

**CONTRIBUCIÓN A UNA PRODUCCIÓN
SOSTENIBLE DE ALFALFA MEDIANTE
EL MANEJO DE MICROORGANISMOS
RIZOSFÉRICOS EN ARGENTINA, CHILE
Y URUGUAY**

PROYECTO FTG-13/2001
Convenio FTG/RF-01-03-RG

Informe Técnico Final (Preliminar)

MARZO 2007

CONTENIDO

<i>Instituciones ejecutoras</i> _____	4
1. RESUMEN _____	5
2. METODOLOGÍAS UTILIZADAS _____	13
3. RESULTADOS OBTENIDOS _____	19
3. 1. Principales Resultados Técnicos _____	19
3.2 Productos Obtenidos _____	38

CONTRIBUCIÓN A UNA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE ALFALFA MEDIANTE EL MANEJO DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN ARGENTINA, CHILE Y URUGUAY.

Coordinador general: Roberto W. Racca. Camino a 60 Cuadras Km. 5½ (5119), Córdoba-Argentina. TE: +54-351-497 3636/4343, FAX: +54-351-972319/4330. URL: www.inta.gov.ar/iffive. E-mail: rracca@correo.inta.gov.ar

Responsable módulo Argentina: Racca, Roberto W.

Responsable módulo Chile: Campillo, Ricardo. Centro Regional Carrillanca. Unidad de Biotecnología y Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente INIA, Chile. E-mail: rcampill@carrillanca.inia.cl; rgaldame@carrillanca.inia.cl

Responsable módulo Uruguay: Labandera, Carlos. Departamento de Microbiología de Suelos. División Suelos y Aguas. Dirección General de Recursos Naturales Renovables - MGAP. Burgues 3208 Montevideo-Uruguay. E-mail: clabandera@adinet.com.uy

Instituciones ejecutoras

Ejecutor principal: Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE), INTA. Camino a 60 Cuadras Km. 5½ (5119), Córdoba-Argentina. TE: +54-351-497-3636/4343, FAX: +54-351-497-2319/4330. URL: www.inta.gov.ar/iffive. E-mail: rracca@correo.inta.gov.ar

Ejecutores asociados:

- a) Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), INTA. Las Cabañas y Los Reseros. CC. 25 (1712) Castelar. Buenos Aires-Argentina. E-mail: aperticari@cni.inta.gov.ar
- b) Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce-FCA, UNMDP). Ruta 226 km 73 1/2, Balcarce, Bs. As. Argentina. e-mail: ngonzalez@balcarce.inta.gov.ar
- c) EEA Manfredi-INTA, Ruta 9 Km 636 (5988) Manfredi. Córdoba-Argentina. E-mail: dbasigalup@correo.inta.gov.ar
- d) EEA Marcos Juárez-INTA. Ruta Provincial 12 Km 2. CC 21 (2580) Marcos Juárez, Córdoba-Argentina. E-mail: economiamj@correo.inta.gov.ar
- e) Laboratorio de Fisiología Vegetal Cs Exactas, Físico Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto. Enlace Rutas 8 y 36 (5800) Río Cuarto, Córdoba-Argentina. E-mail: ncorrea@exa.unrc.edu.ar
- f) Instituto de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calles 47 y 115 (1900) La Plata. Buenos Aires-Argentina. E-mail: lagares@biol.unlp.edu.ar
- g) Departamento de Química. Instituto de Investigación y Desarrollo en Microbiología y Química Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNLPam. Uruguay 151 (6300), Santa Rosa, La Pampa. Argentina. E-mail: grassano@exactas.unlpam.edu.ar; alronchi@exactas.unlpam.edu.ar
- h) Departamento de Microbiología de Suelos. División Suelos y Aguas. Dirección General de Recursos Naturales Renovables - MGAP. Burgues 3208 Montevideo-Uruguay. E-mail: clabandera@adinet.com.uy
- i) Centro Regional Carrillanca. Unidad de Biotecnología y Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente INIA, Chile. E-mail: rcampill@carrillanca.inia.cl; rgaldame@carrillanca.inia.cl
- j) Catedra de Estadística y Biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. E-mail: mbalzari@agro.uncor.edu
- k) Rizobacter Argentina, Pergamino. E-mail: ebrenzoni@rizobacter.com.ar

