of 6 replicate plants.

^a Fine roots are the smallest diameter class (0 – 0.5) determined by the WinRhizo analyses.

* Indicates increase compared to control at $P \leq 0.05$.

Tests with Restore from Pathway Holdings

In Restore test 1, which simulated two delivery systems for the thixotropic formulations of the PGPR consortia, the mean populations determined from three tests were log 6.06/ml with the process column and log 9.82/ml for the tank mix. In Restore test 2 (Table 8), both application systems of PGPR (tank mix alone and tank mix + process column) promoted early seedling growth. This growth promotion was evident as significantly increased overall seedling weight and root weight as well as changes in the root architecture, including increased root length, surface area, and numbers of root tips.

Results from the three biological control assays (Table 9) showed that the disease pressure in the tests was moderately severe, with mean disease

Table 8.

Effects of Restore applications on cucumber seedling growth and root architecture (Restore test 2).

<u>7 days after planting</u>						
Treatment	Seedling fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Total length (cm)	root area (cm ²)	Surface of root tips	Number
Tank mix alone	0.98 *	0.22 *	77.0 *	17.2 *	487 *	
Tank mix + process column	1.10 *	0.16 *	43.7 *	13.7 *	405 *	
Control	0.67	0.07	17.0		3.0	158
<u>LSD_{0.05}</u>	0.18	0.04	20.7		10.7	163

<u>14 days after planting</u>						
Treatment	Seedling fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Total length (cm)	root area (cm ²)	Surface of root tips	Number
Tank mix alone	4.03 *	0.86 *	155 *	64.2 *	671 *	
Tank mix + process column	3.96 *	0.85 *	177 *	62.2 *	838 *	
Control	3.14	0.63	97	37.8	426	
<u>LSD_{0.05}</u>	0.67	0.21	35	13.9	197	

* Indicates significant difference from the control value of the same column at $P \leq 0.05$.

incidence of the non-inoculated controls ranging from 35% with *Pythium ultimum* to 45% with *P. aphanidermatum*. Under these conditions, Restore, applied with both applications systems significantly reduced damage to all three soilborne pathogens. Protection was evident as reductions in both pre-emergence damping-off (emergence at 5 DAP) and post-emergence damping off (final stand). Restore also resulted in healthier root systems (Fig. 5).



Figure 5: Biological control of *Pythium ultimum* damping-off by Restore. From Restore test 3. Right = water control; left = Restore; both were inoculated with the pathogen.

Table 9.
Biological control activity of Restore against soilborne pathogens on
cucumber (Restore tests 3-5).

Seedling	Final healthy		
Treatment	emergence 5 DAP ¹	stand 14 DAP	Disease incidence ²
Tank mix alone	9.1 *	8.5 *	1.5 *
Tank mix + process column	9.4 *	9.1 *	0.9 *
Control	7.9	6.5	3.5
LSD _{0.05}	0.62	0.79	0.8

Restore test 4: *Pythium aphanidermatum*

Seedling	Final healthy		
Treatment	emergence 5 DAP ¹	stand 14 DAP	Disease incidence ²
Tank mix alone	9.2 *	8.1 *	1.9 *
Tank mix + process column	8.8 *	8.4 *	1.6 *
Control	6.3	5.5	4.5
LSD _{0.05}	0.78	0.93	0.9

Restore test 5: *Rhizoctonia solani*

Seedling	Final healthy		
Treatment	emergence 5 DAP ¹	stand 14 DAP	Disease incidence ²
Tank mix alone	9.5 *	8.8 *	1.2 *
Tank mix + process column	9.4 *	9.0 *	1.0 *
Control	8.1	6.1	3.9
LSD _{0.05}	0.82	0.84	0.84

Values shown are means of 10 replications, each with 10 seedlings.

¹ Days after planting.

² Number of missing, dead, or wilted plants.

* Indicates significant difference from the control value of the same column at $P \leq 0.05$.

Discussion

The results presented here demonstrating plant growth promotion and biological control with Restore (the thixotropic formulation of PGPR from Pathway Holdings) and earlier product formulations of the same core bacterial consortium (Equity, Naturize Potted Plant Food, and PGA) are in agreement with results from several published studies with two of the earlier products. For example, two publications have reported effects of Equity. In the first study, Equity was reported to increase plant growth and to reduce salt uptake of squash plants growing under conditions of salinity stress (Yildirim et al. 2006). In another study with root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato, treatment with Equity induced significant reductions in nematode eggs per gram root, juvenile nematodes in soil, and galls per plant (Burkett-Cadena et al. 2008).

Three publications have reported benefits of PGA. Kalogridis *et al.* (2006) presented results of two field trials in Florida using PGA against Fusarium wilt disease, caused by *Fusarium oxysporum*, on the ornamental plant Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) demonstrating that the PGPR consortium provided protection against the pathogen and that this protection with the consortium «was superior to products with limited or single microbial species.». The same publication also presented results of a field trial showing that PGA reduced disease incidence on two varieties of basil (*Ocimum basilicum*) transplanted into a field infested with the Fusarium wilt pathogen, *F. oxysporum*. As summarized by the authors, basil treated with the bacterial consortium «showed a drastic decrease in the incidence of Fusarium wilt with both susceptible and resistant varieties benefiting from applications.» In the second report with PGA (Adesemoye *et al.* 2008), PGA alone and with mycorrhizae increased yield and nutrient uptake in a two-year field study on corn under conventional tillage and no-till with inorganic fertilizer and poultry litter. The third report (Adesemoye *et al.* 2009) was a greenhouse study with tomato under different fertilization levels. Inoculation with PGA resulted in levels of plant growth, yield and nitrogen uptake per gram of tomato shoot at 70% and 80% of recommended fertilizer that were statistically equivalent to the values for non-inoculated plants with 100% fertilizer.

The thixotropic formulation, as embodied in the product Restore, represents a promising advancement in the development of PGPR as microbial inoculants by allowing formulations of mixed communities together with microbial food bases that can aid bacterial population development. Considering that a typical drip, furrow, or overhead irrigation system can deliver 100 ml per plant, the finding in Restore test 1 that the populations of PGPR delivered were log 6.06 per ml with the process column and 9.82 per ml with the tank mix suggests that Restore can be applied at populations of log 7 – 11 per plant with each irrigation. In some agricultural settings, such as vegetable production in Florida, plants are irrigated 4 – 6 times per week. Adding thixotropic formulations such as Restore into each irrigation has the potential to dramatically modify the rhizosphere microflora and to maintain the introduced PGPR in a metabolically active stage during the entire growing season. In addition, because the components of the thixotropic formulation can be changed relatively easily and inexpensively, one can envision a future with customized PGPR consortia being applied periodically during a season to address a particular site-specific need such as biocontrol of a disease outbreak or alleviation of an abiotic stress.

References

- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol.* 54:876–886.
- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb Ecol.* 58:921-929.

- Bashan Y., de-Bashan L.E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv Agron.* 108: 77-136
- Bennett A.J., Leifert C., Whipps, J.M. 2003. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pastuerised, sterilized and non-sterile soils. *Soil Biol Biochem.* 35:1565-1573.
- Brannen P.M., Backman P.A. 1993. Cotton colonization by *Bacillus subtilis* inoculants to augment seedling disease control and promote season-long root health. Pages 194-196 in *Proceedings of the Beltwide Cotton Production Research Conferences*. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Brannen P.M., Backman P.A. 1994. Suppression of Fusarium wilt of cotton with *Bacillus subtilis* hopper box formulations. Pages 83-85 in M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen, eds. *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. CSIRO Publishing. Glen Osmond, Australia.
- Burkett-Cadena M., Kokalis-Burrelle N., Lawrence K.S., van Santen E., Kloepper J.W. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biol Control.* 47:55-59.
- Hammon R.W., Berrada A. 2001. Evaluation of Kodiak biological seed treatment to control seedling diseases of chickpea. in: *Western Colorado Research Center Research Report 2001*. Colo. St. Univ. Agric.Exp. Sta. Tech. Rpt. TR01-13 p16.
- Hu C.H., Ryu C.M., Kloepper J.W. 2003. Assessment of the potential for *Bacillus pumilus* strain INR7 to induce systemic resistance in soybean. Pages 468-472 in M. S. Reddy, M. Anandaraj, S. J. Eapen, Y. R. Sarma and J. W. Kloepper, eds. *6th International PGPR Workshop Abstracts and Short Papers*. Indian Institute of Spices Research, Calicut, India.
- Kalogridis P.K., Scholberg J.M.S., McGovern R.J., Brown R.B., Buhr K.L. 2006. Commercial microbial inoculums and their effect on plant growth and development: A synopsis of current literature and case studies. *Environ Qual.* 65:21-30.
- Kloepper J.W., Reddy M.S., Kenney D.S., Vavrina C., Kokalis-Burrelle N., Martinez-Ochoa N. 2004a. Applications for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticult.* 631: 217-229.
- Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 2004b. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94: 1259-1266.
- Kumar K.V.K., Raju S.K., Reddy M.S., Kloepper J.W., Lawrence K.S., Growth D.E., Miller M.E., Sudini H., Du B. 2009. Evaluation of commercially available PGPR for control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *J. Pure Appl. Microbiol.* 3:485-488.

- Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C. 2003. Tales from the underworld: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* 26: 189-199.
- Rossall S., McKnight S.E. 1991. Some effects of *Bacillus subtilis* (MBI 600) on the development of cotton and peanut. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Interlaken, Switzerland 14-19 October 1990. Bulletin OILB SROP, Avignon, France.
- Turner J.T., Backman P.A. 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 75: 347-353.
- Vissey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255: 571-586.
- Yang J., Kloepper J.W., Ryu, C.M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1-4.
- Yildirim E., Taylor A.G., Splittler, T.D. 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Scientia Horticulturae.* 111:1-6.
- Zeck W.M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz-Nachrichten.* 24: 141-144.

Capítulo 14

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal como componentes en el mejoramiento ambiental

Plant growth-promoting bacteria as a component for environmental improvement

Luz E. de-Bashan, Juan-Pablo Hernández y Yoav Bashan

Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23090, México, The Bashan Foundation, 3740 NW Harrison Blvd., Corvallis, Oregon 97330, USA.
E-mail: bashan@cals.arizona.edu

Introducción

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal [PBPB por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Bacteria Bashan (Holguin 1998) o PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Kloepper et al. 1980) en este capítulo nos referiremos a estas como PGPB, término aceptado internacionalmente], son bacterias aisladas de diversos ambientes con la habilidad potencial de afectar de manera positiva el crecimiento de las plantas. La inoculación con PGPB/PGPR es una práctica agrícola común que ha ido en aumento en años recientes (Bashan 1998; Diaz-Zorita, Fernandez-Canigia 2009). Las PGPB afectan a las plantas mediante una multitud de mecanismos diferentes y existen en la literatura revisiones extensivas que los describen (Lucy et al. 2004; Bashan, de-Bashan 2005, 2010; Lugtenberg, Kamilova 2009). Probablemente algunos de ellos son válidos para las PGPB empleadas en los estudios ambientales, por tal motivo, este capítulo no se centrará en la discusión de tales mecanismos.

Es bien conocido que existe un continuo descenso en la calidad ambiental en todo el planeta debido a actividades humanas, principalmente deforestación y liberación desmedida de contaminantes, tales como metales pesados, y exceso de nutrientes (N y P) al ambiente. La opción de retirar y trasladar los contaminantes a rellenos sanitarios es costosa y con frecuencia poco práctica, debido principalmente a la cantidad de suelo involucrado, como sucede en los desechos mineros, y al aumento constante de los sitios contaminados. De esta manera, es importante encontrar opciones biotecnológicas de remediación de bajo costo. Una de las estrategias

emergentes es el uso de tecnologías que usan las plantas como extractoras, mitigadoras y estabilizadoras de los contaminantes (fitorremediación) o que estabilizan y recuperan la productividad del suelo (reforestación) (Cunningham et al. 1995; McCutcheon, Schnoor 2003). Los beneficios que presenta la fitorremediación involucran, entre otros, crear suelo más sano, promover y sostener comunidades bacterianas esenciales para una biorremediación a largo plazo y en últimas, mejorar el paisaje (Mendez, Maier 2008). Algunas plantas no pueden establecerse en estos sistemas degradados, y aun en el caso en que lo hagan, generalmente se ven afectadas por las condiciones ambientales adversas, tales como la excesiva concentración de los contaminantes, el pH extremo (alto o bajo), la escasez de nutrientes, la pobre estructura del suelo y una comunidad microbiana severamente afectada; como una forma de ayudar en su establecimiento se ha propuesto su inoculación con PGPB y con hongos micorrízicos arbusculares. Estos microorganismos se encuentran actualmente bajo experimentación en programas de revegetación, reforestación de suelos erosionados, tratamiento biológico de aguas residuales, fitorremediación, fitoestabilización y restauración de ecosistemas de manglar (Bashan et al. 1999; Bashan, Holguin 2002; de-Bashan et al. 2002a, 2004; Hernandez et al. 2006; Lebeau et al. 2007; Grandlic et al. 2008).

El objetivo de este capítulo es presentar el estado del arte en el uso de PGPB en re-vegetación y reforestación de sitios desertificados y sitios contaminados, fitoestabilización de desechos mineros, fitoextracción de metales pesados y contaminantes orgánicos, fitodegradación de contaminantes, reforestación de manglares y mejoramiento de tratamiento terciario de aguas residuales.

Uso de PGPB en la revegetación y reforestación de suelos desertificados y erosionados

Los suelos de zonas áridas se ven continuamente degradados por las actividades humanas (Wang et al. 2004) en un proceso llamado desertificación. La desertificación reduce las tierras cultivables, aumenta la erosión del suelo y el riesgo de inundaciones, reducen la producción agrícola y producen enfermedades respiratorias debido a la polución por polvo (McTainsh 1986; Ortega-Rubio et al. 1998; Wang et al. 2004).

La restauración de zonas desérticas severamente degradadas, con arbustos, árboles y cactus es siempre difícil y en muchos casos solo marginalmente exitosa (Glenn et al. 2001; Roundy et al. 2001; Bean et al. 2004; Banerjee et al. 2006). Entre los principales problemas que se presentan en estas áreas están el que sistema de árboles nodriza que gobiernan la vegetación natural en el desierto se encuentra destruido y la capa superficial de suelo con sus microorganismos benéficos esta erosionada por acción del viento y el agua, la materia orgánica es muy baja, la estructura del suelo esta

destruida, hay una limitada disponibilidad de nutrientes y el agua es escasa. Por estas razones, la sucesión natural y la revegetación en estas zonas áridas, si ocurre, es muy lenta, por lo que cualquier intento de reforestar el desierto con plantas nativas debe considerar primordialmente la restauración de la microflora benéfica asociada con estos árboles y arbustos, además de proporcionar una fuente adicional de materia orgánica (Velázquez-Rodríguez et al. 2001; Bacilio et al. 2006; Grandlic et al. 2008; Bashan, de-Bashan 2010).

Entre las estrategias utilizadas para encarar la desertificación están la de reforestar con plantas nativas y exóticas (Moore, Russell 1990; Miyakawa 1999), crear una cobertura agrícola y de pastizales (Portnov, Safriel 2004), mejorar la calidad del suelo con compost o lodos para aumentar el contenido de materia orgánica y la capacidad de retención de agua (Mendez et al. 2007), e inocular las plantas con microorganismos promotores de crecimiento vegetal (Grandlic et al. 2008; Bashan et al. 2011). De manera específica, la reforestación en suelos desérticos degradados involucra al menos tres etapas (Grover, Musick 1990). Primero, es necesario establecer de manera rápida una cubierta vegetal con plantas anuales nativas que contrarresten el proceso de erosión, una tarea difícil de realizar cuando las lluvias son esporádicas o impredecibles (Roundy et al. 2001; Banerjee et al. 2006). Segundo, se requiere el establecimiento de una cobertura de plantas tipo arbustivas para lograr la reforestación a corto y mediano plazo (Bean et al. 2004). El último paso es el establecimiento de un programa a largo plazo que controle la erosión del suelo, utilizando plantas de crecimiento lento tales como el cactus cardón gigante *Pachycereus pringlei* (Bashan et al. 1999, 2000b).

Como una forma de coadyuvar en programas de revegetación, deben introducirse de manera artificial algunos microorganismos esenciales que promuevan el crecimiento de las plantas. Las PGPB y los hongos micorrízicos arbusculares son benéficos en ambientes limitantes y adversos, debido a su rol en la mitigación de estreses ambientales en las plantas (Sylvia, Williams 1992). Las PGPB del género *Azospirillum* ejercen sus principales efectos promotores de crecimiento cuando las plantas están sometidas a estrés tales como alta salinidad (Bacilio et al. 2004), sequía (Creus et al. 1997, 1998), excesivos ácidos húmicos (Bacilio et al. 2003), pH (de-Bashan et al. 2005), y metales pesados (Belimov, Dietz 2000). Las hifas de los hongos micorrízicos arbusculares permean grandes volúmenes de suelo (Camel et al. 1991), interconectando los sistemas radicales de las plantas adyacentes -lo cual facilita el intercambio de nutrientes entre ellas- contribuyendo al crecimiento de las plantas y al mejoramiento de la estructura del suelo, debido a su íntima asociación con las células vivas dentro de las raíces y el suelo (Bethlenfalvay, Schüepp 1994; Wright, Upadhyaya 1998; Bethlenfalvay et al. 2007).

Hasta el momento se ha publicado una relativamente gran cantidad de trabajos que describen la utilización de la PGPB *Azospirillum brasilense*, de amplio uso en agricultura, para mejorar el crecimiento de plantas en desiertos que han perdido su capacidad natural de revegetación (Puente, Bashan 1993; Bashan et al. 1999; Carrillo-García et al. 2000; Carrillo et al. 2002; Bacilio et al. 2006). A.

brasilense posee múltiples mecanismos de promoción de crecimiento tales como la producción de varias fitohormonas principalmente IAA, giberelinas y óxido nítrico, tiene capacidad diazotrofa, además de varios mecanismos menores, todos trabajando en secuencia para mejorar el crecimiento de las plantas (Bashan et al. 2004; Bashan, de-Bashan 2010). Estudios iniciales han demostrado que al inocular el cactus *Pachycereus pringlei* con *A. brasilense* hay un aumento en el crecimiento de la planta (Puente, Bashan, 1993). En un experimento de campo a lo largo de un camino de ripio altamente erosionado en México, tres especies diferentes de cactus fueron inoculadas con la bacteria y como resultado se obtuvo un porcentaje mayor de sobrevivencia, 76%, de estas plantas en comparación con plantas control no inoculadas, donde menos del 2% de las plantas sobrevivieron después de 3.5 años. El resultado más significativo en este cultivo de cactus fue el control de la erosión del suelo en el área y la acumulación de suelo superficial nuevo (Bashan et al. 1999). Adicionalmente, *A. brasilense* afecta la actividad de las enzimas de la vía del fosfogluconato y mejora el crecimiento de plántulas de mezquite amargo (*Prosopis articulata*) que han sido cultivadas en suelos pobres (Leyva, Bashan 2009).

En un ensayo en invernadero, se estudió el efecto que la inoculación con PGPB (*A. brasilense* y *Bacillus pumilus*), hongos micorrízicos arbusculares no identificados (principalmente *Glomus* sp.) y compost común, ejercía sobre tres árboles de leguminosa de lento crecimiento, comúnmente usados en programas de reforestación y en jardinería en el desierto de Sonora, en el noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos. El mezquite amargo y el palo verde (*Parkinsonia microphylla*) respondieron de manera positiva en varios de los parámetros medidos, mientras que no se obtuvo respuesta con palo junco (*Parkinsonia florida*). La sobrevivencia de las tres especies fue de más del 80%, con una sobrevivencia del mezquite de más del 100% después de 10 meses de cultivo. La inoculación con microorganismos promotores de crecimiento ocasionó efectos significativos en el intercambio gaseoso en las hojas de estas plantas, medido como la transpiración y la resistencia a la difusión, cuando estos árboles fueron cultivados sin restricciones de agua (Bashan et al. 2009). Con esta misma combinación de inoculación se realizaron siete ensayos en campo, utilizando adicionalmente cactus cardón. La estrategia para reducir el largo proceso de sucesión ecológica en el desierto, que usualmente se presenta durante el establecimiento de plantas clímax tales como el cactus cardón, fue asociar las plántulas del cactus con árboles de leguminosa que actúan como nodrizas y ayudan al establecimiento y crecimiento del cactus (Bashan et al. 1999, 2000b; Carrillo-García et al. 1999). Este estudio de campo demostró que la restauración de zonas desérticas severamente erosionadas es posible utilizando árboles de leguminosa nativos ayudados parcialmente por agentes microbianos y compost, destinados a aumentar la fertilidad del suelo y la actividad microbiana cerca de estos (Bashan et al. 2011).

Adicional al uso de las PGPB de origen agrícola, se han aislado PGPB nativas del desierto de la superficie de raíces de cactus cardón (Puente et al. 2004a),

endófitas de cardones (Puente et al. 2009a) y endófitas del cactus *Mammillaria fraileana* (Lopez et al. 2011a), estas dos especies de cactus creciendo como plantas pioneras sobre rocas y riscos en ausencia de suelo. Las bacterias endófitas aparentemente intemperizan las rocas sobre las cual crecen las plantas, liberando minerales esenciales y al mismo tiempo producen pequeñas cantidades de suelo que posteriormente será lavado de las pendientes y acumulado en las tierras bajas, permitiendo de esta manera el crecimiento de otras plantas del desierto que no son capaces de crecer sobre rocas (Lopez et al. 2009). Al eliminar las endófitas de las semillas se obtiene un crecimiento y desarrollo más lento en las plántulas de cactus. Cuando se inocularon semillas de estos cactus con las mismas bacterias y se cultivaron en roca molida por un periodo largo de tiempo, casi todas las bacterias mostraron ser promotoras de crecimiento para estas plantas, permitiéndoles establecerse en ambientes extremadamente adversos (Puente et al. 2004b, 2009b; Lopez et al. 2011b). Finalmente, varias PGPB aisladas de zonas áridas mejoraron el enraizamiento de esquejes de mezquite (Felker et al. 2005).

El empleo de hongos micorrízicos arbusculares es común en la reforestación con arbustos y árboles en zonas templadas aunque menos en zonas desérticas. A pesar de que se ha demostrado la existencia de hongos micorrízicos arbusculares en numerosas especies de árboles y cactus del desierto (Carrillo-García et al. 1999; Bashan et al. 2000; Bashan et al. 2007), la inoculación con estos microorganismos es todavía escasa. Es probable que los hongos micorrízicos arbusculares jueguen un papel similar en las plantas del desierto al que ejercen en cultivos agrícolas, porque las plantas dependen de estos hongos simbióticos para la adquisición de nutrientes, especialmente fósforo y en general, el transporte de minerales. Sin embargo, los datos científicos son aun escasos.

Combinaciones de hongos micorrízicos arbusculares nativos (*Glomus coronatum*) y no nativos (*G. intraradices*), *Rhizobium* y otras PGPB han sido utilizadas para aumentar el crecimiento de plantas en un desierto semiárido. La inoculación con *Rhizobium* dio como resultado un aumento en la biomasa de raíz y tallo y en la nodulación de las raíces, mientras que las PGPB aumentaron la germinación de las semillas. Los hongos micorrízicos arbusculares nativos fueron mas efectivos que los no nativos, sugiriendo que los aislados nativos pueden ser mas apropiados para las condiciones específicas de este ecosistema (Requena et al. 1997). De manera similar, bacterias genéticamente modificadas que colaboran con las micorrizas, fueron desplazadas por las cepas silvestres (Valdenegro et al. 2001). En un estudio de 5 años, se encontró que la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y rhizobia mejoro el establecimiento de plantas clave del ecosistema y, adicionalmente, aumentó la fertilidad del suelo (Requena et al. 2001).

Uso de PGPB en la restauración y reforestación de manglares

Los bosques de mangle son ecosistemas marinos tropicales

constantemente amenazados por el desarrollo costero y la proliferación de la acuicultura (Rönnbäck 1999). Estos ecosistemas proporcionan un servicio ambiental importante, al actuar como sitios de reproducción de incontables especies marinas y de aves acuáticas que son un requisito irremplazable para las pesquerías en los trópicos (Holguin et al. 2001). Además, los manglares constituyen una barrera natural que protege a las poblaciones costeras y los arrozales de las tormentas tropicales y tsunamis, principalmente en Asia. Aunque los manglares en los trópicos húmedos son mas fáciles de reforestar (Primavera et al. 2004), los manglares en ambientes áridos y semiáridos son especialmente sensibles y tienen dificultades para regenerarse después de una perturbación (Toldeo et al. 2001; Vovides et al. 2011). Se ha predicho que sin la restitución de la red nutricional microbiana, la restauración de los manglares puede ser difícil, si no imposible (Holguin et al. 2001). En consecuencia, se han realizado estudios para caracterizar estos ecosistemas, sus comunidades y procesos microbianos, incluyendo estudios con bacterias fijadoras de nitrógeno y el proceso de fijación de nitrógeno (Holguin et al. 1992; Toledo et al. 1995a; Flores-Mireles et al. 2007; Vovides et al. 2011), la solubilización de fosfato (Vazquez et al. 2000; Rojas et al. 2001), metanogénesis (Strangmann et al. 2008) y las poblaciones de bacterias heterótrofas (Gonzalez-Acosta et al. 2006), con el fin de desarrollar estrategias exitosas de revegetación (Holguin et al. 2006).

Bashan y Holguin (2002) propusieron inicialmente el uso de PGPB para reforestar manglares deteriorados y realizaron un bosquejo de las posibles interacciones microbianas que están involucradas en este proceso. Ellos identificaron una colección de bacterias aisladas de este ecosistema que poseen mecanismos de promoción de crecimiento, tales como fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de fitohormonas. Trabajos iniciales inoculando mangle con la cianobacteria diazótrofa *Microcoleus chthonoplastes*, aislada de los neumatóforos de mangles, dieron como resultado el aumento en la colonización radicular y la acumulación de nitrógeno *in planta* (Toledo et al. 1995b; Bashan et al. 1998). Esta cianobacteria y varias otras PGPB del manglar, han sido también benéficas para *Salicornia bigelovii*, una planta oleaginosa halófila anual que habita en marismas en asociación con bosques de mangle. La inoculación de estas plantas aumentó la biomasa vegetal en un 70% y mejoró la calidad de sus aceites esenciales (Bashan et al. 2000a).

Se han realizado también importantes trabajos inoculando *A. brasilense* en plántulas de mangle. Trabajos iniciales demostraron que dos especies, *A. brasilense* y *A. halopraeferens*, colonizaron la superficie de las raíces de plántulas de manglar negro (Puente et al. 1999). Estudios adicionales se han enfocado en el aislamiento y caracterización de grandes colecciones de potenciales PGPB de las plantas de mangle y de las condiciones que controlan su proliferación (Holguin, Bashan 1996; Rojas et al. 2001; Kathiresan, Selvam 2006; Flores-Mireles et al. 2007). Kathiresan y Selvam (2006) estudiaron una colección de 48 aislamientos y reportaron que dos de ellos demostraron el

potencial de aumentar el crecimiento de las plantas en más del 100%, haciéndolos excelentes candidatos para proyectos de reforestación.

Uso de PGPB en la fitorremediación de suelos contaminados

La fitorremediación es una estrategia para solucionar la contaminación de suelos mediante el uso de plantas que actúan como mitigadoras del problema, sin necesidad de extraer el material contaminante y disponerlo en otro sitio. Las plantas son capaces de acumular, degradar o eliminar metales, pesticidas, solventes, petróleo y una gran variedad de contaminantes industriales. Se han documentado muchos ejemplos de fitorremediación exitosa (Suresh, Ravishankar 2004). La fitorremediación es generalmente considerada como una tecnología limpia, económica, ambientalmente amigable y no disruptiva, con la posibilidad adicional de recuperar y reusar los metales extraídos. La principal desventaja es que requiere un compromiso a largo plazo, ya que el proceso depende del crecimiento de la planta, su tolerancia a la toxicidad y su capacidad de bioacumulación. La fitorremediación comprende varias aproximaciones independientes en algunas de las cuales las PGPB podrían tener un efecto positivo:

a. Fitodegradación

La población microbiana de la rizósfera de algunas plantas puede contar con especies capaces de degradar xenobióticos (Donnelly et al. 1994; Macková et al. 2007; Mendez, Maier 2008) y puede servir como promotora de crecimiento cuando las plantas crecen en estos suelos contaminados. En un suelo contaminado artificialmente con creosote, la inoculación con bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y PGPB (*Pseudomonas putida*, *Azospirillum brasilense* y *Enterobacter cloacae*) aumentó la velocidad de eliminación de los HAP en presencia de las PGPB, debido posiblemente a que estas son capaces de mitigar el estrés en plantas por la actividad de la ACC-deaminasa, un mecanismo común en este tipo de bacterias (Huang et al. 2004). Adicionalmente, las PGPB *Pseudomonas* spp. mejoraron el crecimiento de canola en presencia de cobre o HAP (Reed, Glick 2005; Reed et al. 2005). Las PGPB también participaron en la degradación de ácido 2-clorobenzoico y petróleo en suelos donde crece *Vicia faba* (Radwan et al. 2005). Un plásmido fue transferido de *Burkholderia cepacia* a una cepa de PGPB endófito de esta planta para proteger el nuevo huésped contra la toxicidad de tolueno y reducir su evaporación (Barac et al. 2004; Glick 2004).

b. Fitoextracción

En la fitoextracción (conocida también como fitoacumulación) las plantas eliminan los contaminantes del ambiente concentrándolos en su biomasa

vegetal. El proceso ha sido evaluado principalmente en la extracción de metales pesados. Dentro de la biomasa vegetal, los contaminantes están más concentrados que en el ambiente, un hecho que facilita su disposición final. La fitoextracción puede realizarse con plantas hiperacumuladoras, es decir, plantas que pueden tolerar y absorber mayor cantidad de metales tóxicos que las plantas regulares. Estas plantas también pueden producir quelantes que faciliten la movilización de los metales y permitan una más fácil absorción (Cunningham et al. 1995; Pilon-Smits 2005).

Dado que las plantas absorben contaminantes del suelo mediante el sistema radicular, los factores biológicos que modifican el metabolismo de las raíces tales como la inoculación con PGPB podrían mejorar este proceso. Las PGPB mejoran la fitoextracción de dos maneras: 1) aumentando el crecimiento general de la planta de manera que la mayor biomasa absorba una mayor cantidad del contaminante, y 2) mejorando la dilución y/o biodisponibilidad del contaminante, haciéndolo más fácil de absorber por las plantas (Lebeau et al. 2007). Una PGPB ideal podría tener los dos mecanismos (Sheng, Xia 2006; Saravanan et al. 2007; Rajkumar, Freitas, 2008a) pero usualmente se ha estudiado uno solo ellos. La biomasa seca de soya creciendo en suelos contaminados con arsénico aumentó como respuesta a la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* (Reichman 2007). La elongación de las raíces de helechos y la acumulación de arsénico aumentaron debido a la inoculación con bacterias rizosféricas (Jankong et al. 2007). *Variovorax paradoxus* tiene la capacidad de aumentar la elongación de la raíz de la mostaza india (*Brassica juncea*) en presencia de cadmio (Belimov et al. 2005). La inoculación con cepas bacterianas en diferentes plantas aumentó significativamente la acumulación de varios metales, pero sin aumento en la biomasa vegetal; sin embargo, la inoculación podría mejorar la nutrición vegetal como un todo (Hoflich, Metz, 1997; Whiting et al. 2001; Reed, Glick 2005; Rajkumar, Freitas 2008a). Varias cepas rizosféricas mejoraron la volatilización y la acumulación de Se y Hg en tejidos vegetales en un humedal construido artificialmente (de Souza et al. 1999a, b). El aumento en la solubilidad de metales y la subsiguiente absorción por parte de la planta de estos contaminantes puede ser el resultado de la producción de ácidos orgánicos por algunas PGPB (Saravanan et al. 2007), ya que se sabe que muchas PGPB solubilizadoras de fosfato producen ácidos orgánicos (Vazquez et al. 2000; Puente et al. 2004 a,b; Rodríguez et al. 2004, 2006; Lopez et al. 2011b).

c. Fitoestabilización de desechos mineros

La gran cantidad de desechos mineros, producidos por el procesamiento de minerales en minas tanto abandonadas como productivas, es una amenaza de salud a largo plazo en las poblaciones urbanas circundantes, en forma de polvo tóxico y contaminación de las fuentes de agua. Esto sucede porque los desechos mineros, al carecer de una cobertura vegetal y estructura de suelo

como tal, son fácilmente degradados por acción del viento y la lluvia, convirtiéndose en una continua fuente de contaminación por metales (Pilon-Smits 2005). De esta manera, se ha propuesto la fitoestabilización usando plantas nativas como una estrategia económica para reducir estos riesgos (McCutcheon, Schnoor 2003). Esta aproximación involucra la creación de una cobertura vegetal sobre los desechos mineros que sea suficientemente densa para prevenir su erosión. Un importante desafío es que algunos de esos desechos mineros no sirven, en su estado natural, como sustrato para el crecimiento de la mayoría de las plantas, debido a su concentración de metales tóxicos, bajo pH, carencia de minerales esenciales, de arcillas y material orgánica que pueda retener agua, de cualquier estructura de suelo, de un banco de semillas de plantas nativas o la combinación de todos estos parámetros ambientales (Mendez, Maier 2008). De esta manera, los desechos mineros pueden permanecer desprovistos de plantas por décadas o en el mejor de los casos, solo contar con una ligera cobertura vegetal (Gonzalez-Chavez et al. 2008). Una solución parcial puede ser la adición de gran cantidad de compost, biosólidos y agua (Ye et al. 2001; Chiu et al. 2006) de manera que se restituyan las condiciones del suelo. Aunque posible, tales enmiendas son costosas debido al gran volumen de estos desechos mineros y en algunos casos a su remota localización. Más aun, en zonas desérticas no existe un suministro de agua constante y suficiente.

Se ha propuesto la inoculación con PGPB y con hongos micorrízicos arbusculares como una forma de ayudar a las plantas a establecerse en los desechos mineros, y reducir la cantidad de compost necesaria para su mejoramiento (Petrisor et al. 2004; Zhuang et al. 2007; Mendez, Maier 2008; Solís-Domínguez et al. 2011). Existen dos aproximaciones en la búsqueda de PGPB compatibles con los desechos mineros. Una es aislar bacterias nativas, con capacidad de promover el crecimiento, directamente de los desechos mineros o de las plantas que crezcan sobre estos, propagarlas y usarlas como inoculantes. Este procedimiento aunque laborioso, ha sido probado de manera exitosa (Grandlic et al. 2008, 2009). La premisa en esta aproximación es que las PGPB aisladas de los desechos mineros pueden ayudar a la planta a sobrevivir y crecer a través de varios mecanismos incluyendo el aumento en disponibilidad de nutrientes, aumento en la resistencia a la toxicidad por metales o la disminución de la biodisponibilidad de metales tóxicos en la rizósfera (Burd et al. 1998, 2000; Pishchik et al. 2002; Glick 2003; Belimov et al. 2004; Reed, Glick, 2005; Reed et al. 2005; Vivas et al. 2006; Wu et al. 2006a; Li et al. 2007; Rajkumar, Freitas 2008a, b). La aproximación alternativa es examinar muchas PGPB utilizadas en agricultura (Bashan, de-Bashan 2005) que pudieran ayudar a las plantas a establecerse sobre estos desechos. Por ejemplo, el género *Bacillus*, que se encuentra comúnmente en varios tipos de desechos mineros (Natarajan 1998; Vijayalakshmi, Raichur 2003; Wu et al. 2006b; Tsuruta 2007; Zhang et al. 2007), ejerce un efecto positivo en el crecimiento de cultivos agrícolas, plantas silvestres, árboles y microalgas, a través de de diferentes mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

(Enebak et al. 1998; Vessey 2003; Kloepper et al. 2004 a,b; Ryu et al. 2005; Hernandez et al. 2009). Otro género potencial es *Azospirillum*. La estimulación del crecimiento de raíces adventicias por *A. brasilense* no solo mejora la toma de nutrientes, sino que también, como se expuso anteriormente, alivia el estrés salino en diferentes plantas agrícolas (Creus et al. 1997; Bacilio et al. 2004; Dimkpa et al. 2009). Este modo de acción fitoestimulador proporciona una mayor área superficial para la absorción de nutrientes, una cualidad vital para la sobrevivencia de las plantas en ambientes mineros altamente impactados y con pocos nutrientes. De manera adicional, el aumento en la masa radicular es deseable para la estabilización física de los desechos mineros contra la erosión por viento y agua. Además de la promoción de crecimiento y el mejoramiento de la resistencia a estrés abiótico, propiedades de que son relevantes en su uso en desechos mineros, *Azospirillum* también ayuda a las plantas a crecer en condiciones de bajo pH (Bashan 1999, de-Bashan et al. 2005) y metales pesados (Belimov, Dietz 2000).

Varios estudios han demostrado la factibilidad de utilizar PGPB de diferentes fuentes en combinación con compost. Algunos trabajos han mostrado que los niveles óptimos de compost requeridos para el establecimiento de varias especies de pastos y plantas en residuos mineros puede ser reducido por la adición de PGPB aisladas de residuos mineros adyacentes (Petrisor et al. 2004; Zhuang et al. 2007; Gradlic et al. 2008). El reemplazar fertilizantes químicos por repetidas inoculaciones con *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium* mejoró significativamente el crecimiento de plantas nativas y la actividad microbiana en dos residuos mineros ácidos (Petrisor et al. 2004). Una serie de experimentos utilizando varios arbustos del desierto y árboles demostró la capacidad de PGPB nativas y de origen agrícola para mejorar su crecimiento en varios tipos de desechos mineros. Las PGPB aisladas de estos desechos mineros, con capacidad de sobrevivir a pH ácido y en concentraciones altas de metales pesados (Mendez et al. 2008), junto con una moderada cantidad de compost (Iverson, Maier 2009) aumentó significativamente la biomasa del arbusto *Atriplex lentiformis* y del pasto *Buchloe dactyloides*. De manera similar, como resultado de la inoculación con la PGPB *Bacillus pumilus* -aislada de raíces de cactus que crecen en rocas en ausencia de suelo (un ambiente extremo para las plantas)- el crecimiento del arbusto *Atriplex lentiformis* aumento significativamente, con un nivel de compost sub-óptimo (10% peso/peso comparado con el 15% normalmente requerido en estos residuos mineros); adicionalmente, se vio un marcado efecto en la comunidad bacteriana de desechos mineros tanto de tipo ácido con alto contenido de metales, como en residuos neutros con bajo contenido de metales (de-Bashan et al. 2010a). La inoculación con varias cepas de *Azospirillum brasilense* produjo un efecto similar en el crecimiento de las plantas y en la comunidad bacteriana en residuos ácidos metalíferos (de-Bashan et al. 2010 a,b). De manera similar, la inoculación de pasto búfalo con una mezcla de dos *Arthrobacter* spp. afectó a la comunidad bacteriana de la rizósfera después de 75 días de crecimiento (Grandlic et al. 2009). El efecto de la inoculación sobre la comunidad bacteriana

en estos desechos, que no es aparente cuando la inoculación se realiza con estas bacterias en suelos agrícolas, puede estar relacionado con el extremadamente bajo nivel de bacterias heterotróficas presentes ($<10^3$ UFC g⁻¹) (Mendez et al. 2007). En el trasfondo de una comunidad bacteriana baja, como la que existe en los residuos mineros, la inoculación con *B. pumilus* o *A. brasilense* (a un nivel de 10^6 UFC g⁻¹) crea un cambio drástico y evidente en la población bacteriana nativa. Otra explicación puede ser el que las PGPB tienen una respuesta indirecta a mas largo plazo debido a la influencia del inoculo en el crecimiento de la raíz y/o en los exudados de las plantas después de que su población inicial ha disminuido (de-Bashan et al. 2010 a,b).

Debido a que el mezquite tiene una alta tolerancia a la contaminación con metales (Senthilkumar et al. 2005), es un candidato potencial para la revegetación de desechos mineros. La inoculación con una combinación de PGPB y *A. brasilense* aumentó significativamente el crecimiento de plántulas de mezquite en desechos mineros de roca fosfórica (Moreno et al. *sin publicar*), de manera similar al efecto de los hongos micorrízicos arbusculares en este árbol. Aunque la inoculación algunas veces aumenta la absorción de metales en mezquite, esto no sucedió cuando se inocularon varios tipos de hongos micorrízicos arbusculares en mezquite creciendo en desechos ácidos con altas concentraciones de metales pesados (Solís-Domínguez et al. 2011). La nodulación y el crecimiento de árboles de *Albizia lebbek* creciendo en residuos de minas de yeso y piedra caliza aumentaron como resultado de su inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Rao, Tak 2001).

Podría haber sin embargo un lado negativo en el uso de PGPB para la fitoestabilización de desechos mineros; el aumento en la extracción de metales del suelo hacia la biomasa vegetal podría dar como resultado plantas tóxicas para los animales, tanto silvestres como ganaderos, que se alimentan de ellas. En plantas de *Brassica juncea*, la inoculación con PGPB tuvo un efecto menor en la absorción de Cu, Pb y Zn, pero un aumento significativo en la absorción de Cd en el tejido del vástago (Wu et al. 2006 a,b), y un aumento en las concentraciones de Cu, Cd, Mn y Zn en tejidos del vástago en plantas nativas (Petrisor et al. 2004). El aumento en la concentración de metales en el vástago de canola después de la inoculación puede suceder principalmente en bajas concentraciones de metales permitiendo el crecimiento de la planta (Reed, Glick 2005).

Se puede concluir que en un ambiente extremadamente estresante como el de los desechos mineros tóxicos, una PGPB inoculada, no solo puede persistir y estimular el crecimiento vegetal, sino que también puede directa o indirectamente influir en el desarrollo de la comunidad rizobacteriana. Estas PGPB pueden ser tanto nativas de los residuos mineros como inoculantes agrícolas comunes. Las PGPB como un componente en programas de fitoestabilización, junto con compost y plantas que no acumulen metales, para evitar afectar a los animales que las pastorean, son la opción más viable para

lograr la cobertura vegetal de estos desechos tóxicos. Sin embargo, es necesario encontrar la combinación óptima entre PGPB y compost o encontrar una combinación planta-PGPB que no requiera la aplicación de esta.

Uso de PGPB como ayuda en el tratamiento terciario de agua residual

En el tratamiento terciario de aguas residuales se busca eliminar principalmente el exceso de nutrientes (compuestos de nitrógeno y fósforo) resultado del tratamiento secundario -digestión de la material orgánica- antes de su descarga a cuerpos de agua naturales o de su venta para irrigación (de-Bashan, Bashan 2004, 2010). El desarrollo de tratamientos que eliminen de manera eficiente y económica estos nutrientes es de mayor importancia ya que su producción aumenta día con día. Numerosas especies de microalgas son usadas comúnmente para remover nitrógeno y fósforo de aguas residuales tanto domésticas como municipales (Tam, Wong 2000; Valderrama et al. 2002; de-Bashan, Bashan, 2004). Tradicionalmente, las PGPB no se emplean en estas tecnologías. Sin embargo, la idea de usar PGPB para el tratamiento de aguas residuales se originó de la presunción que las microalgas usadas para tales tratamientos son básicamente plantas unicelulares. Como plantas, ellas deben responder a inoculación con PGPB. El modelo básico de la asociación entre la microalga *Chlorella vulgaris* y la PGPB *Azospirillum brasilense* inmovilizadas de manera conjunta en esferas de alginato ha sido desarrollado en la última década (Gonzalez, Bashan 2000; de-Bashan, Bashan 2008). Esta combinación de los dos microorganismos es altamente eficiente en la eliminación de nutrientes de varios tipos de agua residual, dejando el agua más limpia y produciendo una biomasa utilizable (de-Bashan et al. 2002a, 2004). En esta asociación, la microalga utiliza los nutrientes asistida por la PGPB, que mejora su capacidad de absorción al afectar su metabolismo y proliferación.

A pesar de ser relativamente nueva, esta idea ha sido estudiada en años recientes de manera intensiva, investigando la efectividad del uso de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizadas de manera conjunta con *A. brasilense* bajo diversas condiciones ambientales variando desde moderadas hasta extremas (Gonzalez, Bashan 2000; de-Bashan et al. 2002 a,b; 2004; 2005, 2008c; Lebsky et al. 2001). Otros estudios han demostrado que otros géneros bacterianos incluyendo *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paenibacillus* sp. tienen el potencial de mejorar el tratamiento de aguas residuales (Mouget et al. 1995; Ogbonna et al. 2000; Hernandez et al. 2009).

Estudios iniciales han mostrado que *A. brasilense* aumenta la tasa de crecimiento y extiende la vida promedio de *C. vulgaris* (Gonzalez, Bashan 2000; Lebsky et al. 2001). La inmovilización conjunta de estas microalgas con *A. brasilense* dio como resultado la eliminación casi absoluta de amonio y cerca de un tercio del fósforo después de dos días de incubación en cultivos

en lotes, comparado con las células de *C. vulgaris* sola (de-Bashan et al. 2002a). *A. brasilense* ha mostrado efectos benéficos en parámetros de crecimiento de la microalga tales como la producción de pigmentos, contenido total de lípidos, cambio en el patrón de ácidos grasos, aumento en el número de células en la población y aumento en el tamaño celular (de-Bashan et al. 2002b).

Para mejorar el efecto sinérgico entre estos dos componentes biológicos, se han estudiado los factores ambientales que afectan el crecimiento de la microalga y los mecanismos celulares que controlan este sistema. Estos incluyen pH, concentraciones de carbono y nitrógeno, intensidad luminosa combinada con alta temperatura, toxicidad del triptofano y efectos hormonales (de-Bashan et al. 2005, 2008a, b, c, de-Bashan, Bashan 2008). Los estudios fisiológicos indicaron que los posibles mecanismos que controlan el crecimiento son la producción la fitohormona AIA y el efecto en dos enzimas clave (glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa) en el metabolismo del nitrógeno, responsables por la absorción de amonio. El someter a los microorganismos a periodos de ayuno antes del tratamiento de aguas tiene un efecto positivo en la asimilación de fósforo por parte de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* (Hernandez et al. 2006). La inmovilización conjunta mejora la absorción de fósforo en las dos especies en agua residual sintética, y en *C. sorokiniana* en agua residual domestica, después de un periodo de tres días de ayuno en solución salina. La eliminación de fósforo más efectiva, 72%, cerca del doble de la eliminación de fósforo por métodos biológicos, se alcanzó cuando un cultivo coinmovilizado de células previamente sometido a ayuno fue usado para el tratamiento por un ciclo y reemplazado con un cultivo fresco también en ayuno. Cuando se cambiaron las condiciones de cultivo de autotrófico a heterotrófico (sin luz y con una fuente adicional de carbono) el sistema coinmovilizado funcionó de mejor manera (Perez-Garcia et al. 2010).

La principal característica de esta tecnología es que la microalga inmovilizada junto a *Azospirillum* siempre elimina más fósforo que la microalga sola. Como los dos microorganismos están inmovilizados en esferas de alginato que pueden ser fácilmente removidos del agua residual por sedimentación. Esta tecnología podría potencialmente ser una alternativa económica a la precipitación química comúnmente usada para tratar el agua residual.

Conclusiones

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal pueden servir como valiosos componentes en proyectos de biorremediación de suelos, de agua, de revegetación y reforestación de suelos degradados. Por si mismas, pocas cepas pueden servir como biorremediadores directos al ser propagados en grandes poblaciones. Sin embargo, su potencial aumenta al asociarse con las plantas que son el principal componente en los procesos de remediación.

Bibliografía

- Bacilio M., Hernandez J.P., Bashan Y. 2006. Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biol Fert Soils*. 43: 112-119.
- Bacilio M., Rodriguez H., Moreno M., Hernandez J.P., Bashan Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp*-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol Fert Soils*. 40: 188-193.
- Bacilio M., Vazquez P., Bashan Y. 2003. Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. *Biol Fert Soils*. 38: 261-266.
- Banerjee M.J., Gerhart V.J., Glenn E.P. 2006. Native plant regeneration on abandoned desert farmland: effects of irrigation, soil preparation and amendments on seedling establishment. *Restor Ecol*. 14: 339-348.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol*. 22: 583-588.
- Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv*. 16: 729-770.
- Bashan Y., Holguin G. 1998. Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem*. 30: 1225-1228.
- Bashan Y., Puente M.E., Myrold D.D., Toledo G. 1998. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiol Ecol*. 26: 165-170.
- Bashan Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol Fert Soils*. 29: 246-256.
- Bashan Y., Rojas A., Puente M.E. 1999. Improved establishment and development of three cactus species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban soil. *Can J Microbiol*. 45: 441-451.
- Bashan Y., Moreno M., Troyo E. 2000a. Growth promotion of the oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* in seawater inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and *Azospirillum*. *Biol Fert Soils*. 32: 265-272.
- Bashan Y., Davis E.A., Carrillo A., Linderman R.G. 2000b. Assessment of VA mycorrhizal nodule potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mesquite nurse-trees in the Sonoran desert. *Appl Soil Ecol*. 14: 165-176.

- Bashan Y., Holguin G. 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees-Struct Funct.* 16: 159-166.
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 50: 521-577.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. 2005. Bacteria / Plant growth-promotion. En: Hillel, D. (Ed.). *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, U.K. Vol. 1. pp. 103-115.
- Bashan Y., Khaosaad T., Salazar B.G., Ocampo J.A., Wiemken A., Oehl F., Vierheilig H. 2007. Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, Mexico. *Trees-Struct Funct.* 21: 329-335.
- Bashan Y., Salazar B., Puente M.E. 2009. Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biol Fert Soils.* 45: 655-662.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Adv Agr.* 108: 77-136.
- Bashan Y., Salazar B., Moreno M., Linderman R.G. 2011. Restoration of eroded desert soil with native trees: effects of inoculation with plant growth-promoting microorganisms, limited amounts of compost and water and plant density. *Forest Sci* (Accepted).
- Bean T.M., Smith S.E., Karpiscak M.M. 2004. Intensive revegetation in Arizona's hot desert. The advantages of container stock. *Native Plants J.* 5: 173-180.
- Belimov A., Dietz K.J. 2000. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. *Microbiol Res.* 155: 113-121.
- Belimov A.A., Kunakova A.M., Safronova V.I., Stepanok V.V., Yudkin L.V., Alekseev Y.V., Kozhemyakov A.P. 2004. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. *Microbiology.* 73: 99-106.
- Belimov A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) *Soil Biol Biochem.* 37: 241-250.
- Bethlenfalvay G.J., Schüepp H. 1994. Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. En Gianinazzi S., Schüepp H. (Eds). *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 117-131.

- Bethlenfalvai G.J., Bashan Y., Carrillo-García A., Stutz J.C. 2007. Mycorrhizae as biological components of resource islands in the Sonoran desert. En: Montaña N.M., Camargo- Ricalde S.L., García-Sánchez R., Monroy-Ata A. (Eds.). Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Mundi Prensa, Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, UAM-Iztapalapa, FES-Zaragoza-UNAM, Ciudad de México, México. pp. 98-108.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3663-3668.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol.* 46: 237-245.
- Camel S.B., Reyes-Solis M.G., Ferrera-Cerrato R., Franson R.L., Brown M.S., Bethlenfalvai G.J. 1991. Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium through bulk soil. *Soil Sci Soc Am J.* 55: 389-393.
- Carrillo-García A., León de la Luz J.L., Bashan Y., Bethlenfalvai G.J. 1999. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran Desert. *Rest Ecol.* 7: 321-335.
- Carrillo-García A., Bashan Y., Díaz Rivera E., Bethlenfalvai G.J. 2000. Effects of resource island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran Desert. *Res Ecol.* 8: 65-73.
- Carrillo A.E., Li C.Y., Bashan Y. 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften.* 89: 428-432.
- Chiu K.K., Ye Z.H., Wong M.H. 2006. Growth of *Vetiveria zizanioides* and *Phragmites australis* on Pb/Zn and Cu mine tailings amended with manure compost and sewage sludge: A greenhouse study. *Bioresource Technol.* 97: 158-170.
- Creus C.M., Sueldo R.J., Barassi C.A. 1997. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiol Biochem.* 35: 939-944.
- Creus C.M., Sueldo R.J., Barassi C.A. 1998. Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Can J Bot.* 76: 238-244.
- Cunningham S.D., Betri W.R., Huang J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13: 393-397.
- de-Bashan L.E., Moreno M., Hernández J.P., Bashan Y. 2002a. Removal of ammonium and phosphorous ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res* 36: 2941-2948.

- de-Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K., Bustillos J.J. 2002b. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Can J Microbiol. 48: 514-521.
- de-Bashan L.E., Bashan Y. 2004. Recent advances in removing phosphorous from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). Water Res. 38: 4222-4246.
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Morey T., Bashan Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as «helpers» for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Research. 38: 466-474.
- de-Bashan L.E., Antoun H., Bashan Y. 2005. Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Ecol. 54: 197-203.
- de-Bashan L.E., Bashan Y. 2008. Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. Appl Environ Microbiol. 74: 6797-6802.
- de-Bashan L.E., Antoun H., Bashan Y. 2008a. Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. J Phycol. 44: 938-947.
- de-Bashan L.E., Magallon P., Antoun H., Bashan Y. 2008b. Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. J Phycol. 44: 1188-1196.
- de-Bashan L.E., Trejo A., Huss V.A.R., Hernandez J.P., Bashan Y. 2008c. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. Biores Technol. 99: 4980-4989.
- de-Bashan L.E., Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. Biores Technol. 101: 1611-1627.
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y., Maier R.M. 2010a. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. Environ and Exp Bot. 69: 343-352.
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Nelson K.N., Bashan Y., Maier R.M. 2010b. Growth of quailbush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. Microb Ecol. 60: 915-927.

- de Souza M.P., Chu D., Zhao M., Zayed A.M., Ruzin S.E., Schichnes D., Terry N. 1999a. Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol.* 119: 565-573.
- de Souza M.D., Huang C.P., Chee N., Terry N. 1999b. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta.* 209: 259-263.
- Díaz-Zorita M., Fernández-Canigia M.V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur J Soil Biol.* 45: 3-11.
- Dimkpa C., Weinand T., Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* 32: 1682-1694.
- Donnelly P.K., Hedge R.S., Fletcher J.S. 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere.* 28: 981-988.
- Enebak S.A., Wei G., Kloepper J.W. 1998. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Sci.* 44: 139-144.
- Felker P., Medina D., Soulier C., Velicce G., Velarde M., Gonzalez C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *J Arid Environ.* 61: 227-247.
- Flores-Mireles A.L., Winans S.C., Holguin G. 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7308-7321.
- Grandlic C.J., Mendez M.O., Chorover J., Machado B., Maier R.M. 2008. Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environ Sci Technol.* 42: 2079-2084.
- Grandlic C.J., Palmer M.W., Maier R.M. 2009. Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol Biochem.* 41: 1734-1740.
- Glenn E.P., Waugh W.J., Moore D., McKeon C., Nelson S.G. 2001. Revegetation of an abandoned uranium millsite on the Colorado plateau, Arizona. *J Environ Qual.* 30: 1154-1162.
- Glick B.R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv.* 21: 383-393.
- Glick B.R. 2004. Teamwork in phytoremediation. *Nat Biotechnol.* 22: 526-527.
- Gonzalez L.E., Bashan Y. 2000. Increased growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1527-1531.

- Gonzalez-Acosta B., Bashan Y., Hernandez-Saavedra N.Y., Ascencio F., De la Cruz-Agüero G. 2006. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiol Ecol.* 55: 311-321.
- Gonzalez-Chavez M.C., Carrillo-Gonzalez R., Gutierrez-Castorena M.C. 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: The role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J Hazard Mater.* 161: 1288-1298.
- Grover H.D., Musick H.B. 1990. Mexico, U.S.A.: an analysis of desertification processes in the American southwest. *Climate Change.* 17: 305–330.
- Hernandez J.P., de-Bashan L.E., Bashan Y. 2006. Starvation enhances phosphorous removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *A. brasilense*. *Enzyme Microb Technol.* 38: 190-198.
- Hernandez J.P., de-Bashan L.E., Rodriguez D.J., Rodriguez Y., Bashan Y. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *Eur J Soil Biol.* 45: 88-93.
- Hoflich G., Metz R. 1997. Interactions of plant-microorganism associations in heavy metal containing soils from sewage farms. *Bodenkultur.* 48: 239–247.
- Holguin G., Guzman M.A., Bashan Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees, isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiol Ecol.* 101: 207-216.
- Holguin G., Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) *Soil Biol Biochem.* 28: 1651-1660.
- Holguin G., Vazquez P., Bashan Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fert Soils.* 33: 265-278.
- Holguin G., Gonzalez-Zamorano P., de-Bashan L.E., Mendoza R., Amador E., Bashan Y. 2006. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development-a case study. *Sci Total Environ.* 363: 260-274.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. 2004. A multi-process system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environ Pollut.* 130: 465-476.
- Iverson S.L., Maier R.M. 2009. Effects of compost on colonization of roots of plants grown in metalliferous mine tailings, as examined by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 75: 842-847.
- Jankong P., Visoottiviset P., Khokiattiwong S. 2007. Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. *Chemosphere.* 68: 1906-1912.

- Kathiresan K., Masilamani Selvam M. 2006. Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. *Bot Mar.* 49: 86-88.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature.* 286: 885-886.
- Kloepper J.W., Reddy M.S., Rodríguez-Kabana R., Kenney D.S., Kokalis-Burelle N., Martínez-Ochoa N., Vavrina C.S. 2004a. Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae.* 631: 217-229.
- Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 2004b. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94: 1259-1266.
- Lebeau T., Braud A., Jezequel K. 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ Pollut.* 153: 497-522.
- Lebsky V.K., Gonzalez-Bashan L.E., Bashan Y. 2001. Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol.* 47: 1-8.
- Leyva L.A., Bashan, Y. 2008. Activity of two catabolic enzymes of the phosphogluconate pathway in mesquite roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Plant Physiol Biochem* 46: 898-904.
- Li W.C., Ye Z.H., Wong M.H. 2007. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *J Exp Bot.* 58: 4173-4182.
- Lopez B.R., Bashan Y., Bacilio M., De la Cruz-Agüero G. 2009. Rock-colonizing plants: abundance of the endemic cactus *Mammillaria fraileana* related to rock type in the southern Sonoran Desert. *Plant Ecol.* 201: 571-588.
- Lopez B.R., Bashan Y., Bacilio M. 2011a. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock colonizing cactus of the Southern Sonoran Desert. *Arch Microbiol* (Accepted).
- Lopez B.R., Tinoco C., Bacilio M., Bashan Y. 2011b. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *J Ecol* (Submitted).
- Lucy M., Reed E., Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J.G.* 86: 1–25.
- Lugtenberg B., Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann Rev Microbiol.* 63: 541-556.

- Macková M., Vrchotová B., Francová K., Sylvestre M., Tomaniová M., Lovecká P., Demnerová K., Macek T. 2007. Biotransformation of PCBs by plants and bacteria – consequences of plant-microbe interactions. *Eur J Soil Biol.* 43: 233-341.
- McCutcheon S.C., Schnoor J.L. 2003. *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants.* Wiley-Interscience, 1024 p.
- Mctainsh G.H. 1986. A dust monitoring programme for desertification control in West Africa. *Environ Conserv.* 13: 17–25.
- Mendez M.O., Glenn E.P., Maier R.M. 2007. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: Growth, metal accumulation, and microbial community changes. *J Environ Qual.* 36: 245-253.
- Mendez M.O., Maier R.M. 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 7: 47-59.
- Mendez M.O., Neilson J.W., Maier R.M. 2008. Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3899-3907.
- Miyakawa, A. 1999. Creative ecology: restoration of native forests by native trees. *Plant Biotechnol* 16: 15–25.
- Moore R., Russell R. 1990. The ‘Three Norths’ forest protection system–China. *Agroforestry Systems.* 10: 71–88.
- Mouget J.L., Dakhama A., Lavoie M.C., De la Noüe J. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved? *FEMS Microbiol Ecol.* 18: 35-44.
- Natarajan K.A. 1998. An integrated biotechnological approach to gold processing - An Indian experience. *Miner Process Extr M Rev.* 19: 235-251.
- Ogbonna J.C., Yoshizawa H., Tanaka H. 2000. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms, *J Appl Phycol.* 12: 277-284.
- Ortega-Rubio A., Naranjo A., Nieto A., Argüelles C., Salinas F., Aguilar R., Romero H. 1998. Suspended particles in atmosphere and respiratory health problems at La Paz city, Baja California Sur, Mexico. *J Environ Biol.* 19: 381-387.
- Perez-Garcia O., de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *J Phycol.* 46: 800-812.
- Petrisor I., Dobrota S., Komnitsas K., Lazar I., Kuperberg J.M., Serban M. 2004. Artificial inoculation – perspectives in tailings phytostabilization. *Int J Phytorem.* 6: 1-15.

- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Biol.* 56: 15-39.
- Pishchik V.N., Vorobeyv N.I., Chernyaeva I.I., Timofeeva S.V., Kozhemyakov A.P., Alexeev Y.V., Lukin S.M. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interactions under cadmium stress. *Plant and Soil.* 243: 173-186.
- Portnov B.A., Safriel U.N. 2004. Combating desertification in the Negev: dryland agriculture vs. dryland urbanization. *J Arid Environ.* 56: 659-680.
- Primavera J.H., Sadaba R.S., Lebata M.J.H.L., Altamirano J.P. 2004. Handbook of mangroves in the Philippines-Panay. Iloilo, Philippines. Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department. pp. 106.
- Puente M.E., Bashan Y. 1993. Effect of inoculation with *A. brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis.* 15: 49-60.
- Puente M.E., Holguin G., Glick B.R., Bashan Y. 1999. Root surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol Ecol.* 29: 283-292.
- Puente M.E., Li C.Y., Bashan Y. 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol.* 6: 643-650.
- Puente M.E., Bashan Y., Li C.Y., Lebsky V.K. 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6: 629-642.
- Puente M.E., Li C.Y., Bashan Y. 2009a. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ Exp Bot.* 66: 389-401.
- Puente M.E., Li C.Y., Bashan Y. 2009b. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ Exp Bot.* 66: 402-408.
- Radwan S.S., Dashti N., El-Nemr I.M. 2005. Enhancing the growth of *Vicia faba* plants by microbial inoculation to improve their potential for oily desert areas. *Int J Phytorem.* 7: 19-32.
- Rajkumar M., Freitas H. 2008a. Effects of inoculation of plant growth-promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Biores Technol.* 99: 3491-3498.
- Rajkumar M., Freitas H. 2008b. Influence of metal-resistant plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere.* 71: 834-842.
- Rao A.V., Tak R. 2001. Effect of rhizobial inoculation on *Albizia lebbeck* and its rhizosphere activity in mine spoils. *Arid Land Res Manag.* 15: 157-162.
- Reed M.L.E., Glick B.R. 2005. Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol.* 51: 1061-1069.

- Reed M.L.E., Warner B.G., Glick B.R. 2005. Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Microbiol.* 51: 425-429.
- Reichman S.M. 2007. The potential use of legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol Biochem.* 39: 2587-2593.
- Requena N., Jimenez I., Toro M., Barea J.M. 1997. Interactions between plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist.* 136: 667-677.
- Requena N., Perez-Solis E., Azcon-Aguilar C., Jefferies P., Barea J.M. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 67: 495-498.
- Rodriguez H., Gonzalez T., Goire I., Bashan Y. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften.* 91: 552-555.
- Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil.* 287: 15-21.
- Rojas A., Holguin G., Glick B.R., Bashan Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 35: 181-187.
- Rönnbäck P. 1999. The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. *Ecol Econom.* 29: 235-252.
- Roundy B.A., Heydari H., Watson C., Smith S.E., Munda B., Pater M. 2001. Summer establishment of Sonoran Desert species for revegetation of abandoned farmland using line source sprinkler irrigation. *Arid Land Res Manag J.* 15: 23-39.
- Ryu C.M., Hu C.H., Locy R.D., Kloepper J.W. 2005. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil.* 268: 285-292.
- Saravanan V.S., Madhaiyan M., Thangaraju M. 2007. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere.* 66: 1794-1798.
- Senthilkumar P., Prince W.S.P.M., Sivakumar S., Subbhuraam C.V. 2005. *Prosopis juliflora* - A green solution to decontaminate heavy metal (Cu and Cd) contaminated soils. *Chemosphere.* 60: 1493-1496.

- Sheng X.F., Xia J.J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*. 64: 1036-1042.
- Sylvia D.M., Williams S.E. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. En Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds.). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Special Publication No. 54, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp. 101-124.
- Solís-Domínguez F.A., Valentín-Vargas A., Chorover J., Maier R.M. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci Total Environ* (accepted).
- Strangmann A., Bashan Y., Giani L. 2008. Methane in pristine and impaired mangrove soils and its possible effect on establishment of mangrove seedlings. *Biol Fert Soils*. 44: 511-519.
- Suresh B., Ravishankar G.A. 2004. Phytoremediation-A Novel and Promising Approach for Environmental Clean-up. *Crit Rev Biotechnol*. 24: 97-124.
- Tam N.F.Y., Wong Y.S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environ Pollut*. 107: 145-151.
- Toledo G., Bashan Y., Soeldner, A. 1995a. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *C J Microbiol*. 41: 999-1011.
- Toledo G., Bashan Y., Soeldner, A. 1995b. In vitro colonization and increase in nitrogen fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. *Can J Microbiol*. 41: 1012-1020.
- Toledo G., Rojas A., Bashan Y. 2001. Monitoring of black mangrove restoration with nursery-reared seedlings on an arid coastal lagoon. *Hydrobiologia*. 444: 101-109.
- Tsuruta T. 2007. Removal and recovery of uranium using microorganisms isolated from North American uranium deposits. *Am J Environ Sci*. 3: 60-66.
- Valdenegro M., Barea J.M., Azcón R. 2001. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid Mediterranean area. *Plant Growth Regul*. 34: 233-240.
- Valderrama L.T., Del Campo C.M., Rodríguez C.M., de-Bashan L.E., Bashan Y. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscule*. *Water Res*. 36: 4185-4192.

- Vazquez P., Holguin G., Puente M.E., Lopez-Cortez A., Bashan Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fer Soils*. 30: 460-468.
- Velázquez-Rodríguez A.S., Flores-Román D., Acevedo-Sandoval O.A. 2001. Aggregate formation in tepetate by effect of plant species. *Agrociencia*. 35: 311-320.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Vijayalakshmi S.P., Raichur A.M. 2003. The utility of *Bacillus subtilis* as a biofloculant for fine coal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 29: 265-275.
- Vivas A., Biro B., Ruiz-Lozano J.M., Barea J.M., Azcon R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere*. 62: 1523-1533.
- Vovides A.G., Bashan Y., López-Portillo J.A., Guevara R. 2011. Nitrogen fixation in preserved, reforested, naturally regenerated and impaired mangroves as an indicator of functional restoration in mangroves in an arid region of Mexico. *Rest Ecol* (In Press).
- Wang X., Dong Z., Zhang J., Liu L. 2004. Modern dust storms in China: an overview. *J Arid Environ*. 58: 559–574.
- Whiting S.N., De Souza M.P., Terry N. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ Sci Technol*. 35: 3144-3150.
- Wright S.F., Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 198: 97-107.
- Wu S.C., Cheung K.C., Luo Y.M., Wong H.M. 2006a. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ Pollut*. 140: 124-135.
- Wu S.C., Luo Y.M., Cheung K.C., Wong M.H. 2006b. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: a laboratory study. *Environ Pollut*. 144: 765-773.
- Ye Z.H., Yang Z.Y., Chan G.Y.S., Wong M.H. 2001. Growth response of *Sesbania rostrata* and *S. cannabina* to sludge-amended lead/zinc mine tailings. A greenhouse study. *Environ Int*. 26: 449-455.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int*. 33: 406-413.

Capítulo 15

Diversidad funcional de comunidades microbianas rizosféricas en suelos expuestos a sustancias contaminantes

Functional diversity of rhizosphere microbial communities in soils exposed to contaminants

Jhovana S. Escobar Ortega, Luciana P. Di Salvo, Florencia D'Auria, Sebastian M. Gatica, Inés E. García de Salamone

Cátedra de Microbiología Agrícola - Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires.
Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires. E-mail: jhovana@agro.uba.ar

Introducción

La degradación del suelo se produce cuando se acumulan en él sustancias que alteran negativamente su funcionamiento (García, Dorrosoro 2000). La FAO define la contaminación como una forma de degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo. Por otra parte, el diccionario de la Real Academia define a la contaminación como la alteración de la pureza de alimentos, agua, aire, etc. Entonces, se puede considerar contaminante a cualquier sustancia que altera la pureza de un sistema, ya sea porque su concentración es mayor a la usual o porque la misma esta presente pero no es natural del sistema.

Existen diferentes tipos de sustancias contaminantes que llegan de distintas maneras al suelo. Entre las mismas se pueden mencionar el fenantreno, el antraceno y otras sustancias comúnmente utilizadas en la agricultura, como el glifosato. Los dos primeros son hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs- por su sigla en ingles) de bajo peso molecular formados por tres anillos bencénicos condensados (Corona, Iturbe 2005). La fuente de contaminación con PAHs se debe a los derrames o desechos de algunas actividades industriales, así también a la utilización de combustibles fósiles y a la quema de bosques (Dean et al. 2001; Corgié et al. 2004). Además, se conoce que estos PAHs, presentan un potencial cancerígeno elevado (IARC 1983), una alta toxicidad, poca solubilidad en agua ya que son liposolubles y son muy persistentes en el ambiente (Schwartz et al. 2002; Corona, Iturbe 2005). Por su parte, el glifosato (N-fosfonometilglicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6) es un herbicida total no selectivo de amplio espectro absorbido por las hojas y no por las raíces, utilizado

para eliminación de malezas indeseables y de arbustos, en especial para plantas perennes ya sea en ambientes agrícolas, forestales y/o paisajísticos (Kaczewer 2003). El glifosato ejerce su acción herbicida a través de la inhibición de una enzima, enol-piruvil-shikimato-fosfato-sintetasa (EPSPS), impidiendo así que las plantas elaboren tres aminoácidos aromáticos esenciales para su crecimiento y supervivencia. Además se conoce que puede interferir con algunas funciones enzimáticas en animales. Los distintos compuestos incluidos en la formulación del glifosato pueden ser tóxicos para la microflora edáfica. como los componentes considerados inertes, por lo tanto las características toxicológicas de los productos de mercado son diferentes a las del glifosato puro (Kaczewer 2003). Se sabe que el glifosato y sus sales presentan gran solubilidad en el agua y por ello son móviles en el suelo (Tooby 1985).

Por su parte, este herbicida es de uso más generalizado ya que se usa en la agricultura, por ello la superficie de suelos expuestos a este compuesto es mucho mayor que la superficie afectada por PAHs. Asimismo, éstos últimos poseen menor degradabilidad que el glifosato. De acuerdo a la definición planteada para un contaminante, tanto los PAHs, tales como fenantreno y antraceno, como el herbicida glifosato, pueden ser considerados contaminantes de suelos ya que ambos tipos de sustancias alteran la pureza del sistema edáfico.

La contaminación por hidrocarburos afecta las propiedades físico-químicas del suelo, tales como la estructura, retención hídrica y la saturación de bases. Las propiedades biológicas del suelo y la fertilidad del suelo también son afectadas por estos contaminantes (Pérez Vargas et al. 2002). Distintos estudios mostraron absorción de PAHs en cultivos tales como: arroz (Tao et al. 2006a; Jiao et al. 2007), repollo (Tao et al. 2006b) y maíz (Lin et al. 2007). También se observaron mermas en los rendimientos de los distintos suelos agrícolas (Leyval, Binet 1998).

En el caso del glifosato, la probabilidad de que el herbicida pueda lixiviar, alcanzando aguas subterráneas es definida por las propiedades del glifosato, del suelo y de las condiciones climáticas. Si bien muchos estudios científicos afirman que el glifosato es poco móvil en el suelo, algunos autores ponen en duda esta afirmación (Dinham 1998). La retención de este herbicida en el suelo es el principal proceso que regula su movilidad. En este sentido, se sabe que posee una alta afinidad a ser retenido por las partículas del suelo, aunque, existen antecedentes que muestran pérdidas por lixiviación a través de vías de flujo preferencial cuando las precipitaciones ocurren inmediatamente después de la pulverización sobre suelos húmedos (AEGA 2009). Cuando esta unido a otros compuestos, este herbicida no puede degradarse, y cuando se une a los minerales del suelo, queda protegido y puede volver a liberarse y dispersarse (Pessagno, dos Santos Afonso 2006). De esta manera, el glifosato puede tener toxicidad para los microorganismos presentes en el mismo en forma instantánea y diferida. Complementariamente, este herbicida puede aportar carbono, fósforo y nitrógeno en forma de residuos y así favorecería la proliferación y el rápido crecimiento de los microorganismos oportunistas en el suelo (Zabaloy et al. 2009).

En suelos sin ninguna alteración, las sustancias biodegradables son mineralizadas bajo las condiciones imperantes. Así, el principal mecanismo de disipación de los contaminantes es la degradación biológica (Dean et al. 2001) debido a la actividad de la comunidad microbiana nativa del suelo (Madigan et al. 1997). Por el contrario, en suelos alterados por el agregado de una o mas sustancias contaminantes, la biodegradación ocurre a una tasa más lenta que la normal por lo cual el suelo requiere ser biorremediado pues es un sistema en el cual la comunidad biológica ha interrumpido su normal funcionamiento (Tate 2000).

Es para destacar que la principal fuente de carbono para los microorganismos en los distintos sistemas terrestres son los restos vegetales y los exudados radicales de los mismos (Kanopka et al. 1998). En base a este ultimo, la fitorremediación esta basada en la biodegradación que ocurre en la rizosfera. Esta depende de la cantidad de carbono proveniente de estos exudados radicales y de los componentes específicos de dichos exudados (Corgié et al. 2004). En este sentido, el aumento de la actividad metabólica sería producto de la exudación de compuestos y de una mayor aerobiosis dada por la mayor porosidad causada por la presencia de raíces en el suelo (Corgié et al. 2004). También se debe aclarar que la biodegradación de los contaminantes depende de los niveles de macro y micronutrientes, necesitando por lo tanto del agregado de los mismos para así aumentar la tasa metabólica, sobre todo cuando la disponibilidad de sustratos carbonados es alta (Tate 2000; Joner et al. 2002).

Por otra parte, en la agricultura, se utiliza el glifosato para el secado de cultivos de cobertura tales como *Avena strigosa* (avena negra), *Avena byzantina* (avena amarilla), *Raphanus sativus* var. *oleiferus* y el *Lolium multiflorum* (ryegrass italiano) (FAO 1994), siendo estos utilizados para mantener el suelo cubierto, protegiéndolo de la erosión, evitando la pérdida de nutrientes por lavado y escurrimiento, y favoreciendo la incorporación de nutrientes al sistema (Reeves, Touchton 1991; Carfagno et al. 2008). De esta manera, tanto las raíces como la biomasa aérea de estos cultivos estarían también estimulando la biodegradación del contaminante (Günther et al. 1996; Di Salvo et al. 2007; Lee et al. 2008).

Para la fitorremediación algunos trabajos utilizan el ryegrass (Günther et al. 1996; Vouillamoz, Milke 2001; Corgié et al. 2003), ya que estos pastos presentan sistemas radicales densos y ramificados, los cuales hacen que presente mayor superficie de contacto con el suelo (Aprill, Sims 1990; Günther et al. 1996; Tesar et al. 2002; Krutz et al. 2005; Rivera Cruz et al. 2006). Además, el ryegrass libera gran cantidad de exudados a la rizosfera (Meharg, Killham 1995), los cuales son convenientes para el proceso de fitorremediación.

El estudio de la funcionalidad de las comunidades microbianas se puede realizar mediante el estudio de los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP, sigla de Carbon Level Physiological Profiles) (Garland, Mills 1991).

Esta es una técnica complementaria a las metodologías de aislamiento y análisis taxonómico. Este estudio posibilita la manifestación de microorganismos que no sobreviven con otras metodologías tradicionales de cultivo (Preston Mafham et al. 2002). A partir de la siembra de muestras en microplacas con las distintas fuentes carbonadas (FC) se puede obtener un patrón de desarrollo característico. La comparación de los patrones de uso de FC permite distinguir diferencias entre muestras (Garland, Mills 1991). A partir de la medición de absorbancia de cada una de las FC se puede realizar también un estudio de diversidad presente en las muestras, utilizando para esto el índice de Diversidad de Shannon Weaver (Gómez et al. 2004).

En este capítulo se describen los resultados obtenidos a partir de dos ensayos que fueron realizados con el objetivo de analizar la diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas (CMR) expuestas a dos tipos de contaminantes distintos.

Materiales y metodos

Descripción de los ensayos

Se realizaron dos ensayos, uno de ellos en condiciones de campo donde se utilizó glifosato para el secado de cultivos de cobertura (ensayo con glifosato) y el otro en condiciones controladas donde se contaminó el suelo con antraceno y fenantreno (ensayo con PAHs). El ensayo con glifosato se realizó en el Establecimiento «El Correntino», que está ubicado a 36° 8' 50.9" Latitud Sur y 62° 21' 51.9" Longitud Oeste de la localidad de Treinta de Agosto, provincia de Buenos Aires. El ensayo con PAHs se realizó en las instalaciones de la FAUBA. El suelo de ambos ensayos está clasificado como un Hapludol típico. El diseño utilizado fue en bloques completos aleatorizados (DBCA), con tres repeticiones para ambos ensayos.

En el ensayo con glifosato en la parcela principal se establecieron dos niveles de fertilización: 0 y 46 Kg N ha⁻¹ con urea (F) aplicado en el momento de la siembra de los cultivos de cobertura (CC). En las subparcelas se establecieron dos CC, centeno (*Secale cereale* var. Quehué) y avena (*Avena sativa* var. Aurora) que fueron sembradas luego de la cosecha de soja, y un testigo (barbecho invernal). En las sub-subparcelas se asignaron dos momentos de secado con glifosato, que fueron: julio y septiembre según describen Escobar Ortega, et al. (2010).

Las muestras se extrajeron con un barreno con el que se tomaron suelo y raíces (suelo rizosférico). Se realizaron tres muestreos, antes del secado con glifosato (AG), al mes del secado con glifosato (DG) y a la cosecha de soja (CS) ya sea para el primer y el segundo momento de secado. La descripción de los tratamientos se detalla en la Tabla I.

Para el ensayo con PAHs realizado en condiciones controladas se utilizaron macetas plásticas con capacidad de 250g. El suelo se homogeneizó mediante

Tabla I.

Tratamientos utilizados en el ensayo de glifosato para el primer momento de secado (Julio) y segundo momento de secado (Septiembre).

Abreviatura	Descripción
AG+Testigo+SF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo testigo sin fertilización
AG+Testigo+CF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo testigo con fertilización
AG+Avena+SF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo con avena sin fertilización
AG+Avena+CF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo con avena con fertilización
AG+Centeno+SF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo con centeno sin fertilización
AG+Centeno+CF	Muestreo Antes del secado con Glifosato del suelo con centeno con fertilización
DG+Testigo+SF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo testigo sin fertilización
DG+Testigo+CF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo testigo con fertilización
DG+Avena+SF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo con avena sin fertilización
DG+Avena+CF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo con avena con fertilización
DG+Centeno+SF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo con centeno sin fertilización
DG+Centeno+CF	Muestreo Después del secado con Glifosato del suelo con centeno con fertilización
CS+Testigo+SF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo testigo sin fertilización
CS+Testigo+CF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo testigo con fertilización
CS+Avena+SF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo con avena sin fertilización
CS+Avena+CF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo con avena con fertilización
CS+Centeno+SF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo con centeno sin fertilización
CS+Centeno+CF	Muestreo a la Cosecha de Soja del suelo con centeno con fertilización

tamizado antes de colocar en las macetas. Luego de la aplicación de los tratamientos, las macetas fueron mantenidas en condiciones estables de luz y temperatura, además de ser provistas de riego periódico para el mantenimiento de la capacidad de campo del suelo a 80% como describen Di Salvo et al. (2007). La descripción de los tratamientos se detalla en la Tabla II.

Tabla II.

Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de PAHs.

Abreviatura	Descripción
T	Suelo Testigo (sin contaminar)
T+N	Suelo Testigo con agregado de fertilizante
T+RG	Suelo Testigo sembrado con Ryegrass
T+RG+N	Suelo Testigo sembrado con Ryegrass y con agregado de Fertilizante
A	Suelo contaminado con Antraceno
A+N	Suelo contaminado con Antraceno y con agregado de fertilizante
A+RG	Suelo contaminado con Antraceno y sembrado con Ryegrass
A+RG+N	Suelo contaminado con Antraceno, sembrado con Ryegrass y con agregado de Fertilizante.
F	Suelo contaminado con Fenantreno
F+N	Suelo contaminado con Fenantreno y con agregado de Fertilizante
F+RG	Suelo contaminado con Fenantreno y sembrado con Ryegrass
F+RG+N	Suelo contaminado con Fenantreno, sembrado con Ryegrass y con agregado de Fertilizante

El suelo se contaminó con 1g de cristales de antraceno o fenantreno (Fluka, Sigma-Aldrich. Argentina) por Kg-1 de suelo húmedo, según el tratamiento correspondiente. Los suelos contaminados se homogenizaron mediante el mezclado con cuchara (Ruberto et al. 2006). Posteriormente se dejaron estabilizar durante dos meses, manteniéndose a 80% de capacidad de campo. Ambos contaminantes, presentaban valores de pureza mayores al 90%.

Para cada uno de los tratamientos con vegetación, se realizó la siembra de RG con 0,4g de semilla por maceta. En este ensayo se realizó un único muestreo a los dos meses de emergencia de las plántulas de RG. Para los tratamientos con fertilización, se aplicó una solución conteniendo 1 g L⁻¹ de fertilizante NPK (15:15:15), la cual se utilizó 3 ml dos veces por semana a partir de la emergencia de las plántulas. Las muestras fueron tomadas mediante un sacabocado considerando la profundidad total de la maceta. Además, por el tamaño pequeño de las macetas y la estructura radical en forma de cabellera del RG que ocupaba el total del volumen, se consideró que todo el suelo muestreado en aquellas macetas correspondía a suelo rizosférico (Binet et al. 2000; Chiapusio et al. 2007).

Determinación de Perfiles de uso de fuentes carbonadas

En ambos ensayos se realizó un estudio de los perfiles fisiológicos (PF) de las CMR expuestas a dos tipos de contaminantes, el glifosato y los PAHS. Con el suelo rizosférico se realizaron diluciones decimales sucesivas de cada una de las muestras. A partir de éstas se analizó la fisiología de las comunidades microbianas presentes mediante la obtención de perfiles de utilización de fuentes carbonadas según describen Naiman et al. (2009) y Escobar Ortega, et al. (2010).

Para este estudio se utilizaron microplacas preparadas con distintas fuentes carbonadas en laboratorio de Microbiología Agrícola de FAUBA según describieron García de Salamone et al. (2004), Naiman et al. (2009) y Di Salvo, García de Salamone (2012). Una vez preparadas las microplacas y sembradas con cada una de las suspensiones de las distintas muestras, se incubaron en estufa a 30°C y se realizaron lecturas de absorbancia cada 24 horas por cuatro días, según como sugieren Mills, Garland (2002) y Naiman et al. (2009).

El análisis de los perfiles de uso de FC se realizó agrupando las mismas en ocho grupos. Estos fueron: aminoácidos, tween 20, putrescina, ácido itacónico, azúcares, alcoholes, ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos. Este agrupamiento se realiza frecuentemente para aumentar el porcentaje de varianza explicada por cada uno de los componentes principales (CP) en base a los criterios de Mills y Garland (2002), Zak et al. (1994) y Preston Mafham et al. (2002).

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa Infostat® (Versión 1.1 - Universidad Nacional de Córdoba).

Resultados

Para el ensayo con glifosato el análisis de CP indica que la varianza total explicada por ambos ejes fue del 70% cuando se analiza la interacción entre el momento de secado con glifosato y nivel de fertilización nitrogenada (Figura 1). El CP1 explicó el 55% de la varianza total y el CP2 representó el 15% de la varianza total.

En la Figura 1 se muestran las medias de los CP para el primer momento de secado (julio) y el segundo momento de secado (septiembre) con glifosato. En dicho análisis se observa que para ambos momentos de secado, tanto el CP1 como el CP2, no mostraron diferencias significativas entre la fisiología de las CMR para la variable fertilización. Comparado los dos momentos de secado se observa que el CP2 mostró diferencias significativas para el perfil de uso de fuentes carbonadas. Esto nos indica que en alguna medida las CMR fueron distintas dado que los CC en Julio estaban en un estado ontogénico distinto al de septiembre. Una situación similar se observó para las CMR en distintos estadios ontogénicos del cultivo de trigo (Naiman et al. 2009).

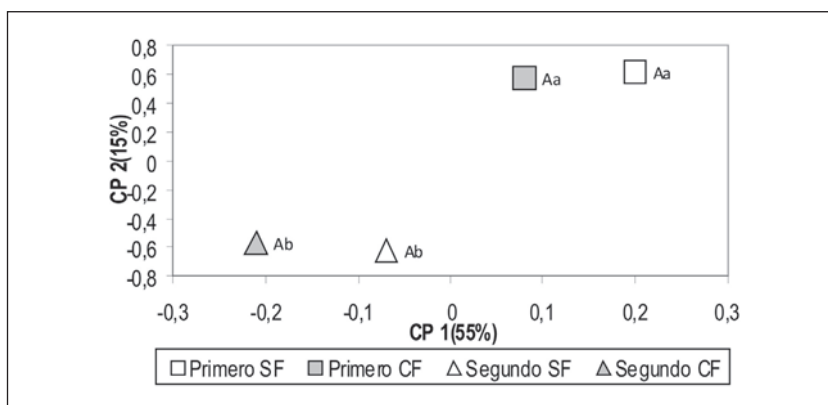


Figura 1: Análisis de componentes principales de la rizosfera para los dos momentos de secado con glifosato y los dos niveles de fertilización nitrogenada. Letras mayúsculas distintas indican diferencias para el CP1 y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el CP2, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

En cambio, la Figura 2 muestra el efecto de los tres muestreos (AG, DG y previa a la CS) en julio y septiembre. Donde el CP1 permitió observar que en el primer momento de secado con glifosato el muestreo CS presentó diferencias significativas en la fisiología de las CMR respecto a los muestreos AG y DG. En cambio, en el segundo momento de secado con glifosato los perfiles fisiológicos de las CMR de los tres muestreos difirieron significativamente entre si. Por otro lado, el CP2 permitió observar que en el primer momento de secado con glifosato las fisiologías de las CMR difirieron entre si en los tres muestreos. Sin

embargo, el segundo momento de secado con glifosato mostró que el muestreo DG difirió significativamente de las fisiologías de las CMR del muestreo AG y previa a la CS.

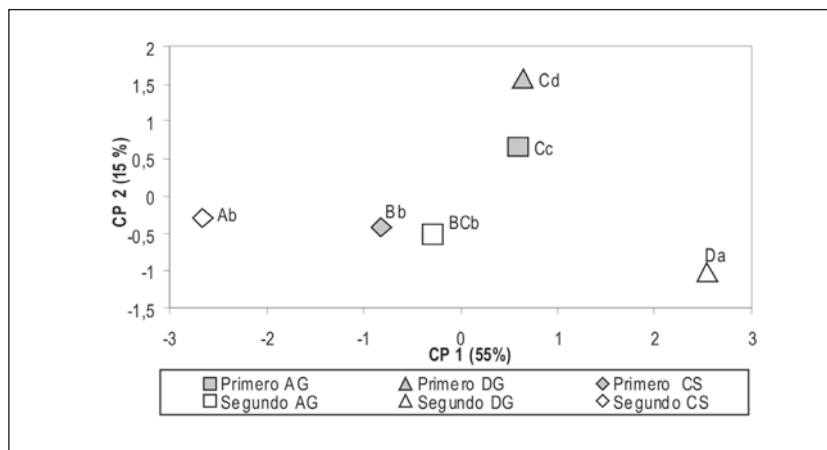


Figura 2: Análisis de componentes principales de las rizosferas para los dos momentos de secado con glifosato y los distintos muestreos. Letras mayúsculas distintas indican diferencias para el CP1 y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el CP2, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

En julio las CMR a la CS mostraron diferencias en su fisiología esto puede ser atribuido a que este muestreo se realizó sobre el cultivo de soja previa a ser cosechada, en cambio en los dos muestreos anteriores (AG y DG), estaban presentes los cultivos de cobertura de invierno (centeno, avena y testigo). En cambio en septiembre además de permanecer esa diferencia en las CMR con respecto a los muestreos AG y DG, los tres muestreos difieren entre si. Esto puede ser atribuido a que las CMR estuvieron en presencia de los CC en crecimiento hasta un estadio ontogénico más avanzado, de esta manera los exudados de las raíces que poseen una gran cantidad de compuestos son utilizados por las CMR (Kloepper, 1994). Además el secado de los CC con glifosato aportó materia orgánica seca lo cual pudo haber afectado el perfil de uso de fuentes carbonadas de las CMR o bien, es posible que el glifosato al ingresar al suelo rizoferico se una a otros compuestos que llegan a modificar la fisiología de las CMR. Respecto a esto último, hay autores como Pessagno y dos Santos Afonso (2006) que mencionan que el glifosato cuando está unido a otros compuestos no es de fácil degradación y cuando se une a los minerales del suelo, queda protegido y puede volver a liberarse y dispersarse. Puede deberse también a que el glifosato haya aportado algunos macronutrientes como carbono, fósforo y nitrógeno y así haber favorecido el crecimiento de algunas CMR, así como indican Zabaloy et al. (2009).

Cuando se analizó el Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) (Figura 3) se observó, que en ambos momentos de secado el agregado de fertilizante no tuvo efecto en las CMR. Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre ambos momentos de secado.

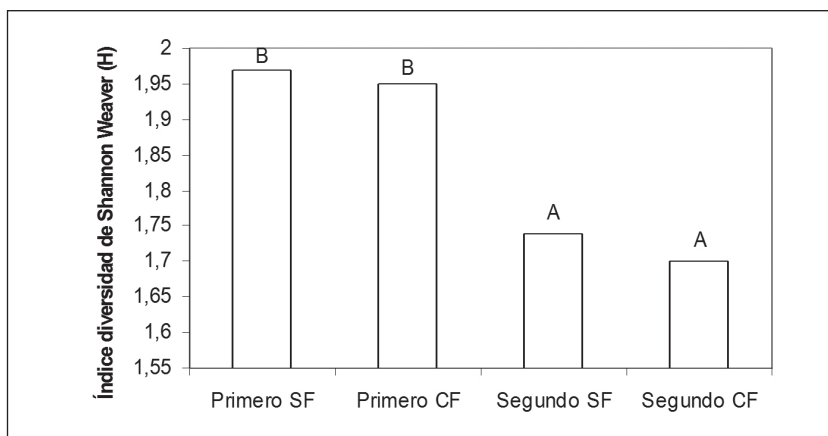


Figura 3. Índice de Shannon-Weaver (H) para los dos momentos de secado con glifosato y los dos niveles de fertilización nitrogenada. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

Como el primer momento de secado fue realizado en Julio y el segundo momento de secado en Septiembre, y entre ambos periodos los factores ambientales pueden cambiar, el índice H de las CMR pudo haber sido afectado por estas condiciones. Alvarez et al. (1995); Alvarez y Alvarez (2000) afirman que la actividad microbiana, la tasa de descomposición de la materia orgánica y la calidad del carbono en el suelo son afectadas por las condiciones ambientales, por la disponibilidad del sustrato y por los sistemas de manejo de suelo. Por lo tanto, el Índice H de las CMR puede ser diferente en distintos momentos de secado, ya que la densidad y diversidad de microorganismos según Marschner et al. (2004) puede también variar según: las condiciones ambientales, las características físico-químicas del suelo, su manejo, el tipo de especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta. Por otra parte, el no observar diferencias significativas en el índice H en cada momento de secado con respecto al agregado de fertilizante podría deberse a la utilización de CC ya que estos mantienen o mejoran la fertilidad de los suelos (Flores, 1991). Por esta razón promover la utilización de estos CC es importante ya que pueden reducir la dependencia a los fertilizantes de síntesis química, los cuáles son costosos y muchas veces poco disponibles.

Cuando se analizó el índice H en el primer momento de secado con respecto a los tres muestreos (AG, DG y CS) no se observaron diferencias significativas en las CMR. En cambio en la Figura 4 el índice H, muestra que en el segundo momento de

secado el muestreo DG mostró diferencias significativas con respecto a las comunidades de los muestreos AG y CS. El secado con glifosato de los CC mostro un efecto temporario ya que a la CS esa diferencia desaparece con respecto al muestreo AG. Esto puede atribuirse a que al secarse los CC dejan materia seca, el glifosato puede aportar carbono, nitrógeno y fosforo según Zabaloy et al. (2009) y junto a ciertas condiciones las CMR son favorecidas o desfavorecidas, tal como Reyes y Valery (2007) que encontraron una disminución de las poblaciones microbianas al alterarse las condiciones físico-químicas de los suelos estudiados.

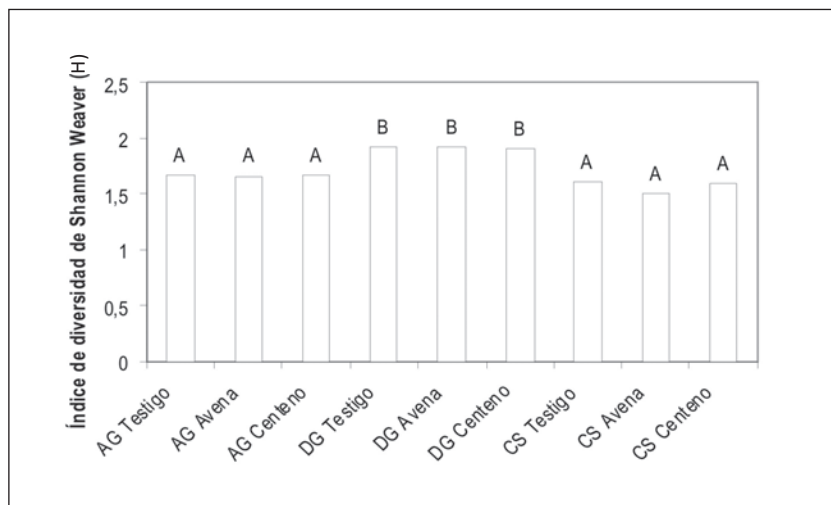


Figura 4: Índice de Shannon-Weaver (H) para el segundo momento de secado con glifosato y sus respectivos muestreos. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

La Figura 5 muestra el análisis de medias de los valores de CP entre los distintos tratamientos del ensayo en condiciones controladas (PAHs) para el contaminante Fenantreno. En ella se observa que la varianza total explicada por ambos ejes fue del 65%. El CP1 y el CP2 representaron el 48% y 17% de la varianza total, respectivamente. Se observa que el CP1 permitió diferenciar significativamente ($P < 0,05$) la fisiología de las CMR de los suelos testigo (T) de la fisiología de las CMR de los tratamientos T+RG+N, F, F+N, F+RG y F+RG+N. Además, la fisiología de las CMR de los suelos T no se diferenció de la fisiología de las CMR de los suelos T+N y T+RG. Por otro lado, el CP2 permitió diferenciar significativamente ($P < 0,05$) las fisiologías de las CMR de suelos sin contaminar, con presencia de la planta, y con y sin agregado de fertilizante (T+RG y T+RG+N) de las fisiología de las CMR de los suelos contaminados y bajo algunos tratamientos de remediación (F, F+N y F+RG). Esto indica que la presencia del contaminante genera diferencias fisiológicas en las CMR, similares aunque no idénticas a las diferencias que genera la presencia de la

planta y la planta con la fertilización en los suelos que no fueron contaminados. Además, la presencia de la planta y la fertilización en los suelos contaminados con fenantreno (F+RG+N) generó que la fisiología de sus CMR sea similar a la fisiología de las CMR de los suelos no contaminados y bajo el mismo tratamiento (T+RG+N) (Figura 5).

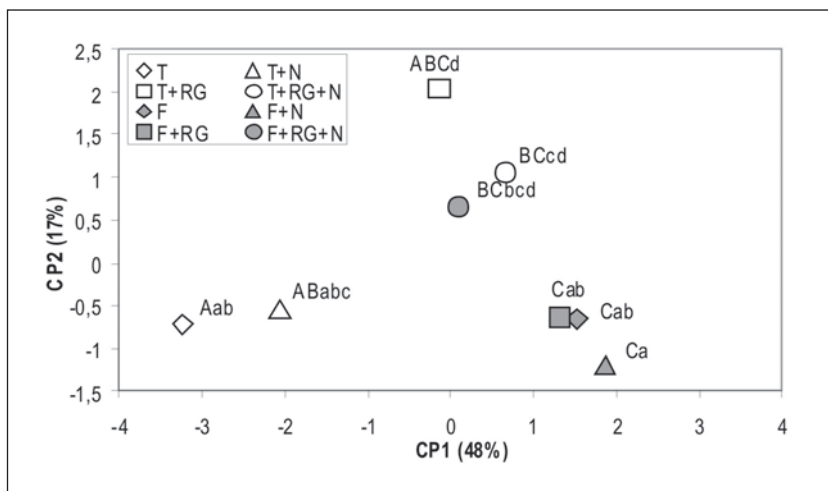


Figura 5: Análisis de componentes principales de las rizosferas para todos los tratamientos de los grupos Testigo y Fenantreno. Letras mayúsculas distintas indican diferencias para el CP1 y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el CP2, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

Cuando se analizó el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) (Figura 6), éste mostró diferencias significativas entre las CMR del suelo T en comparación a las CMR de los suelos T+RG, T+RG+N y de todos los tratamientos relacionados con el grupo F. Además de que las fisiologías de las CMR de los suelos contaminados (F, F+N, F+RG y F+RG+N) y las de los suelos testigo con presencia de planta (T+RG y T+RG+N) presentan similitudes no reflejadas en el análisis de varianza pero sí en el agrupamiento que muestran en el sector derecho del gráfico (Figura 5) dado por el CP1, los resultados presentados en la Figura 6 muestran que los valores de diversidad de las CMR de dichos tratamientos no presentan diferencias significativas.

La Figura 7 muestra el análisis de medias de los CP entre tratamientos del ensayo en condiciones controladas (PAHs) para el contaminante Antraceno. En ella se observa que la varianza total explicada por ambos ejes fue del 64%. El CP1 y el CP2 representaron el 46% y 18% de la varianza total, respectivamente. El CP1 mostró que las fisiologías de las CMR del suelo sin contaminar (T) difirió

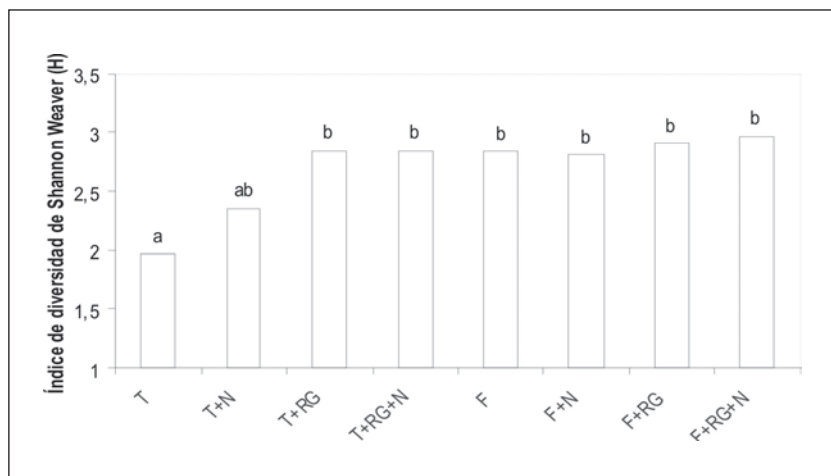


Figura 6: Índice de Shannon-Weaver (H) para los grupos Testigo y Fenantreno.
Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

significativamente ($P < 0,05$) de las fisiologías de las CMR de los suelos contaminados (A, A+N, A+RG y A+RG+N) y de los suelos sin contaminar y con presencia de planta (T+RG y T+RG+N). Por su parte, el CP2 mostró que la fisiología de las CMR del suelo contaminado y con agregado de fertilizante (A+N) difirió significativamente ($P < 0,05$) de las fisiologías de las CMR de los suelos T+RG+N y A+RG. Al igual que lo observado en el análisis de los perfiles fisiológicos de las CMR correspondientes a los tratamientos testigo y contaminados con fenantreno (Figura 5), el análisis presentado anteriormente indica que la presencia del contaminante genera diferencias fisiológicas en las CMR, similares aunque no idénticas a las diferencias que genera la presencia de la planta y la planta con la fertilización en los suelos que no fueron contaminados. Además, la presencia de la planta con y sin agregado de la fertilización en los suelos contaminados con antraceno (A+RG y A+RG+N) generó que la fisiología de sus CMR sea similar a la fisiología de las CMR de los suelos no contaminados y bajo los mismos tratamientos (T+RG y T+RG+N) (Figura 7).

Es decir en la rizosfera de la planta el aporte de C a través de la rizodeposición genera modificaciones fisiológicas de las CMR similares a las generadas por el aporte de C provisto por ambos PAHs. Un análisis estructural mediante técnicas moleculares permitiría conocer la asociación entre estructura y función de las CMR.

Cuando se analizó el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) (Figura 8), éste mostró diferencias significativas entre las CMR de los suelos T en comparación a las CMR de los suelos T+RG+N y de los tratamientos contaminados (A+N; A+RG y A+RG+N). A diferencia del análisis de H para los

tratamientos testigo y contaminados con fenantreno (Figura 6), en este análisis de H (Figura 8) las diferencias en diversidad no guardan estrecha relación con lo observado en el análisis de los patrones fisiológicos de las CMR para estos tratamientos (Figura 7).

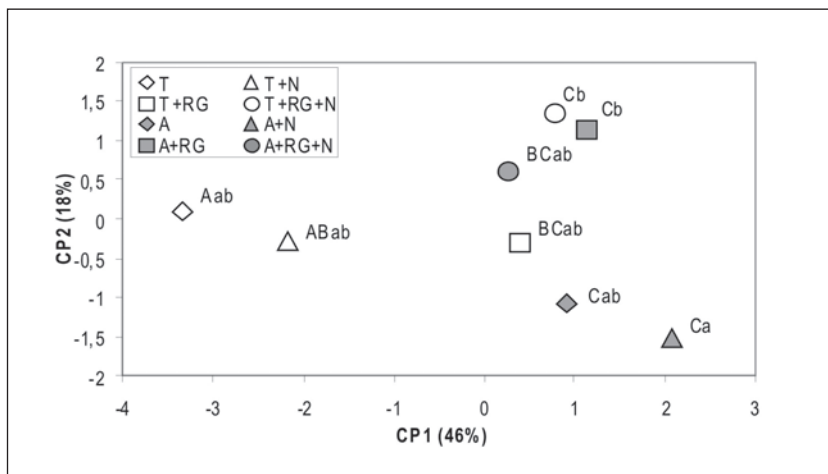


Figura 7: Análisis de componentes principales de las rizosferas para todos los tratamientos de los grupos Testigo y Antraceno. Letras mayúsculas distintas indican diferencias para el CP1 y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para el CP2, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

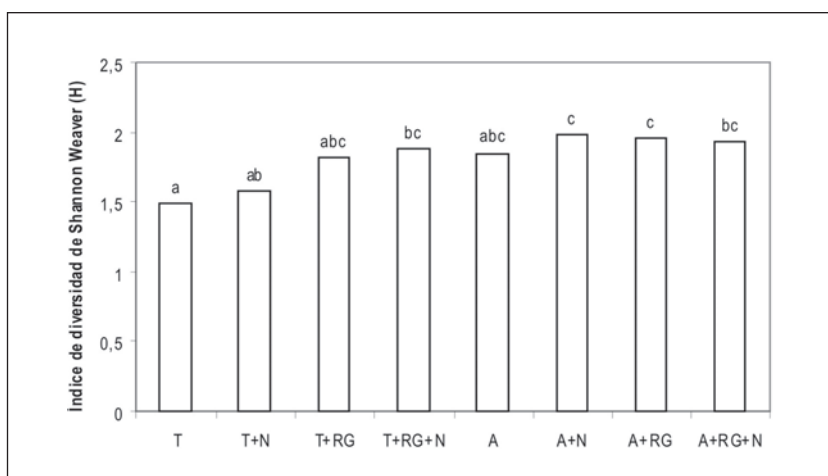


Figura 8: Índice de Shannon-Wiener (H) para los grupos Testigo y Antraceno. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ($p < 0,05$).

Síntesis y perspectivas

El presente trabajo presentó el impacto de dos sustancias diferentes sobre la diversidad funcional de las comunidades microbianas rizosféricas. De acuerdo a la definición señalada en este trabajo se consideró que ambos tipos de compuestos evaluados son contaminantes. También se tuvo en cuenta que ambas sustancias poseen diferencias no sólo en sus características moleculares, sino también en la probabilidad de ingreso al sistema suelo, y a la tasa de degradación una vez presentes en éste. A pesar de las diferencias que presentan ambos contaminantes, se encontró que ambos generan diferencias en los PF de las CMR y en la diversidad funcional de las mismas. En el caso del ensayo a campo donde se utilizó glifosato para el secado de cultivos de cobertura, las diferencias en los PF de las CMR fueron temporales. El análisis de diversidad de Shannon Weaver mostró que la aplicación del fertilizante tuvo efecto entre los dos momentos de secado. El segundo momento de secado mostró un efecto temporario en el muestreo DG. En el ensayo que se llevó a cabo en condiciones controladas utilizando el Fenantreno y Antraceno para la contaminación de suelos, se pudo determinar que la presencia del contaminante y de la planta genera diferencias en la fisiología de las CMR. Similares resultados se determinaron con los análisis del Índice de Diversidad de Shannon-Weaver.

El estudio que se realizó es un aporte que nos permite determinar la medida en que las CMR nativas de los suelos son afectados por estos dos tipos de contaminantes (fenantreno – antraceno y glifosato) y a la vez es un punto de inicio para seguir con una determinada estrategia de manejo o remediación en el caso de ser necesario.

Agradecimientos

A la empresa Sastre Inchauspe del establecimiento «El Correntino» y a los Ing. Agr. Maximiliano Eiza, Patricia Carfagno y Roberto Michelena por la colaboración brindada en la instalación y conducción a campo del ensayo de glifosato. Este contó con financiación de la FAUBA (CO 12-64). El ensayo con PAHs contó con la financiación del proyecto PICT 08-15014/FONCYT-ANPCyT.

Bibliografía

- AEGA1664 Proyecto INTA.2009. Estudio de la dinámica de los herbicidas Glifosato e Imazapir en distintos suelos de Argentina. Monitoreo de herbicidas en aguas subterráneas y superficiales. INTA.
- Aprill W., Sims R.C. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soils. Chemosphere. 20:253-263.

- Alvarez R., Diaz R.A., Barber N., Santanatoglia O.J., Blotta L. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and C-CO₂ production from three tillage systems. *Soil Till Res.* 33: 17-28.
- Alvarez C.R., Alvarez R. 2000. Short-term effects of tillage systems on active soil microbial biomass. *Biol Fert Soils.* 31: 157-161.
- Binet, P., Portal J.M., Leyval C. 2000. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol Biochem.* 32:2011–2017.
- Carfagno P.F., Eiza M.J., Quiroga A.R., Babinec F.J. 2008. Cultivos de cobertura: Efecto sobre la dinámica del agua en el suelo. XXI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. «Semiárido: Un desafío para la Ciencia del Suelo», del 13 al 16 de mayo, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. ISBN 978-987-9260-61-6. Pág. 354.
- Corgié S.C., Joner E.J., Leyval C. 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil.* 257:143-150.
- Corgié S.C., Beguiristain T., Leyval C. 2004. Spatial distribution of bacterial communities an phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl Environ Microbiol.* 70:3552-3557.
- Corona Ramirez L., Iturbe Argüelles R. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *INGENIERIA Investigación y Tecnología FI-UNAM.* Vol.VI No.2. pp. 119-126.
- Chiapusio G., Pujol S., Toussiant M.L., Badot P.M., Binet P. 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil* 294:103-112.
- Dean S.M., Jin Y., Cha D.K., Wilson S.V., Radosevich M. 2001. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J Environ Qual.* 30:1126-1133.
- Diccionario de la Real Academia Española. 2001. Diccionario de la lengua española. Vigésima segunda edición.
- Dinham B. 1998. Resistance to glyphosate. En: *Pesticides News* 41: 5. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
- Di Salvo L.P., Escobar Ortega J., Torri S., Zubillaga M., García de Salamone I.E. 2007. Influencia del Raigrás y la Fertilización sobre las Comunidades Microbianas de un Suelo Contaminado con Fenantreno. XI Congreso Argentino y Latinoamericano de Microbiología, del 10 al 12 de Octubre, Córdoba, Argentina. Vol. 39 Supl. 1. ISSN: 0325-7541.
- Di Salvo L.P., García de Salamone I.E. 2012. Evaluation of soil-microbial communities by their CLPP. Standardization of a laboratory technique to replace commercial available microplates. *Ecología Austral.* 22: 129:136.

- Escobar Ortega J.S., Auria D., Gatica F., Di Salvo S.M., García de Salamone I.E. 2010. Comunidades microbianas rizosféricas en cultivos de cobertura secados con glifosato. I Primer Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, DIMAYA y XII CAM, AAM. Del 17 al 20 de octubre. Palais Rouge, Buenos Aires.
- García de Salamone I.E., Rorig M., Bordato F., Michelena R. 2004. Actividad microbiana luego de la aplicación de compactación sobre un suelo Haplustol éntico bajo siembra directa. XVI y XII Congresos latinoamericano 116 y colombiano de la ciencia del suelo. Cartagena de Indias, Colombia. 27/9-1/10.
- García I., Simón M., Dorronsoro C., Aguilar J., Martín F., Ortiz I. 2000. Contaminación de suelos por oxidación de lodos piríticos. Edafología. Revista de la Sociedad Española de Ciencia del Suelo (SECS). Edita: Dptº de Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Volumen 7-3. ISSN 1135-6863. pp. 159-168.
- Garland J.L., Mills A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl Environ Microbiol.* 57:2351-2359.
- Gómez E., Garland J., Conti M. 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl Soil Ecol.* 26:21-30.
- Günther T., Dornberger U., Fritsche W. 1996. Effects of Ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere.* 33:203-215.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1983. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part I, chemical, environmental and experimental data. Vol 32. Lyon, France.
- FAO.1994. Organización de las naciones unidad para la agricultura y la alimentación. Departamento de Agricultura y protección del consumidor. Agricultura de la conservación.
- Jiao X.C., Xu F.L., Dawson R., Chen S.H., Tao S. 2007. Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots. *Environ Pollut* 148:230-235.
- Joner E.J., Corgié S.C., Amellal N., Leyval C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 34:859-864.
- Flores M. 1991. El uso del frijol terciopelo *Mucuna pruriens* en Honduras. Para el control de malezas y asociación con maíz. Carta No 2. pp. 4.

- Kanopka A., Oliver L., Turco R.F. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microb Ecol.* 35:103-115.
- Kaczewer J. 2003. Toxicología del Glifosato: Riesgos para la salud humana Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Krutz L.J., Beyrouthy C.A., Gentry T.J., Wolf D.C., Reynolds C.M. 2005. Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. *Biol Fert Soils.* 41:359-364.
- Kloepper J. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: *Azospirillum/ Plant Association.* Okon J. (ed.). Boca Ratón, Fl. CRC Press. pp. 137-16.
- Lee S.H., Lee W.S., Lee C.H., Kim J.G. 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J Hazard Mater.* 153:892-898.
- Leyval C., Binet P. 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *J Environ Qual.* 27:402-407.
- Lin H., Tao S., Zuo Q., Coveney R.M. 2007. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environ Pollut.* 148:614-619.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. Brock Biology of Microorganisms. Octava Edición. Prentice Hall. New Jersey. USA.
- Marschner P., Crowley D., Hong Yang C. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199-208.
- Meharg A.A., Killham K. 1995. Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant Soil.* 170:345-349.
- Naiman A.D., Latronico A.E., García de Salamone I.E. 2009. Inoculation of Wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *Eur J Soil Biol* 45:44-51.:10.1016/j.ejsobi.2008.11.001.ISSN 1164-5563.
- Mills, A.L, Garland, J.L. 2002. Application of physiological profiles to assessment of community properties. Pp 135-146. En: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, C.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. (eds.). Manual of environmental microbiology. ASM Press. Washington D.C.
- Pessagno R.C., dos Santos Afonso M. 2006. Estudio comparativo del impacto ambiental de tres herbicidas de uso común en cultivos de soja y trigo. En: Medio ambiente en Iberoamérica. Visión desde la Física y la Química en los albores del siglo XXI, Juan F. Gallardo Lancho, Ed., Tomo III, 345-352.

- Pérez Vargas J., García Esquivel G., Esparza García F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva*. 21:297-301.
- Preston Mafham J., Boddy L., Randerson P.F. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiol Ecol*. 42:1-14.
- Reeves D.W., Touchton J.T. 1991. Influence of fall tillage and cover crops on soil water and nitrogen use efficiency of corn grown on a Coastal Plain soil. 76-77. In: W.L. Hargrove (ed.) *Cover crops for clean water*. Proc. of an International Conference, April 9-11, 1991, Jackson, TN Soil and Water Conservation Society, Ankeny, IA.
- Reyes I., Valery A. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro* v.19 n.3. ISSN 1316-3361.
- Rivera Cruz M.C., Trujillo Narcía A., Ferrera Cerrato R., Rodríguez Vázquez R., Volke Haller P., Sánchez García P., Fernández Linares L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo(a)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 22:1-12.
- Ruberto L.A.M., Vazquez S.C., Curtosi A., Mestre M.C., Pelletier E., Mac Cormack W.P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Biorem J*. 10:191-201.
- Schwartz E., Trinh S.V., Scow K.M. 2002. Impact of methylene chloride on microorganisms and phenanthrene mineralization in soil. *J Environ Qual* 31:144-149
- Tate R.L. 2000. *Soil microbiology*. Wiley. 2ª Ed. New York, USA.
- Tao S., Jiao X.C., Chen S.H., Liu W.X., Coveney Jr. R.M., Zhu L.Z., Luo Y.M. 2006a. Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environ Pollut*. 140:406-415.
- Tao S., Jiao X.C., Chen S.H., Xu F.L., Li Y.J., Liu F.Z. 2006b. Uptake of vapor and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by cabbage. *Environmental Pollution* 140:13-15. Tate, R.L. 2000. *Soil Microbiol*. Wiley. 2ª Ed. New York, USA.
- Tesar M., Reichenauer T., Sessitsch A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biol Biochem*. 34: 1883-1892.
- Tooby T.E. 1985. Fate and biological consequences of glyphosate in the aquatic environment. En: Gossbard E, Atkinson D. (eds.). *The Herbicide Glyphosate*. Butterworth and Co: London, GB. 1985: 206-217.
- Vouillamoz J., Milke M.W. 2001. Effect of compost in phytoremediation of diesel-contaminated soils. *Wat Sci Technol*. 43:291-295.

- Zabaloy M.C., Garland Jay L., Gómez M.A. 2009. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. VI Congreso Argentino de Microbiología General. Editorial SAMIGE (Sociedad Argentina de Microbiología General). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp. 40.
- Zak H.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. 1994. Functional Diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol Biochem.* 26: 1101-1108.

Capítulo 16

Acumulación y tolerancia al metal pesado cadmio en rizobios de vida libre y en simbiosis con leguminosas

Accumulation and tolerance to heavy metal cadmium in free-living rhizobia and in symbiosis with legumes

Stella Castro¹, Eliana Bianucci¹, Jélica Rivadeneira¹, María del Carmen Tordable¹, Adriana Fabra², Juan Sobrino-Plata³, Luis Hernández³, Ramón Carpena-Ruiz³

¹ Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km 601. 5800-Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

² Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km 601. 5800-Río Cuarto, Córdoba, Argentina. ³ Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid, España. ³ Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid, España. E-mail: scastro@exa.unrc.edu.ar

Con este capítulo se pretende contribuir al conocimiento de los efectos que ocasiona el metal pesado cadmio (Cd) sobre los rizobios en vida libre y en simbiosis con leguminosas de interés agrícola, así como también del aporte del sistema antioxidante en la defensa contra la toxicidad de dicho metal. En particular, se enfoca a dilucidar la influencia del metal Cd sobre las cepas de *Bradyrhizobium* sp., la leguminosa maní (*Arachis hypogaea* L.) y la asociación simbiótica entre ambos.

Los metales pesados como contaminantes del suelo

Los metales pesados son aquellos elementos de transición de la tabla periódica con densidad $> 5 \text{ g cm}^{-3}$. Algunos son esenciales para la vida (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni o Mo), aunque pueden llegar a ser tóxicos para diferentes organismos vivos cuando se encuentran en altas concentraciones en el medio ambiente. Otros metales en cambio no poseen una función biológica conocida (Cd, Pb, Hg, Cr) y suelen provocar daños metabólicos a concentraciones relativamente bajas. Asimismo, metaloides como As y Se, si bien no son «pesados», participan también en muchos episodios de contaminación ambiental.

Los metales pesados están presentes naturalmente en los suelos, pero en los últimos años la polución ambiental por metales y metaloides es cada vez más intensa como consecuencia del aumento de una variedad de actividades antropogénicas: aguas residuales urbanas, aplicación de fertilizantes, uso de pesticidas, operaciones en la industria minera, etc., que están afectando progresivamente a más y diversos ecosistemas (Pinto et al. 2004). Uno de los metales pesados más perjudiciales para la naturaleza, aún a bajas concentraciones, es el Cd. Este metal presenta una elevada velocidad de adsorción y desorción en las partículas del suelo, además de una movilidad relativamente alta, que se incrementa a medida que el pH del suelo disminuye (Khalid et al. 1981). El Cd se encuentra en cantidades muy bajas en la corteza terrestre aproximadamente 0,15 mg kg⁻¹ suelo (Roberts 1996). No obstante, su contenido en los suelos agrícolas fluctúa entre 1 y 3 mg kg⁻¹ suelo, considerándose como suelo no contaminado aquel que contenga concentraciones inferiores a 1 mg kg⁻¹ (EPA- Estados Unidos 1999). En dichos suelos, las principales fuentes de Cd las constituyen el uso de fertilizantes a base de fosfatos, lodos y residuos industriales (Figura 1).

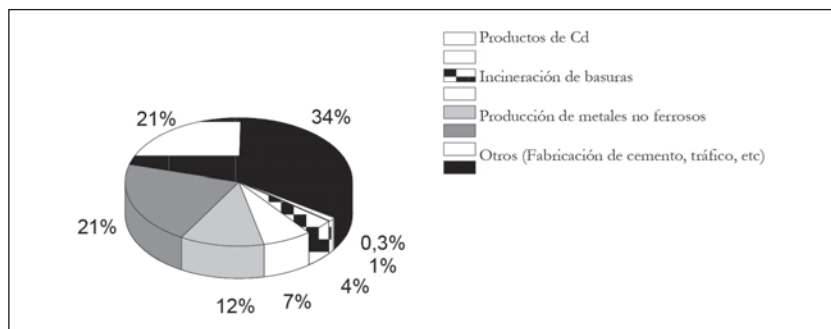


Figura 1: Contribución relativa de las diferentes fuentes de Cd al medio ambiente (Regoli 2005).

El aporte de Cd por los fertilizantes fosfatados es considerado uno de los problemas más graves de contaminación, sobre todo en aquellos países que tienen una intensa economía de exportación agrícola. La principal materia prima de los fertilizantes fosfatados, es la roca fosfórica constituida principalmente por apatita que, además de P, contiene Cd en cantidades que varían entre 8 y 500 mg kg⁻¹ (Laegreid et al. 1999). Los fertilizantes de mayor aplicación en el mundo son los superfosfatos (simple y triple) y el fosfato mono y diamónico. En Argentina, López-Camelo et al. (1997) analizaron el contenido de Cd en los fertilizantes fosfatados más utilizados en cultivos de gramíneas y leguminosas, encontrando que dicha concentración dependía del tipo de fertilizante, siendo la roca fosfórica el componente con mayor concentración

del metal. Un dato relevante es que en el suelo persiste al menos el 80% del Cd contenido como impurezas de los fertilizantes fosfatados aplicados (Kponbleku, Tabatabai 1994).

Numerosos países poseen legislaciones que regulan la aplicación de fertilizantes y su concentración de Cd, y son muy rigurosos en cuanto a su cumplimiento. Por ejemplo, en Dinamarca se ha desarrollado un modelo que explica el ciclo del Cd que cuantifica las entradas y salidas del sistema agrícola (Hovmand et al. 1983). Australia tiene programas de información a agricultores en los que se tratan diversas estrategias para la disminución de las concentraciones de Cd en el ambiente, particularmente en el recurso suelo (Mc Laughlin 2001). En Estados Unidos y Nueva Zelandia se han desarrollado numerosas investigaciones para evaluar la concentración de este elemento en los fertilizantes y el efecto de su acumulación en suelos y plantas. Los estudios realizados indican que la aplicación reiterada de fertilizantes fosfatados incrementa las cantidades de Cd en el suelo, afectando los cultivos (Bonomelli et al. 2003). En Argentina no existen reglamentaciones que estipulen concentraciones mínimas permitidas de metales pesados en los fertilizantes, lo cual constituye un grave problema a nivel ambiental y de salud humana.

Las plantas tienen una tendencia natural a asimilar metales. Sin embargo, la eficacia de su captación es dependiente de su disponibilidad, la que a su vez se relacionan con factores tales como pH, contenido de materia orgánica en el suelo, entre otros (Greger 2004). Se ha informado que la concentración de Cd en plantas de la leguminosa lupino creciendo en suelos australianos varía entre 0,01-0,08 mg kg⁻¹, con algunas muestras que exceden el máximo valor permitido de 0,05 mg kg⁻¹ (NHMRC-Australia 1987; Petterson, Harris 1995). Asimismo, para la leguminosa maní se encontró alta concentración de Cd en el tegumento y en el grano (0,67 mg kg⁻¹; Bell et al. 1997). Es importante destacar que, teniendo en cuenta que el fruto de la planta de maní es hipogeo la probabilidad de contaminación con Cd aumenta considerablemente.

La biorremediación se comenzó a utilizar en las últimas décadas para contrarrestar los efectos de los contaminantes metálicos. Este proceso ofrece la posibilidad de emplear microorganismos y plantas que posean la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados para la recuperación de suelos contaminados. Carpena et al. (2006) proponen que en suelos contaminados con metales pesados el empleo de ciertas leguminosas que se asocian simbióticamente con microorganismos fijadores de nitrógeno es recomendable por su capacidad de acumular en raíz y nódulos gran parte del elemento absorbido y, además, por ejercer un efecto beneficioso mejorando la fertilidad del suelo y manteniendo la población microbiana.

Generación de especies reactivas del oxígeno y rol del sistema antioxidante en el mecanismo de tolerancia a los metales pesados

Aunque los efectos tóxicos del Cd en sistemas biológicos han sido descritos por varios autores, el mecanismo no está completamente dilucidado. En general, la toxicidad por metales pesados se debe en parte al estrés oxidativo producido por las especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas a través de diferentes mecanismos dependiendo del metal de que se trate. Las EROs son formas parcialmente reducidas del O_2 , y resultan de la excitación del oxígeno singlete (1O_2) o de la ganancia de uno, dos y tres electrones por el oxígeno para formar radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxilo ($\cdot OH$), respectivamente. Por ejemplo, los metales de transición tales como Fe y Cu participan en el conocido ciclo de Haber-Weiss produciendo radical hidroxilo a partir de superóxido y peróxido. El Cd no experimenta cambios redox y por lo tanto, a diferencia del Fe o Cu, no actúa directamente en la generación de EROs. Sin embargo, puede actuar como pro-oxidante a través de la alteración de los sistemas de defensa antioxidante de las células.

El estrés oxidativo puede entenderse como una situación en la que se observa un aumento en la velocidad de producción de especies oxidantes o una disminución en la actividad de las defensas antioxidantes, resultando en un aumento sostenido de las concentraciones en estado estacionario de las EROs. Actualmente se interpreta la actividad antioxidante no sólo como aquella capaz de detoxificar las EROs, sino que también incluye a aquellos mecanismos que evitan la formación de estas especies y que participan en la reparación y eliminación de los productos de oxidación. Hoy se conoce que numerosos mecanismos imprescindibles para el normal funcionamiento celular, entre los que se destacan procesos de expresión génica, pueden ser regulados por radicales libres y/o antioxidantes. Asimismo, frente a situaciones de estrés oxidativo, las células protegen su funcionamiento con una detención del crecimiento, la apoptosis o la necrosis.

Los microorganismos y las plantas poseen sistemas de defensa antioxidante (enzimático y no enzimático) para mantener el estado redox y mitigar el daño causado por el estrés oxidativo. El sistema de defensa antioxidante enzimático incluye varias enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) involucrada en la detoxificación del anión superóxido, catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) que descomponen al peróxido de hidrógeno en agua. La molécula de glutatión (GSH), tripéptido formado por gGlu-Cys-Gly, es uno de los ejemplos mejores conocidos del sistema de defensa antioxidante no enzimático. Las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH también juegan un rol crucial en la defensa

antioxidante. La enzima GSH peroxidasa (GPX) cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos de lípidos, usando al GSH como donador de electrones. La enzima GSH reductasa (GR) es responsable de la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH y su actividad resulta fundamental para mantener una elevada relación GSH/GSSG, controlando el estado redox de la célula (Figura 2).

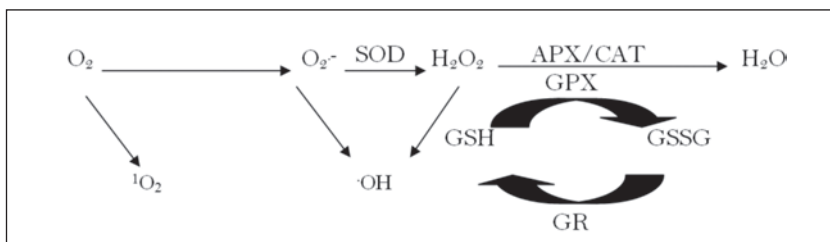


Figura 2: Ruta enzimática para la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Por otra parte, las plantas han desarrollado distintas estrategias para protegerse de la toxicidad del Cd. Estos mecanismos involucran a la raíz como primera barrera de defensa mediante la inmovilización de dicho metal por pectinas o carbohidratos extracelulares, tales como el mucílago y la calosa de la pared celular, disminuyendo así el transporte del metal al interior de la célula (Benavides et al. 2005). Otras estrategias de defensa al Cd son la reducción del transporte o el aumento del eflujo del Cd por transportadores de cationes de la membrana plasmática (Thomine et al. 2000), y el secuestro del Cd intracelular, por ácidos orgánicos, aminoácidos, fitoquelatinas (PCs) y su posterior compartimentalización en la vacuola para prevenir su toxicidad (Clemens 2006).

Las PCs son polipéptidos de composición (gGlu-Cys)_n-Gly, donde n=2-11, y constituyen uno de los principales mecanismos de defensa frente a metales pesados en plantas. Su síntesis se induce en presencia de Cd y tiene lugar a partir del GSH por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS). En la Figura 3 se muestra la síntesis de GSH que ocurre en dos etapas dependientes de ATP: 1) la cisteína y el glutamato son combinados por medio de la enzima g-glutamilcisteína sintetasa para formar g-glutamilcisteína (gEC), 2) la reacción de síntesis del GSH, catalizada por la enzima GSH sintetasa, combina la gEC con glicina para generar el tripéptido g-glutamilcisteíniglicina (GSH). Finalmente, la PCS cataliza la incorporación de una unidad de gEC procedente de una molécula de GSH (unida al sitio «donador» de la enzima) a otra molécula de GSH o PC (unida al sitio «aceptor» de la enzima) en presencia de Cd.

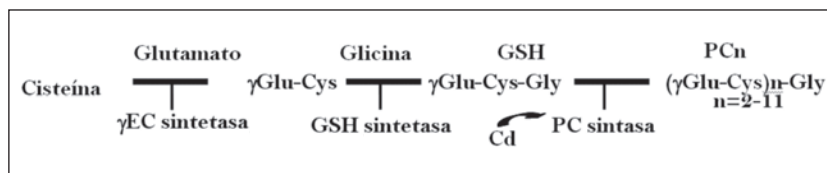


Figura 3: Síntesis de glutatión y fitoquelatinas en plantas.

Respuesta fisiológica y bioquímica de los rizobios en vida libre y en simbiosis con leguminosas al cadmio

Si bien hasta el momento el efecto del Cd en células procariotas no ha sido muy estudiado, algunos de los mecanismos descritos por los cuales los metales ejercen toxicidad en las bacterias están asociados a: a) sustitución de ligandos (el metal reemplaza a otro alterando o inactivando su función biológica) (Nieboer, Fletcher 1996), b) reducción-oxidación del metal con componentes celulares tiólicos (R-SH) en particular el GSH (Zannoni et al. 2007), c) modificación del estado oxidativo de la célula (Sandalio et al. 2001) por incremento de las especies reactivas del oxígeno (EROs) o por disminución de la capacidad antioxidante (Sies 1990) y d) alteración en el crecimiento y morfología celular (Lakzian et al. 2002; Khan, Scullion 2002).

Por su parte, el contacto de plantas con metales puede generar cambios celulares y metabólicos significativos con tan sólo pocos minutos de exposición. Uno de los síntomas característicos de toxicidad en plantas por metales pesados es la reducción de la proliferación celular (Hall 2002). En general, la presencia de Cd en plantas ocasiona: a) interferencia en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos (Singh, Tewari 2003), b) reducción de la absorción y del transporte de nitratos desde la raíz al tallo, además de inhibir la actividad nitrato reductasa en tallos (Gouia et al. 2000), c) reducción de la actividad ATPasa de la membrana plasmática (Astolfi et al. 2005), alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática (Sandalio et al. 2001), desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto, inhibiendo la síntesis de clorofila y reduciendo la actividad de enzimas implicadas en la fijación de dióxido de carbono (Maksymiec et al. 2007) y d) daños oxidativos en lípidos de las membranas (Balestrasse et al. 2004) y en proteínas por formación de grupos carbonilo (Romero-Puertas et al. 2002). Las raíces generalmente acumulan más Cd que la parte aérea actuando como una barrera que restringe el transporte a ésta última. Por otra parte, es conocido que altos niveles de Cd en el suelo afectan la persistencia de los rizobios en la rizosfera de las plantas así como la eficiencia de la nodulación (Matsuda et al. 2002).

En la simbiosis rizobio-leguminosa, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es de considerable importancia en agricultura ya que incrementa significativamente el N disponible para las plantas. Este proceso es altamente

sensible a la toxicidad por metales pesados (Porter et al. 1981; Balestrasse et al. 2001). En particular, el Cd en el suelo reduce la formación y funcionalidad del nódulo en numerosas leguminosas tales como garbanzo (Hernández et al. 1995), soja (Huang et al. 1974), alfalfa (Porter et al. 1981), poroto (Vigue et al. 1981) y lupino (Carpena et al. 2003). Hasta el momento no hay información disponible sobre el efecto que este metal pueda ocasionar sobre los rizobios nodulantes de maní, tato en vida libre como en simbiosis.

Características de los rizobios

Actualmente, se conoce que los rizobios son miembros del Phylum Proteobacteria, ubicándose la mayor parte de ellos en el orden VI Rhizobiales, de la clase I α -Proteobacterias. La mayoría de los rizobios nodulantes de maní son de crecimiento lento, pertenecen a la familia *Bradyrhizobiaceae* y han sido clasificados como *Bradyrhizobium* sp., no habiéndose aún definido las especies (Cheng et al. 2003). Sin embargo, se ha informado de la presencia de bacterias de crecimiento rápido asociados a nódulos de plantas cultivadas en el área manisera de Córdoba (Taurian et al. 2002; Ibáñez et al. 2008).

Crecimiento y acumulación de cadmio en los rizobios

A pesar de que los mecanismos de toxicidad del Cd han sido poco estudiados en rizobios, algunos de los efectos que este metal ocasiona en los microorganismos están relacionados con la alteración del crecimiento y viabilidad así como también, de moléculas involucradas en los mecanismos de defensa antioxidante. Estudios de crecimiento y viabilidad en bradyrizobios capaces de nodular plantas de maní, revelaron que la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144, recomendada como inoculante (MIRCEN), fue capaz de crecer hasta 10 μ M de Cd. Sin embargo, en la cepa mutante defectiva en GSH por disrupción del gen *gshA*, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144-S7Z, el crecimiento a esta concentración fue totalmente inhibido (Bianucci et al. 2010). Del mismo modo, cepas de *Escherichia coli* deficientes en la síntesis de GSH por mutación de los genes *gshA* y *gshB*, redujeron significativamente su crecimiento en presencia de Cd (100–273 μ M) principalmente aquellas cepas mutadas en el gen involucrado en el primer paso de biosíntesis de GSH (*gshA*). Esto revela que la capacidad de formar el dipéptido γ -EC, por parte de las mutantes *gshB*, estaría proveyendo cierta tolerancia (Cruz-Vásquez et al. 2002). Este comportamiento pone en evidencia la importancia del GSH, demostrando que las células necesitan de esta molécula para proveer tolerancia contra elementos con gran afinidad a grupos tiólicos como es el Cd. El estudio en cepas nativas aisladas de suelos de Río Cuarto, *Bradyrhizobium* sp. NLH25 y *Bradyrhizobium* sp. NOD31, mostró que si bien el crecimiento disminuía a medida que las concentraciones del metal se incrementaban, estos microorganismos pudieron crecer hasta 30 μ M de Cd (Figura 4).

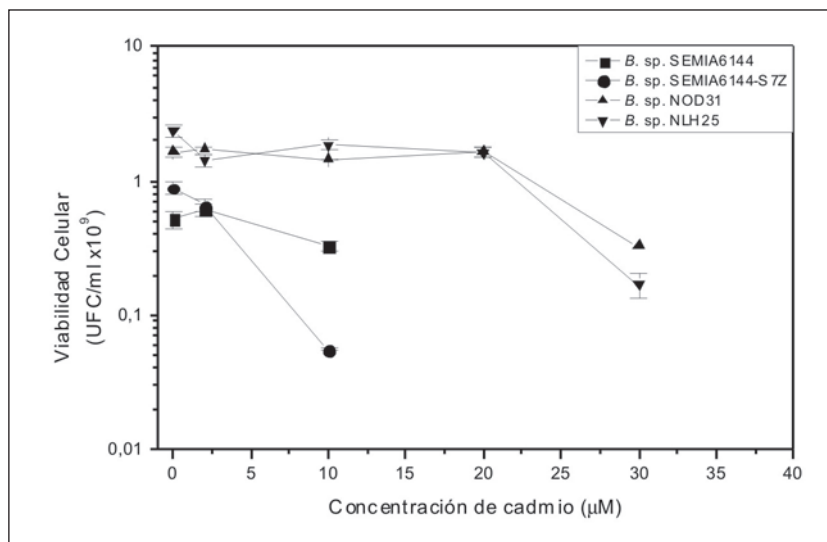


Figura 4: Viabilidad de cepas de *B. sp.* a diferentes concentraciones de Cd. Los datos son la media $\pm$ error estándar ($n=4$).

El análisis del crecimiento de las cepas de rizobios nodulantes de maní muestra que las cepas nativas podrían estar mejores adaptadas a las condiciones del ambiente alcanzando una mayor actividad metabólica y consecuentemente mayor viabilidad que la cepa recomendada como inoculante. Esta respuesta diferencial que cada cepa presenta frente al Cd revela que existen variaciones específicas de cepa que influyen en la tolerancia a este metal. Estos resultados permitieron realizar una clasificación diferencial de los rizobios. De este modo, *B. sp. SEMIA6144* y *NLH25* fueron consideradas como sensible y tolerante al Cd, respectivamente.

Además de los disturbios en el crecimiento, el Cd ocasiona importantes cambios en la morfología celular (Khan, Scullion 2002). La presencia de inclusiones o cuerpos en el citoplasma, así como también deformaciones a nivel de pared celular, son algunas de las modificaciones que presentan los microorganismos frente a un estrés ambiental. Inclusiones electro-transparentes y cuerpos electro-densos se observaron en el citoplasma de cepas de *Rhizobium loti* Lu7, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Rhizobium etli* CE3 y *Rhizobium trifolii* 0403 (Dazzo et al. 1984; Cevallos et al. 1996; Yang, Lin 1998). Estos autores explican que las inclusiones electro-transparentes se deben a la presencia de gránulos de poli- α -hidroxibutirato (PHB), mientras que los cuerpos electro-densos a la presencia de gránulos de polifosfatos, ambos polímeros de reserva intracelular. Por regla general, una especie dada sólo formará un tipo de material de reserva. Por ejemplo algunas especies del género *Clostridium* sintetizan solamente glucógeno o almidón, mientras que ciertas especies de *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* almacenan

únicamente PHB. Las cepas *B. sp.* SEMIA6144 y NLH25, en presencia de Cd, mostraron un incremento en el tamaño y número de inclusiones electro-transparentes y cuerpos electro-densos en el citoplasma, respectivamente (Bianucci et al. datos no publicados). Posiblemente, estos agregados intracelulares se deban a cambios metabólicos producidos por el metal, lo cual lleva a la célula a un estado de estrés que induciría la formación excesiva de PHB en la cepa sensible y gránulos de polifosfatos en la cepa tolerante. De la misma forma, inclusiones electro-transparentes de gran tamaño fueron observadas en cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* expuestas a Cd (Purchase et al. 1997). Por otra parte, en cepas de *Streptomyces sp.* F4 se detectó la presencia de gránulos oscuros en el citoplasma celular, manifestando que estas estructuras corresponderían a la deposición de Cd en dicha zona (Louis-Siñeriz et al. 2009).

Estrategias de tolerancia de los rizobios al cadmio

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo para explicar los mecanismos de defensa que las bacterias presentan frente a los metales pesados (Bruins et al. 2000; Nies 2003; Cervantes et al. 2006). Con respecto a la tolerancia al Cd, algunos de los mecanismos propuestos son: a) la pared celular como barrera de defensa ante la entrada de Cd, reteniendo y reduciendo el influjo del metal; b) los componentes celulares que capturan iones, neutralizando su toxicidad tales como el GSH y las enzimas relacionadas con su metabolismo y c) los transportadores de membrana que expulsan al Cd del citoplasma celular, tales como los facilitadores de difusión de cationes (CDF), las ATPasas tipo P y los transportadores de la familia RND (Resistance Nodulation Cell Division) (Silver, Phung 2005).

Los estudios sobre la acumulación de Cd en rizobios no han aportado demasiada información acerca de las estrategias de defensa que utilizan para evitar su toxicidad. En cambio, el análisis de la distribución de Cd resulta importante para conocer en qué fracción celular el metal se está acomplejando. En rizobios capaces de nodular trébol (*R. leguminosarum* biovar *trifolii*) y maní (*B. sp.* SEMIA 6144 y NLH25), el análisis de la distribución mostró que la mayor concentración del metal queda retenido en la pared celular y sólo una mínima fracción se encuentra intracelularmente (Purchase et al. 1997; Bianucci et al. 2007). Es conocido que aquellos microorganismos que no acumulan metales en el interior celular podrían utilizar mecanismos de detoxificación basados en bombas de eflujo e influjo, o bien moléculas extracelulares que secuestren al metal, tales como los polisacáridos extracelulares (Cervantes, Gutierrez-Corona 1994; Bruins et al. 2000). Algunos de los exportadores más conocidos en bacterias Gram negativas involucrados en la expulsión de Cd al medio extracelular, son los pertenecientes a la familia de proteínas RND tales como Czc y Ncc, que transportan Zn y Ni, respectivamente (Nies 2003). De esta manera, se evita que estos metales

interactúen con componentes celulares vitales. Además, se proponen mecanismos de detoxificación del Cd basados en la precipitación del metal (Blake et al. 1993) o en la formación de complejos quelantes con grupos -SH que involucra a la molécula de GSH (Nies 1992).

El GSH está presente en todas las fases de crecimiento de los microorganismos, aunque su concentración se incrementa en fase estacionaria (Fahey et al. 1978). En simbioses de maní se observó que su contenido está relacionado con la tolerancia de las cepas al Cd ya que la cepa *B. sp. SEMIA6144* (sensible) no modificó el contenido endógeno de GSH en presencia de Cd mientras que las cepas tolerantes, *B. sp. NOD31* y *NLH25*, expuestas 30 μ M Cd lo incrementaron de manera significativa (Bianucci et al. 2010). El GSH protege al citoplasma secuestrando a los iones Cd, impidiendo que éstos interactúen principalmente con proteínas que cuenten con residuos tiólicos, alterando así su funcionalidad (Helbig et al. 2008). La defensa enzimática antioxidante juega también un rol fundamental disminuyendo los niveles de EROs generadas por la ruptura del balance redox ante la presencia de Cd. Los estudios realizados en rizobios son contradictorios respecto a la actividad que cada enzima presenta frente a este metal. En cepas sensibles y tolerantes de *R. leguminosarum* biovar *viciae* las actividades de las enzimas SOD y CAT incrementaron frente al agregado de Cd (Corticeiro et al. 2006). En *Bradyrhizobium* sp., sólo la cepa tolerante incrementó significativamente la actividad SOD, mientras que la actividad CAT resultó drásticamente inhibida en los dos simbioses de maní analizados (*B. sp. SEMIA6144* y *NLH25*) (Bianucci et al. datos no publicados). *B. sp. NLH25* mostró también un incremento de las actividades de las enzimas GPX y GR en presencia de Cd. Ello permitiría mantener una elevada relación GSH/GSSG intracelular, siendo ésta una de las posibles causas de la tolerancia al metal. Es evidente que un solo tipo de mecanismo de defensa no es suficiente para proveer tolerancia o bien detoxificar un metal pesado tan perjudicial como lo es el Cd. Es por eso que la combinación de distintas estrategias de defensa (intra/extracelular) resultarían indispensables para la resistencia a elementos que presentan una alta afinidad a compuestos tiólicos como el GSH.

En simbioses de maní, la tolerancia observada en las cepas nativas permite suponer que estarían mejor adaptadas a crecer a altas concentraciones de Cd alcanzando una mayor actividad metabólica y consecuentemente mayor viabilidad. Además, el incremento en el contenido de GSH endógeno, de estas cepas, en presencia de Cd sugiere que las células poseen la capacidad de inducir la síntesis de este tiol. Este incremento podría ser un indicador de estrés oxidativo y es posible inferir que el GSH juega un rol fundamental en la tolerancia al Cd.

Influencia del cadmio sobre el crecimiento de plantas de maní

El maní es de alto valor agronómico y en Argentina el 92% de su producción se obtiene en la zona central de la provincia de Córdoba donde se concentra el

cultivo, comercialización, selección del maní de confitería e industrialización. En los últimos años, el uso de prácticas agrícolas no sustentables, la aplicación desmesurada de fertilizantes y enmiendas, ha provocado la disminución de la fertilidad del suelo y la inestabilidad en los rendimientos de los cultivos. En el área manisera la presencia de metales pesados como el Cd puede atribuirse a la fertilización fosfatada, al uso de lodos y residuos industriales. La absorción por las plantas de este elemento depende de diversos factores tales como el tipo de suelo, el pH y el genotipo de maní. Inga et al. (2003) analizaron los niveles de Cd en granos de maní provenientes de la región manisera de Córdoba, los cuales presentaron valores inferiores a lo establecido por las regulaciones internacionales de Australia y Nueva Zelanda ($0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$). Considerando que los niveles de Cd en maní están relacionados con los niveles de este elemento en el suelo, el agregado de compuestos o suplementos minerales podría generar una acumulación de Cd que, a largo plazo, provocaría el deterioro de este recurso natural y en consecuencia de la calidad de maní en la región.

En plantas, el GSH está involucrado en el control de las EROs en forma directa e indirecta (Foyer, Noctor 2009). La participación de este tiol en respuesta a la toxicidad por metales pesados ha sido muy estudiada encontrándose que generalmente disminuye en presencia de Cd (Li et al. 1997). Algunos autores asocian dicha disminución con el aumento de las PCs ya que el GSH es una de las moléculas involucradas en su biosíntesis (Noctor, Foyer 1998; Xiang, Olivier 1998). En alfalfa se demostró que el agregado del metal induce la síntesis de PCs (Ortega-Villasante et al. 2005; Sobrino-Plata et al. 2009) las que juegan un importante rol en la detoxificación de metales (Cobbett, Goldsbrough 2002).

Resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo indican que hojas y raíces de plantas de maní expuestas a $10 \mu\text{M}$ de Cd en un medio semi-hidropónico (perlita), no presentaron peroxidación lipídica ni oxidación de proteínas. Sin embargo, las raíces fueron capaces de incrementar la síntesis de diferentes tipos de PCs (PC2, PC3 y PC4). Es posible asumir que la producción de PCs evitó el daño del metal sobre los componentes celulares como lípidos y proteínas. Por lo tanto, las PCs cumplirían un rol importante en el mecanismo de defensa de la planta secuestrando el Cd intracelular y limitando el daño oxidativo a macromoléculas (Bianucci et al. datos no publicados). Estos resultados permiten suponer que frente a condiciones de estrés por Cd, las plantas desarrollan un complejo mecanismo de defensa antioxidante que le permite su adaptación. Sin embargo, cuando la toxicidad es alta, dichos sistemas son incapaces de actuar y las plantas manifiestan síntomas morfológicos y bioquímicos de daño celular.

Impacto del cadmio en la asociación simbiótica rizobio-maní

En la asociación simbiótica *Bradyrhizobium* sp.-maní, la adición de $10 \mu\text{M}$ de Cd al medio de cultivo disminuyó significativamente el número y peso seco de nódulos en las plantas inoculadas con la cepa sensible (*B.* sp.

SEMIA6144) ó con la cepa tolerante (*B. sp.* NLH25). Además, se encontró un aumento de la producción de superóxido y peróxido en nódulos. Por otra parte, si bien el tamaño de los nódulos no se encontró afectado por el agregado de Cd, se observó una disminución significativa en las zonas infectadas de nódulos inoculados con ambas cepas. Además, los nódulos en presencia de Cd presentan cambios en su estructura anatómica e histológica destacándose el depósito de material de aspecto amorfo en la superficie de la corteza. De igual forma, en plantas de soja expuestas a Cd se observaron cambios en la ultraestructura de los nódulos con una disminución en el tamaño en la zona activa de fijación de N, así como también una reducción en el número de células infectadas (Chen et al. 2002). Asimismo, nódulos de lupino expuestos a Cd mostraron degeneración de células infectadas y oclusión de espacios intercelulares de la corteza (Carpena et al. 2003). Si bien las EROs juegan un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis (Puppo et al. 2005) y existen estudios que demuestran su aumento durante el metabolismo normal en los nódulos (Matamoros et al. 2003) poco se conoce acerca de su producción como consecuencia del estrés causado por el Cd.

En cuanto a la acumulación del metal, las raíces de maní sin inocular mostraron menor concentración en comparación a las raíces de plantas inoculadas. Los nódulos de raíces inoculadas con la cepa sensible presentaron mayor acumulación de Cd en relación a la cepa tolerante. El hecho de que las raíces y los nódulos incorporen Cd estaría indicando que existe una alta retención por parte de estos órganos, que podría deberse a la elevada tasa de transporte entre el esporofito y el procariota: importación de fotosintatos para mantener la alta actividad metabólica del nódulo y la exportación de productos asimilados de N hacia la planta. En los nódulos de plantas de lupino se han detectado algunos mecanismos de tolerancia frente a la toxicidad de Cd como la retención del metal en la pared celular y elevados niveles de compuestos tiólicos (Carpena et al. 2003).

Conclusiones

El incremento de la concentración de metales en los suelos hasta niveles tóxicos, por las actividades antropogénicas, constituye actualmente un importante problema ambiental. En este contexto, las plantas y los microorganismos pueden ser útiles para desarrollar bioensayos con el objeto de promover nuevos estándares para la monitorización de situaciones de riesgo ambiental. Es por ello, que el conocimiento de la acumulación y tolerancia al Cd por los rizobios en vida libre y en simbiosis con plantas de leguminosas pueden contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos en condiciones de campo bajo situaciones de exceso de metal, a la vez que a limitar el paso del metal a la cadena trófica. Particularmente, en la asociación simbiótica *Bradyrhizobium sp.*-maní, el rol del sistema antioxidante (glutatión y fitoquelatinas) parece ser crucial en la estrategia de tolerancia al metal.

Bibliografía

- Astolfi S., Zuchi S., Passera C. 2005. Effect of cadmium on H⁽⁺⁾ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Sci.* 169:361-368.
- Balestrasse K.B., Gallego S.M., Tomaro M.L. 2004. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil.* 262:373-381.
- Balestrasse K.B., Gardey L., Gallego S.M., Tomaro M.L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Plant Physiol.* 28:497-504.
- Bell M.J., McLaughlin M.J., Wright G.C., Cruickshank A. 1997. Inter and intra-specific variation in accumulation of cadmium by peanut, soybean and navybean. *Aust J Agr Res.* 48: 1151-1160.
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M. 2005. Cadmium toxicity in plants, *Braz J Plant Physiol.* 17:21-34.
- Bianucci E., Fabra A., Castro S. 2010. Cadmium accumulation and tolerance in *Bradyrhizobium* spp. (peanut microsymbionts). *Curr Microbiol on line*: DOI:10.1007/s00284-010-9675-5.
- Bianucci E., Fabra A., Castro S. 2007. Importance of glutathione in growth of peanut rhizobia under cadmium exposure. *Biocell.* 31:52.
- Blake R.C., Choate D.M., Bardhan S., Revis N., Barton L.L., Zocco T.G. 1993. Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environ Toxicol Chem.* 12: 1365-1376.
- Bonomelli C., Bonilla C., Valenzuela A. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesqui Agropecu Bras.* 38: 1179-1186.
- Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Safe.* 45: 198–207.
- Carpena R., Esteban E., Lucena J.J., Peñalosa S., Vázquez P., Zornoza P., Gárate A. 2006. Simbiosis y fitorecuperación de suelos. En EJ Bedmar, J. González, C. Lluch, M.B. Rodelas, Eds., *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada. pp. 255-268.
- Carpena R., Esteban E., Vázquez S., Zornoza P., Fernández-Pascual M., Rosario de Felipe M. 2003. Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiol Biochem.* 41: 911-919.
- Cervantes C., Espino-Saldaña A.E., Acevedo-Aguilar F., León-Rodríguez I.L., Rivera-Cano M.E., Avila-Rodríguez M., Wróbel-Kaczmarczyk K., Wróbel-Zasada K., Gutiérrez-Corona J.F., Rodríguez-Zavala J.S., Moreno-Sánchez

- R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev Lat Microbiol.* 48 2:203-210.
- Cervantes C., Gutierrez-Corona F. 1994. Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 14:121-137.
- Cevallos M.A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *Bacteriol.* 178:1646-1654.
- Chen Y.X., He Y.F., Yang Y.L., Yu Y.L., Zheng S.J., Tian G.M., Luo Y.M., Wong M.H. 2002. Effect of Cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere.* 50:781-787.
- Cheng Q., Zhang X., Terefework Z., Kaijalainen S., Li D., Lindstrom K. 2003. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogea* L.) *Bradyrhizobium* and their host plants. *Plant Soil.* 255:605-617.
- Clemens S. 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol.* 163:319-332.
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Physiol.* 53:159-182.
- Corticeiro S.C., Lima A.I., Figueira E.M. 2006. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. *Enzyme and Microb Technol.* 40: 132-137.
- Cruz-Vásquez B.H., Díaz-Cruz J.M., Ariño C., Esteban M., Tauler R. 2002. Study of Cd²⁺ complexation by the glutathione fragments Cys-Gly (CG) and α -Glu-Cys (α -EC) by differential pulse polarography. *Analyst.* 127:401-406.
- Dazzo F.B., Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M., Abe M., Pankratz S.H. 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *App Environ Microbiol.* 48:1140-1150.
- Environmental Protection Agency (EPA) - UNITED STATES. 1999b. Biosolids Generation, Use, and Disposal in The United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division Office of Solid Waste. EPA 530-R-99-009. pp. 74.
- Fahey R.C., Brown W.C., Adams W.B., Worshe M.B. 1978. The occurrence of glutathione in bacteria. *J Bacteriol.* 133:1126-1129.
- Foyer C.H., Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxid Redox Sign.* 11:1-45.
- Gouia H., Ghorbal M.H., Meyer C. 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiol Biochem.* 38:629-638.
- Greger M. 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Heavy metal stress in plants. From biomolecules to ecosystems. MNV Prasad (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-28.

- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 53:1–11.
- Helbig K., Bleuel C., Krauss G.J., Nies D.H. 2008. Glutathione and Transition-Metal Homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190: 5431-5438.
- Hernández L.E., Gárate A., Carpena-Ruiz R.O. 1995. Effect of cadmium on nitrogen fixing pea plants grown in perlite and vermiculite. *Plant Nutrition Soil.* 18: 287-303.
- Hovmand M., Tjell J., Mosback H. 1983. Plant uptake of airborne cadmium. *Environ Pollut.* 30: 27-38.
- Huang F.A., Vanderhoef L.N. 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiol.* 54:122-126.
- Ibañez F., Taurian T., Angelini J., Tonelli M.L., Fabra A. 2008. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *R. tropici* isolated from peanut nodules in central Argentina. *Soil Biol Biochem.* 40:537-539.
- Inga C., Cabrera J., Spahn J., Lutti G., Badini R., Aguilar R., Martínez M., Casini C. 2003. Valores bajos de Cd en el maní de la provincia de Córdoba. XVIII Jornada Nacional de Maní. pp 60.
- Khalid A.M., El-Tawil A.H., Ashy M., Elbeih F.K. 1981. Constituents of local plants. Part8: Distribution of some coumarins in plants of different plant families grown in Saudi Arabia, *Pharmazie.* 36: 569-571.
- Khan M., Scullion J. 2002. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *App Soil Ecol.* 20: 145-155.
- Kponblekou A., Tabatabai M. 1994. Metal contents of phosphate rocks. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 26: 2781-2882.
- Laegrid M., Bockman O.C., Kaarstad O. 1999. Agriculture, Fertilizer y the Environment. Wallingford: CAB, 1999. pp. 294.
- Lakzian A., Murphy P., Turner A., Beynon J.L., Giller K.E. 2002. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol Soil Biochem.* 34:519-529.
- Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczycka M., Thiele D.J., Rea P.A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 42-47.
- López-Camelo L.G., de Miguez S.R., Marbán L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Sci Tot Environ.* 204: 245:250.

- Louis-Siñeriz M., Kothe K., Abate C.M. 2009. Cadmium biosorption by *Streptomyces* sp. F4 isolated from former uranium mine. *J Basic Microbiol.* 49:55-62.
- Maksymiec W., Wojcik M., Krupa Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere.* 66:421-427.
- Matsuda A., Souza Moreira F., Siqueira J. 2002. Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium. *Pesqui Agropecu Bras.* 37:343-355.
- Matamoros M., Dalton D., Ramos J., Clemente M., Rubio M., Becana M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legumes symbiosis. *Plant Physiol.* 33:499-509.
- McLaughlin M.J. 2001. Cadmium clean up for Australian agriculture. M2 Presswire CSIRO July 2001.
- National Health and Medical Research Council (NHMRC) 1987. 'NHMRC Food Standards Code.' (Australian Government Publishing Service: Canberra.)
- Nieboer E., Fletcher G.G. 1996. Toxicology of Metals: Determinants of reactivity in metal toxicology (Chang LW, Magos L, Suzuki T, Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 113-132.
- Nies D.H. 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid.* 27: 17-28.
- Nies D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 27:313-339.
- Noctor G., Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. *Ann Rev Plant Physiol.* 49:249-279.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot.* 53:1283-1304.
- Ortega-Villasante C., Rellán-Álvarez R., Del Campo F.F., Carpena-Ruiz R.O., Hernández L.E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot.* 56:2239-2251.
- Petterson D.S., Harris D.J. 1995. Cadmium and lead content of lupin seed grown in Western Australia. *Aust J Exp Agr.* 35: 403-407.
- Pinto A.P., Mota A.M., de Varennes A., Pinto F.C. 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci Total Environ.* 326: 239-247.

- Porter J.R., Sheridan R.P. 1981. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and simulated acid rain. *Plant Physiol.* 68:143-148.
- Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., de Felipe M., Harrison J., Vanacker H., Foyer C.H. 2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Physiol.* 165: 683-701.
- Purchase D., Miles R.J., Young T.M. 1997. Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *FEMS Microbiol Ecol.* 22:85-93.
- Regoli L. LR/UNECE-LRTP Heavy Metals 2005. (Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa-Contaminación Transfronteriza del Aire de Larga Distancia por metales pesados). Disponible en: www.chem.unep.ch
- Roberts M. 1996. EU eyes cadmium in phosphate fertilizers. New York, United States. *Chem Week.* 158 (23):13.
- Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gómez M., del Río L.A., Sandalio L.M. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ.* 25:677-686.
- Sandalio L.M., Dalurzo H.C., Gomez M., Romero-Puertas M.C., del Río L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot.* 52:2115-2126.
- Sies H. 1990. Glutathione and its role in cellular functions, *Rad Biol Med.* 27:916-21.
- Silver S., Phung L.T. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32:587-605.
- Singh P.K., Tewari R.K. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. *Plants. J Env Biol.* 24:107-112.
- Sobrinho-Plata J., Ortega-Villasante C., Flores-Cáceres M.L., Escobar C., Del Campo F.F., Hernández L.E. 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere.* 77:946-54.
- Somasegaran P., Hoben H. 1994. Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer-Verlag. New York. Inc. Sección III.
- Taurian T., Aguilar O.M., Fabra A. 2002. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis.* 33:59-72.

- Thomine S., Wang R., Ward J., Crawford N., Schroeder J. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceed Natl Acad Sci USA*. 97:4991-4996.
- Uheda E., Daimon H., Yoshizako F. 2001. Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by *gusA*-marked *Bradyrhizobium* sp. *Can J Bot*. 79: 733-738.
- Vigue G.T., Pepper I.L., Bezdicek D.F. 1981. Effect of cadmium on nodulation and nitrogen fixation by dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environ Qual*. 10:87-90.
- Werner D. 1992. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63:968-989.
- Xiang C., Oliver D.J. 1998 Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1539-1550.
- Yang F., Lin L. 1998. Cytostructure, lipopolysaccharides, and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. *Bot Bull Acad Sinica*. 39:261-267.
- Zannon D., Borsetti F., Harrison J.J., Turner R.J. 2007. The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te. *Adv Microb Physiol*. 53:1-71.

Capítulo 17

Micorrizorremediación como alternativa para la recuperación de suelos contaminados por actividades mineras

Myco-rhizoremediation as alternative for recovering soils polluted by mining activities

Pablo Cornejo, Sebastián Meier, César Arriagada, Fernando Borie

¹Scientific and Technological Bioresource Nucleus, BIOREN-UFRO. Universidad de La Frontera. Avda. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile. E-mail: pcornejo@ufro.cl.

Introducción

Uno de los principales problemas a nivel mundial es la degradación de los recursos naturales, en particular la originada por actividades industriales, en las cuales se genera un elevado volumen de desechos contaminantes. Algunos de estos desechos resultan muy difíciles de manejar, confinándolos o mitigando su efecto deletéreo sobre el medio ambiente, como sucede con los metales pesados (MP). En general, se denominan así a los elementos cuya densidad específica es mayor a 5 g cm^{-3} , y destacan entre otros mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl) y plomo (Pb), además de otros elementos traza con actividad biológica como lo son el cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) (Adriano 2001). No obstante, la principal característica de estos elementos es su potencial toxicidad sobre los diversos organismos vivos, y su alta persistencia, debido a que no son biodegradables (Reimann et al. 2001). Estos MP se encuentran presentes en altas concentraciones en los residuos mineros, desde donde pueden ser transferidos a ecosistemas naturales, agrícolas y a la cadena trófica, alterando el funcionamiento de los diversos organismos, lo cual conlleva una disminución en la actividad biológica de los microorganismos del suelo, y una pérdida de diversidad y cobertura de las plantas que conforman la cubierta vegetal (Giller et al. 1998).

La pérdida de la actividad biológica y la biodiversidad repercuten negativamente, generando un descenso en la actividad de las distintas especies asociadas, lo que finalmente desencadena un círculo de efectos negativos que disminuye la sostenibilidad de los ecosistemas (Kennedy, Smith 1995). En particular, en los ecosistemas terrestres, el efecto primario de niveles tóxicos de MP condicionaría una degradación de la cubierta

vegetal y la microbiota edáfica, repercutiendo en segunda instancia en una pérdida de la calidad físico-química del suelo, retroalimentando así los efectos negativos sobre la biota remanente en el ecosistema (Cornejo et al. 2008a). Las interacciones entre los principales procesos de degradación en suelos sometidos a la descarga de metales pesados se muestran en la Figura 1.

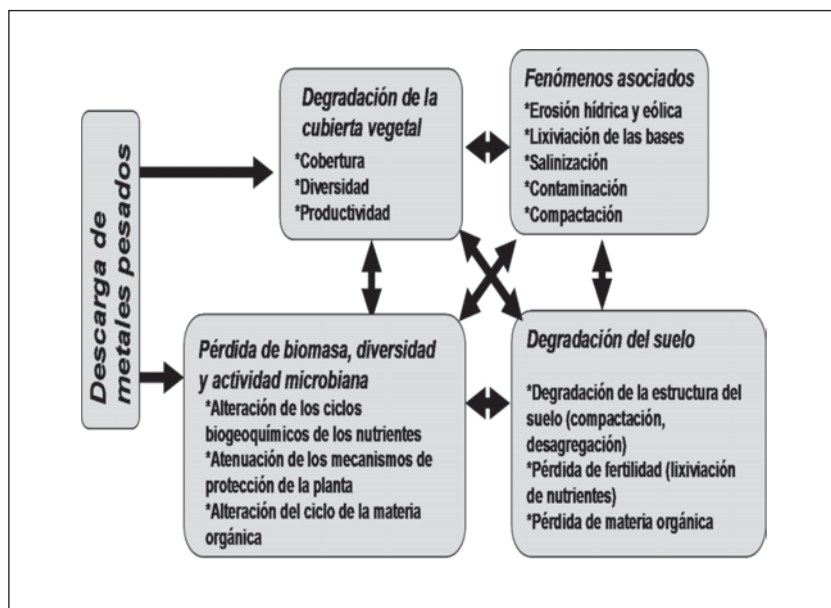


Figura 1: Interacciones presentes en la degradación de suelos sometidos a la descarga de metales pesados (modificado de Barea et al. 1999 y Cornejo et al. 2008a).

A pesar de los efectos negativos debidos a la presencia de niveles tóxicos de MP en suelos, la exposición continua puede favorecer la selección y crecimiento de poblaciones microbianas que posean la capacidad o hayan desarrollado diversos mecanismos de tolerancia a estas condiciones de estrés, resultando en poblaciones más especializadas capaces de realizar los diversos procesos bioquímicos en los que normalmente están envueltos (Ellis et al. 2003; de la Iglesia et al. 2006). En este sentido, el poder manipular estas poblaciones microbianas puede ser una valiosa herramienta para la remediación de suelos afectados por actividades mineras, o que en general estén contaminados con MP (Cornejo et al. 2008a).

En particular, resultan todavía más valiosos aquellos organismos que promueven el establecimiento y crecimiento vegetal, ya que acelerarían el proceso de restablecimiento de la cubierta vegetal en los ecosistemas

contaminados con MP. En este contexto, la denominada simbiosis micorrízico arbuscular (MA) es extensamente conocida por desempeñar un papel clave en el establecimiento y crecimiento de la gran mayoría de las especies de plantas terrestres (Barea et al. 2005). Por tanto, la utilización de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) puede representar una eficiente alternativa para utilizar en conjunto con plantas capaces de establecer la simbiosis MA, dado las numerosas ventajas ecológicas que ésta presenta, su ubicuidad en diversos suelos y ecosistemas, y también por haber desarrollado diversas estrategias que permitan a las plantas tolerar altas concentraciones de MP en el suelo (Göhre, Paszkowski 2006; Hildebrandt et al. 2007). Esta utilización conjunta de HMA y plantas micotróficas en procesos de biorremediación se denomina micorrizorremediación (Khan 2006), y se entiende como una innovadora aplicación de programas de fitorremediación de suelos contaminados por actividades mineras y/o MP en general.

Aspectos generales de la simbiosis micorrízico arbuscular

La asociación MA es la simbiosis terrestre más extendida, y es capaz de establecerla aproximadamente un 80-85% de todas las especies de plantas superiores (Smith, Read 2008). Los hongos que forman las MA pertenecen al phylum Glomeromycota (Walker, Schussler 2004), y se caracterizan, entre otros aspectos, por poseer una biotrofia obligada, lo cual determina que para completar su ciclo de vida, y así formar propágulos viables, el HMA deba encontrarse en estado simbiótico con una raíz.

La base de la simbiosis MA es principalmente nutricional, pero las ventajas ecosistémicas que se producen en el ambiente circundante a donde se establece son muy numerosas, y se mencionarán a lo largo de este capítulo. En esta simbiosis, diversos propágulos de HMA (micelio, esporas, trozos de raíz previamente colonizados) presentes en el suelo se activan en presencia de raíces factibles de ser colonizadas, emitiendo hifas que entran en contacto con la superficie de la raíz (ver Figura 2). Con posterioridad, el HMA extiende sus hifas de forma intra- e intercelular por las células corticales de la raíz, generando también una extensa red de micelio en el suelo, y la estructura típica de esta simbiosis, denominada arbusculo. Esta estructura se genera por continuas separaciones dicotómicas en la zona terminal de las hifas intercelulares, y es donde se realiza el intercambio nutritivo.

Las hifas extrarradicales funcionan como un sistema radical complementario, que permite aumentar la captación de nutrientes, especialmente los menos móviles como el P, y agua desde el suelo direccionándolo posteriormente hacia la planta (Bolan 1991; Cornejo et al. 2008c). Por contraparte, el HMA recibe un aporte de compuestos carbonados originados en la fotosíntesis vegetal, dado que no puede obtener sus fuentes carbonadas si no se encuentra asociado a una raíz funcional, y que puede ser el principal aspecto que determine su biotrofia obligada (Azcón-Aguilar et al.

1998). Debido a este comportamiento bidireccional, el desarrollo de esta simbiosis resulta un componente ecológico altamente eficiente, que permite que las plantas se establezcan y crezcan en suelos que puedan presentar incluso altos niveles de contaminación por MP, basado primariamente en la mejora de la nutrición mineral de las plantas micotróficas (Arriagada et al. 2007).

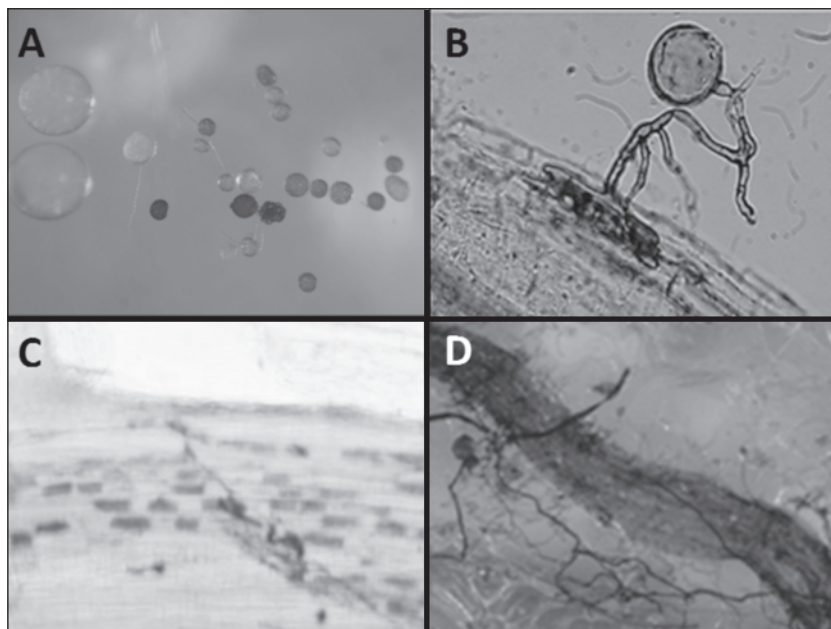


Figura 2: Diferentes estructuras de la simbiosis micorrízico arbuscular. A) Esporas de hongos micorrízico arbusculares (HMA) aislados de suelos contaminados con Cu en la zona central de Chile; B) Inicio de la colonización de una raíz de *Lavandula latifolia* por el HMA *Glomus coronatum*; C) Desarrollo de numerosos arbúsculos dentro de las células radicales; D) Micelio extrarradical teñido con el colorante azul de tripano (fotografías obtenidas por Pablo Cornejo).

Como se mencionó anteriormente, la principal contribución de la simbiosis MA es de tipo nutricional, con el consiguiente beneficio en el crecimiento vegetal, lo que por sí sólo justificaría la utilización biotecnológica de HMA en programas de biorremediación utilizando plantas. No obstante, las ventajas de su incorporación en programas para la recuperación de ecosistemas contaminados y/o degradados son mucho más extensas. Entre otras ventajas, destaca su capacidad para estabilizar físicamente los suelos, previniendo o revirtiendo procesos comunes en suelos degradados y contaminados, como es el caso de la erosión. Esto es debido a que la extensa red de hifas del HMA en el suelo circundante a la raíz entrelaza las partículas, favoreciendo la

formación de agregados estables (Miller, Jastrow 2000; Borie et al. 2008; Curaqueo et al. 2010). En este mismo sentido, una glicoproteína producida inicialmente por los HMA, -glomalina-, y acumulada en el suelo en cantidades significativas, puede funcionar como un verdadero adhesivo, aumentando el estado de agregación de las partículas del suelo (Rillig, Mummey 2006; Curaqueo et al. 2010).

Adicionalmente, los HMA pueden contribuir de manera significativa, por distintos medios, a la tolerancia de plantas que crecen en suelos contaminados por actividades mineras (Göhre, Paszkowsky 2006; Hildebrandt et al. 2007; Cornejo et al. 2008a), disminuyendo el efecto tóxico de los MP y favoreciendo el establecimiento de diversas especies vegetales en estos suelos. A continuación se mencionan los distintos mecanismos de tolerancia en plantas que se ven potenciados por la presencia de la simbiosis MA en suelos contaminados con MP.

Tolerancia a metales en la simbiosis micorrícica arbuscular y su aporte a procesos de fitorremediación

En el caso particular de los suelos contaminados por actividades mineras o por la descarga de residuos enriquecidos en MP, resulta muy importante el hecho que los HMA presenten una serie de mecanismos de tolerancia/resistencia, que en conjunto favorecen y facilitan la presencia de distintas especies de plantas bajo esas condiciones de estrés ambiental (Göhre, Paszkowski 2006; Hildebrandt et al. 2007; Figura 3).

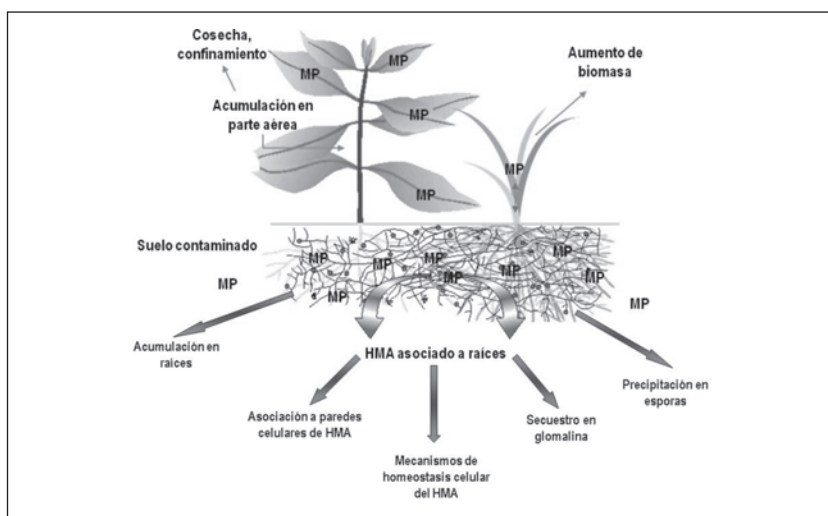


Figura 3: Formas por las cuales los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) contribuyen a la tolerancia/resistencia de plantas creciendo en suelos contaminados con metales pesados (MP).

Entre estos mecanismos, destaca la quelación e inmovilización extracelular de los MP, a través de la glomalina y la quitina de sus paredes celulares. Diversos estudios muestran la capacidad de adsorción de MP (en particular Cd y Cu) al micelio extrarradical de HMA, el cual incluso es significativamente mayor al de algunos organismos utilizados comúnmente en biosorción, como *Rhizopus arrhizus* (Joner et al. 2000; González-Chávez et al. 2002; Chen et al. 2003). Por otra parte, se ha observado que importantes mecanismos bioquímicos de homeostasis de MP están presentes en el hongo, los que le permiten entre otras funciones confinar altos contenidos de estos elementos en vacuolas, o quelarlos intercelularmente mediante proteínas del tipo metalotioneínas (González-Guerrero et al. 2007, 2008). Adicionalmente, la existencia de determinados transportadores de membrana puede producir la transferencia de MP hacia el exterior del citoplasma fúngico, y eventualmente depositarlos en la matriz interfacial (zona de contacto entre los arbuscúlos y la membrana plasmática de las células radicales). Esto explicaría que en muchos casos las raíces de plantas micorrizadas presenten concentraciones de MP mucho mayores que plantas no micorrizadas (Davies et al. 2001; Chen et al. 2005), o que eventualmente queden disponibles para ser translocados a la parte aérea, lo que favorecería procesos de fitoextracción (Giasson et al. 2005; Carvalho et al. 2006; Leung et al. 2006; Trotta et al. 2006). Un ejemplo de lo anterior sería la utilización de plantas de *Eucalyptus globulus* inoculadas con HMA y hongos saprobios como alternativa para la fitoextracción de Zn y As (Arriagada et al. 2009a,b).

Por otra parte, recientemente se ha observado en distintos grupos de investigación que algunas esporas de los HMA *Glomus intraradices* y *G. claroideum* son destinadas al almacenamiento de precipitados de sales de Cu, las cuales hipotéticamente confinan estos metales pesados, protegiendo al resto de la población de HMA de los efectos oxidativos originados por los altos niveles intracelulares de este elemento (Ferrol et al. 2009; Meier et al. En prensa).

Todos estos mecanismos, o la preponderancia de alguno de ellos en determinados aislados o ecotipos de HMA, pueden potenciar significativamente programas ya sean de fitoestabilización o bien de fitoextracción de MP para su implementación en ecosistemas afectados por actividades mineras, o como medida paliativa en la finalización y cierre de explotaciones mineras. Adicionalmente, la utilización de HMA en este tipo de programas debe considerar la elección de las especies vegetales propicias para acometer el plan de fitorremediación. Particularmente, las especies metalofitas surgen como la mejor opción a ser consideradas para estos planes, ya que estas plantas poseen *per se* mecanismos que les permiten establecerse en ambientes contaminados con MP (Baker 2000; Ginocchio 2000). Sin embargo, como se puede observar, muchos de los aportes que produciría el HMA se orientan a favorecer programas de fitoestabilización, ya sea estabilizando los MP en sus estructuras y/o glomalina, o permitiendo una mayor acumulación en las raíces de las plantas. Por tanto, la selección de ecotipos de HMA y plantas para acometer estos programas debiera, primariamente, centrarse en la búsqueda de las combinaciones más efectivas en este tipo de fitorremediación, en particular la que promueva una mayor acumulación de glomalina en el

suelo, dada la importancia que esta proteína puede representar en este tipo de suelos, como se detalla a continuación.

Rol de la glomalina en la fitoestabilización de suelos contaminados por metales pesados

Como se mencionó previamente, la glomalina es una glicoproteína producida inicialmente por los HMA, y que posteriormente es liberada al suelo por transformaciones de las estructuras fúngicas, siendo finalmente acumulada en grandes cantidades (Wright, Upadhyaya 1998; Purin, Rillig 2007). Una vez en el suelo, contribuye a unir las partículas del suelo, estabilizando de esta forma los agregados (Rillig, Mummey, 2006), y favoreciendo la resistencia física del mismo ante procesos degradativos como son por ejemplo la erosión hídrica y/o eólica.

En general, no existe concordancia respecto de la composición y estructura de esta proteína, aunque se la ha considerado formando parte de las paredes celulares de hifas y esporas, desde donde llega al suelo por degradación de las mismas (Driver et al. 2005), y que su identidad estaría muy relacionada con proteínas del tipo HSP (Gadkar, Rillig 2006), caracterizadas por inducirse inespecíficamente frente a diversos tipos de estrés ambiental, como podría ser el caso de los altos niveles de MP en suelos contaminados por actividades mineras. De hecho, algunos estudios han establecido una correlación directa y muy significativa entre el nivel de MP en el suelo (en particular Cu, Zn y Pb) y la cantidad de glomalina acumulada en el mismo (Cornejo et al. 2008b; Vodnik et al. 2008).

Adicionalmente, esta proteína tiene la capacidad de incorporar y secuestrar en su estructura diversos metales a través de uniones estables con algunos de sus grupos funcionales, pudiendo llegar a representar cantidades importantes de la totalidad de MP presentes en el suelo (González-Chávez et al. 2004; Chern et al. 2007; Cornejo et al. 2008; Vodnik et al. 2008). En la Tabla 1 se resumen algunos de los estudios relacionados a la capacidad de inmovilización de MP por esta proteína.

Tabla 1.

Contribución de la glomalina a la inmovilización de metales pesados.

Metal	Plantas	Efecto benéfico	Referencia
Cu	Maíz y sorgo	La glomalina producida por las hifas de <i>Gigaspora rosea</i> inmoviliza hasta 28 mg Cu g ⁻¹ , y la producida por <i>Glomus mosseae</i> inmoviliza entre 1 y 1,6 mg Cu g ⁻¹	González-Chávez et al. 2004
Cu, Zn	Metalófitas nativas	La glomalina presente en el suelo y producida por HMA nativos inmoviliza desde un 1,4 y hasta un 28% del Cu total del suelo, y de un 1,4 y hasta un 5,8% del total de Zn en el suelo	Cornejo et al. 2008b
Pb, Zn	Ecosistemas degradados con <i>Sesleria caerulea</i>	La glomalina producida por los HMA naturalmente presentes en un suelo contaminado es capaz de inmovilizar hasta 23,4 mg Pb g ⁻¹ , que representa alrededor de un 16% del total de Pb del suelo	Vodnik et al. 2008

Por otra parte, los altos rangos en que esta proteína ha sido encontrada en distintos suelos (hasta más de 60 mg g⁻¹) y su alta recalcitrancia (más de 40 años de vida media) la convierten en una fracción cuantitativamente muy importante y temporalmente muy estable para inmovilizar MP. Sin duda, estos aspectos sugieren un rol activo muy importante de la glomalina en la mitigación de la toxicidad ocasionada a las plantas que se encuentran creciendo en suelos contaminados con MP. En particular, el efecto beneficioso de la acumulación de glomalina en el suelo, y su subsecuente capacidad de inmovilización de MP, convierten a este compuesto en uno de los principales medios por los cuales los HMA contribuirían a potenciar procesos de fitoestabilización, aspecto muy importante a tener en consideración al diseñar programas de micorrizorremediación.

Aplicación de enmiendas como complemento a la micorrizorremediación

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo se ha utilizado extensivamente con una gran cantidad de finalidades, como por ejemplo en la recuperación de áreas desertificadas, como forma de hacer frente a la sequía, para incrementar el crecimiento vegetal (fertilizante), para mejorar las condiciones físico-químicas del suelo mediante el aumento de materia orgánica edáfica, así como también para la remediación de suelos contaminados con MP (Roldán et al. 1996; Medina, Azcón 2010). En este sentido, cabe mencionar que en suelos contaminados con MP, la calidad biológica es altamente reducida, siendo uno de los factores responsables de ello la pérdida en los contenidos de materia orgánica, por lo que su aumento debe ser una de las estrategias recomendadas con fines de biorremediación. Adicionalmente, los estudios realizados a la fecha combinando el uso de residuos agroindustriales transformados e inoculantes de HMA muestran un efecto sinérgico (Arriagada et al. 2009a; Azcón et al. 2009), lo que ratifica su uso potencial en programas de fitorremediación.

En particular, se ha utilizado residuos de remolacha azucarera biotransformados por *Aspergillus niger* en suelos contaminados con Cu, utilizando HMA nativos del suelo y supuestamente adaptados a las condiciones de estrés por los altos niveles de Cu, así como también HMA no adaptados a esas condiciones. Se observó que la aplicación de la enmienda orgánica produjo un significativo incremento nutricional en las plantas utilizadas, y también una reducción del estrés oxidativo, en particular cuando estaban colonizadas por los HMA adaptados a Cu (Medina, Azcón 2010; Meier et al. En prensa). Además, se ha demostrado la importancia de seleccionar los endofitos más eficientes de HMA y otros hongos no patogénicos de la rizosfera, como son los hongos saprobios, a fin de estimular el crecimiento y desarrollo de plantas cultivadas en suelos contaminados por metales pesados y la combinación de ambos hongos (efectos sinérgicos) juega un rol de vital importancia en la tolerancia y fitoextracción de metales pesados por parte de *E. globulus* (Arriagada et al. 2004, 2005, 2007, 2009b).

En suelos contaminados con Zn, la aplicación de HMA y de residuos orgánicos transformados permitió el establecimiento de una planta no metalófila (*Trifolium repens*), la que en estos casos presentó una producción de biomasa hasta 28 veces mayor que plantas creciendo sin inoculación y aplicación de residuos (Medina et al. 2006), efectos benéficos que también fueron observados en suelos contaminados con Cd (Medina et al. 2005), y en suelos multicontaminados (Azcón et al. 2009). En este último caso (suelos multicontaminados), Arriagada et al. (2007) observaron que la inoculación de *Eucalyptus globulus* con *Glomus deserticola* aumentó igualmente la absorción de Pb.

Perspectivas de la utilización de programas de micorriorremediación

En base a lo expuesto, es evidente el efecto beneficioso que tiene la utilización de HMA en procesos de biorremediación de suelos contaminados por actividades mineras, y en general de aquéllos con alta presencia de MP. En este sentido, uno de los aspectos que se hace necesario conocer es la diversidad de HMA que naturalmente presentan o han desarrollado adaptaciones para hacer frente a los efectos tóxicos de los altos niveles de MP en los suelos, para poder seleccionarlos, multiplicarlos y aplicarlos en programas de micorriorremediación.

No obstante, es igualmente importante conocer cuáles son los principales mecanismos que utiliza el HMA seleccionado para hacer frente al estrés originado por los MP, y cuál es el efecto final que produce cuando se encuentra asociado con las plantas escogidas, ya que esto determinará si finalmente se está potenciando procesos de fitoextracción, o por el contrario, se está potenciando la fitoestabilización, si el MP queda inmovilizado/secuestrado bajo la superficie del suelo (Figura 4). De forma general, cabe mencionar que gran parte de los mecanismos de tolerancia previamente descritos actuarían favoreciendo principalmente procesos de fitoestabilización de suelos contaminados por actividades mineras, aún cuando combinaciones específicas entre determinados ecotipos de HMA y alguna especie vegetal en particular pueden potenciar la hiperacumulación de determinados MP. Es por tanto imprescindible conocer las bases que determinen la adopción final de una de estas alternativas, previo a la implementación de plantas micorrizadas en terrenos contaminados.

Sumado a lo anterior y al enorme avance tecnológico que puede representar la inclusión de HMA en programas de fitorremediación, se hace necesario contar con herramientas adicionales, que permitan realizar el control posterior del proceso, considerando parámetros que permitan analizar la funcionalidad, efectividad y persistencia de los ecotipos utilizados a lo largo del tiempo, dado que es bien conocido que los programas de fitorremediación son generalmente lentos y planificados a largo plazo. Entre estas herramientas, los avances en el estudio genético de este grupo de hongos permiten en la actualidad realizar su identificación, incluso dentro de las

raíces colonizadas, utilizando marcadores específicos que puedan servir para monitorizar su presencia a lo largo del tiempo (Cornejo et al. 2004).

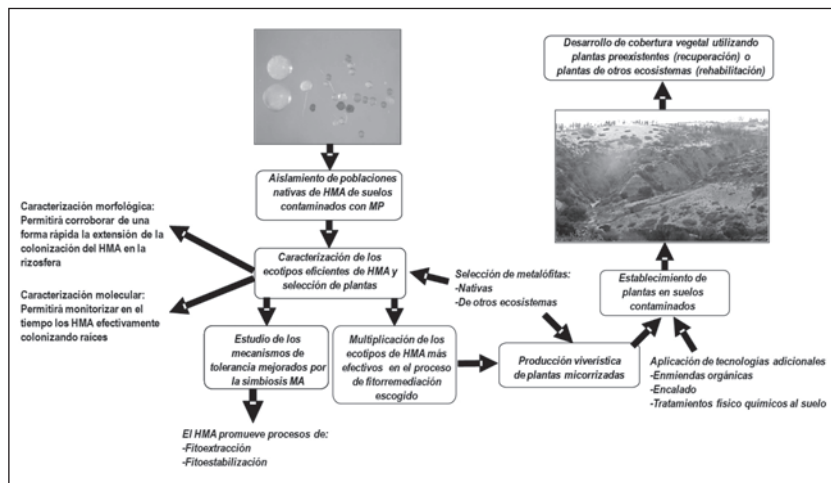


Figura 4: Estrategias propuestas para el estudio de la diversidad de HMA en suelos contaminados por actividades mineras con vistas a la utilización de ecotipos eficientes en programas de micorrizorre-mediación y revegetación de suelos contaminados por actividades mineras (modificado de Cornejo et al. 2008a).

Otro aspecto clave a tener en consideración, es la necesidad de incorporar procesos de producción viverística de las plantas micorrizadas a ser establecidas en campo para, de esta forma, asegurar que el HMA se encuentre simbióticamente activo al momento de ser sometido a los efectos tóxicos debido a los altos niveles de MP en el suelo contaminado. Este hecho es muy importante si se considera que estos ecosistemas han presentado una importante pérdida o incluso desaparición de los propágulos microbianos del suelo, y que en buena parte esto se ha podido deber a la escasa capacidad de micorrización que pueden presentar los HMA naturalmente presentes en el suelo, dificultando el inicio de nuevas colonizaciones.

Por otra parte, la aplicación de otras tecnologías adicionales que permitan mejorar y acelerar el proceso de biorremediación deben ser igualmente consideradas. En este sentido, conociendo que buena parte del funcionamiento de los ecosistemas terrestres es dependiente de los microorganismos del suelo (Jeffries, Barea 2001), se debe analizar la factibilidad de incorporar rizobacterias que doten a la planta de una rizosfera optimizada, y que la ayuden a superar los distintos estreses ambientales, aumentando las probabilidades de éxito en el establecimiento de la cubierta vegetal (Barea et al. 2005). Finalmente, la aplicación de enmiendas, en particular las de tipo orgánico y aquellas que reduzcan la actividad tóxica de los MP, podría ser una enorme contribución al proceso global de

remediación, por cuanto contribuyen a revertir buena parte de los procesos de degradación del suelo originados por la descarga de metales pesados, resultando en prácticamente todas las experiencias analizadas sinérgicos con la utilización de microorganismos rizosféricos, en particular con los HMA.

Agradecimientos

A los proyectos Fondecyt N° 3070052 y 11080131 de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT-Chile) por el financiamiento para el desarrollo de esta línea de investigación.

Bibliografía

- Adriano D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risk of Metals, Springer-Verlag. New York. pp. 867.
- Arriagada C., Aranda E., Sampedro I., García-Romera I., Ocampo J.A. 2009a. Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. Biores Technol. 100:6250–6257.
- Arriagada C., Aranda E., Sampedro I., García-Romera I., Ocampo J.A. 2009b. Differential effect of *Trametes versicolor* and *Corioloropsis rigida* on the action of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on the copper tolerance of *Eucalyptus globulus*. Chemosphere. 77:273–278.
- Arriagada C., Herrera M., Garcia-Romera I., Ocampo J.A. 2004. Tolerance to Cd of Soybean (*Glycine max*) and Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. Symbiosis. 36:285-301.
- Arriagada C., Herrera M., Ocampo J.A. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. Water. Air and Soil Pollut. 166: 31-47.
- Arriagada C., Herrera M., Ocampo J.A. 2007. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on tolerance of *Eucalyptus globulus* co-cultured with *Glycine max* to heavy metal contaminated soil. J Environ Manag. 84: 93-99.
- Azcón R., Medina A., Roldán A., Biró B., Vivas A. 2009. Significance of treated agrowaste residue and autochthonous inoculates (arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus cereus*) on bacterial community structure and phytoextraction to remediate heavy metals contaminated soils. Chemosphere. 75:327-334.

- Azcón-Aguilar C., Bago B., Barea J.M. 1998. Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. En: Varma A., Hock B.(Eds.). *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer. Heidelberg. pp. 391-408.
- Baker A.J.M. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the biological resource for possible exploitation in the phytoremediation of metal-polluted soils. En: Bañuelos T. (ed.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 85-107.
- Barea J.M., Pérez-Solís E., del Val C., Azcón-Aguilar C. 1999. Importancia de las micorrizas en el establecimiento y protección de las plantas en suelos degradados. *Phytoma*. 111:18-30.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot*. 56:1761-1778.
- Bolan N. 1991. A critical review on the effect of mycorrhizal fungi on the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*. 134:189-207.
- Borie F., Rubio R., Morales A. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. *J Soil Sci Plant Nut*. 8:9-18.
- Carvalho L., Caçador I., Martinis-Loução M. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant and Soil*. 285:161-169.
- Chen X., Wu C., Tang J., Hu S. 2005. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere*. 60:665-671.
- Chen Y.X., Lin Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*. 50:807-811.
- Chern E.C., Tsai D.W., Ogunseitan O.A. 2007. Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environ Sci Tech*. 41:3566-72.
- Cornejo P., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Ferrol N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett*. 241: 265-270.
- Cornejo P., Meier S., Borie F. 2008a. Use of Mycorrhizal Fungi as possible alternative of bioremediation in soils affected by mining activity. *Revista Gestión Ambiental*. 16:13-26.
- Cornejo P., Meier S., Borie G., Rillig M., Borie F. 2008b. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci Total Environmen*. 406:154-160.

- Cornejo P., Rubio R., Castillo C., Azcón R., Borie F. 2008c. Mycorrhizal effectiveness on wheat nutrient acquisition in an acidic soil from southern Chile as affected by nitrogen sources. *J Plant Nut.* 31:1555-1569.
- Curaqueo G., Acevedo E., Cornejo P., Seguel A., Rubio R., Borie F. 2010. Tillage effect on soil organic matter, mycorrhizal hyphae and aggregates in a mediterranean agroecosystem. *J Soil Sci Plant Nut.* 10: 17-26.
- Davies F.T., Puryear J.D., Newton R.J., Egilla J.N., Saraiva Grossi J.A. 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *J Plant Physiol.* 158:777-786.
- de la Iglesia R., Castro D., Ginocchio R., van der Lelie D., González B. 2006. Factors influencing the composition of bacterial communities found at abandoned copper-tailings dumps. *J App Microbiol.* 100:537-544.
- Driver J.D., Holben W.E., Rillig M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.* 37:101-106.
- Ellis R., Morgan P., Weightman A. 2003. Cultivation dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *App Environ Microbiol.* 69:3223-3230.
- Ferrol N., González Guerrero M., Valderas A., Benabdellah K., Azcón-Aguilar C. 2009. Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochem Rev.* 8:551-559.
- Gadkar V., Rillig M. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative 16 homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol Lett.* 263:93-101.
- Giasson P., Jaouich A., Gagné S., Moutoglis P. 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Involvement in Zinc and Cadmium Speciation Change and Phytoaccumulation. *Remediation.* 15:75-81.
- Giller K., Witter E., McGrath S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol Biochem.* 30:1389-1414.
- Ginocchio R. 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncavi Valley, Chile. *Chemosphere.* 41:15-23.
- Göhre V., Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta.* 223:1115-1122.
- González-Chávez M., Carrillo-González R., Wrigth S., Nichols K. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Poll.* 130:317-323.
- González-Chávez C., D'Haen J., Vangronsveld J., Dodd J. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus spp.* (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil.* 240:287-297.

- González-Guerrero M., Cano C., Azcón-Aguilar C., Ferrol N. 2007. *GintMT1* encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza*. 17:327-335.
- González-Guerrero M., Melville L., Ferrol N., Lott J., Azcón-Aguilar C., Peterson R. 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can J Microbiol*. 54:103-110.
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem*. 68:139-146.
- Jeffries P., Barea J.M. 2001. Arbuscular Mycorrhiza-a key component of sustainable plant-soil ecosystems. En: Hock B (ed.). *The Mycota IX. Fungal Associations*. Springer-Verlag. Berlin. pp. 95-113.
- Joner E., Briones R., Leyval C. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil*. 226:227-234.
- Kennedy A.C., Smith K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*. 170:75-86.
- Khan A.G. 2006. Micorrhizoremediation: an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ SCI B*. 7:503-514.
- Leung H., Ye Z., Wong M. 2006. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (*As hyperaccumulator*) in As-contaminated soils. *Environ Poll*. 139:1-8.
- Medina A., Azcón R. 2010. Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhizal fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *J Soil Sci Plant Nut*. 10:354-372.
- Medina A., Vassileva M., Barea J.M., Azcón R. 2005. Application of *Aspergillus niger*-treated agrowaste residue and *Glomus mosseae* for improving growth and nutrition of *Trifolium repens* in a Cd-contaminated soil. *J Biotechnol*. 116:369-378.
- Medina A., Vassileva M., Barea J.M., Azcón R. 2006. The growth-enhancement of clover by *Aspergillus*-treated sugar beet waste and *Glomus mosseae* inoculation in Zn contaminated soil. *App Soil Ecol*. 33:87-98.
- Meier S., Borie F., Bolan N.S., Cornejo P. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the bioremediation of soils polluted by mining activities. *Crit Rev Environ Sci Tech*. En prensa.
- Meier S., Azcón R., Borie F., Cornejo P. Alleviation of Cu toxicity and antioxidant plant responses in a metallophyte by copper adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. *App Soil Ecol*. 48: 117-124.
- Miller R.M., Jastrow J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: Kapulnik Y, Douds (eds.). *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. pp. 4-18.

- Purin S., Rillig M. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*. 51:123-130.
- Reimann C., Koller F., Kashulina H., Niskavaara G., Englmaier P. 2001. Influence of extreme pollution on the inorganic chemical composition of some plants. *Environ Pollut*. 115:239-252.
- Rillig M., Mummey D. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*. 171:41-53.
- Roldán A., Albaladejo J., Thornes J.B. 1996. Aggregate stability changes in a semiarid soil after treatment with different organic amendments. *Arid Soil Res Rehab*. 10:139-148.
- Smith S.E., Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. San Diego. pp. 787.
- Trotta A., Falaschi P., Cornara L., Minganti V., Fusconi A., Drava G., Berta G. 2006. Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the As hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Chemosphere*. 65:74-81.
- Vodník D., Grèman H., Maèek I., van Elteren J.T., Kovaèevì M. 2008. The contribution of glomalin related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Sci Total Environ*. 392:130-136.
- Walker C., Schussler A. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycol Res*. 97:339-344.
- Wright S.F., Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 198:97-107.



La presente edición se terminó de editar de manera digital en Marzo de 2013. Todos los derechos reservados.

Asociación Argentina de Microbiología

RIZOSFERA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

Inés Eugenia García de Salamone, Susana Vázquez, Claudio Penna & Fabricio Cassán
EDITORES



2013

Asociación Argentina de Microbiología
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
<http://www.aam.org.ar/>

ISBN 978-987-26716-1-7



9 789872 671617

La rizosfera es una parte del suelo inmediata a las raíces en donde se desarrolla una fuerte y única interacción de tres componentes, la planta, el suelo y las micro y macrofauna que habitan esta fracción del sistema. En un sentido más amplio de la definición, la rizosfera es la porción de suelo en la que están presentes las raíces de los vegetales y en la que se dan una serie de complejas relaciones físicas y químicas que afectan tanto la estructura del sistema suelo como los organismos que en él viven. La rizosfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde las bacterias, los hongos y el resto de los organismos rizosféricos forman una comunidad única en asociación con las raíces y de considerable potencial para su estudio y aplicación tecnológica desde los puntos de vista agrícola y ecológico.

El TIRBAS 2010 tuvo como objetivos fundamentales: (1) Generar un marco interdisciplinario para el intercambio de información científico-tecnológica sobre el estudio de la rizosfera en Argentina, (2) Promover el desarrollo de un espacio institucional sobre el estudio, uso y aplicación agro-industrial de los conocimientos relacionados con la rizosfera en nuestro país, que permita de manera estratégica integrar la investigación básica y agrícola con la demanda tecnológica del sector industrial, y (3) Compartir la experiencia de investigadores de diferentes países del mundo que han contribuido de manera decisiva a la comprensión del modelo básico de estudio.

ISBN 978-987-26716-1-7

Imagen de Portada

Azospirillum brasilense colonizing stolon inner structures of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch).

Micrograph, obtained with a ZEISS SUPRA 55VP scanning electron microscope, shows bacterial cells gathered in groups (pink) within tissues of the stolon vascular zone (green). Authors: M.F. Guerrero-Molina¹, B.C. Winik², R.O. Pedraza¹.

¹Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900. (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. ²Centro Integral de Microscopía Electrónica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT. INSIBIO CCT – CONICET Tucumán. Chacabuco 461, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.