1. RESUMEN

Se estima que en Argentina se cultivan 6 millones de hectáreas de alfalfa, ubicando a este país como segundo productor mundial, luego de los EE.UU. En Chile y Uruguay, las superficies de cultivo son 250.000 y 100.000 ha respectivamente, lo que representa aproximadamente el 30 % de la superficie potencial cultivable de estos países, al igual que en Argentina. El 90% de la superficie cultivada en este último país, se concentra en la región Pampeana sub-húmeda y semiárida en donde las principales limitantes para la FBN son la disponibilidad de agua, acidez del suelo y bajos niveles de fósforo disponible (Hijano & Basigalup, 1995).

En Chile se cultiva con éxito en las zonas Centro-Norte y Centro, en donde se presentan suelos y climas favorables. En las zonas Centro-Sur y Sur del país, la producción de esta forrajera está limitada, debido a la existencia de suelos ácidos derivados de cenizas volcánicas (andisoles), con concentraciones altas de Al y Mn y bajas en P (Zurita et al., 1994; Urzua et al., 1995).

En Uruguay se cultiva en el área núcleo de producción animal intensiva, en donde se encuentra en plena expansión debido a su elevada producción y persistencia. Las principales limitantes para la FBN que se presentan en los suelos de este país, son el mal drenaje y la acidez (Murata et al., 1965; White, 1967).

Comparada con otras especies, el forraje de alfalfa tiene un mayor contenido de proteínas y por consiguiente, altos requerimientos nitrogenados (Bickoff, 1979; INTA-FAO, 1986; Howarth, 1988). En el área núcleo de Argentina, en condiciones de secano, la alfalfa puede producir entre 8 y 22 Ton. ha⁻¹ año⁻¹ de materia seca, dependiendo de la disponibilidad hídrica del año (Hijano & Basigalup, 1995). Esto implica para contenidos medios de proteína del 20%, un consumo cercano a los 500 kg.ha⁻¹.año⁻¹ de nitrógeno, posibles de ser exportados del área de producción, cuando se utiliza como forraje de corte (Racca, R. et al 2001). Bajo condiciones de riego, con rendimientos que pueden superar las 28 Ton, las extracciones de nitrógeno se pueden aproximar a los 800 Kg ha⁻¹ año⁻¹ (Collino et al., 1997; Racca et al., 1998). Estos altos requerimientos pueden provocar una pérdida rápida y constante de la fertilidad nitrogenada del suelo, si no existe un sistema de reciclaje parcial del nitrógeno unido a un eficiente sistema de fijación biológica de N₂ por asociación con rizobios específicos. Por lo tanto la propiedad de la alfalfa de mantener o aún aumentar la fertilidad de los suelos, depende en gran medida de su capacidad para incorporar nitrógeno de la atmósfera.

Las estimaciones sobre la cantidad de N₂ fijado por la alfalfa, varían considerablemente. Silver & Hardy (1978) informaron valores entre 128 y 300 Kg N ha⁻¹ año⁻¹, mientras que Høglund et al. (1974) llegaron a estimar 740 Kg N ha⁻¹ año⁻¹. Peterson et al. (1991) y Russelle (1992) estimaron una fijación entre 70 y 400 Kg N ha⁻¹ año⁻¹, correspondiente al 33 y 83 % respectivamente, del nitrógeno total acumulado en el forraje. Estas últimas estimaciones son coincidentes con resultados obtenidos en Argentina, donde se determinó bajo condiciones de secano un aporte por FBN de 90 a 450 Kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Racca et al., 2001), que representó entre el 29 y 82% del nitrógeno total del forraje. Sin embargo, cuando el cultivo soportó un ciclo de sequía controlada de 150 días, la FBN sólo proveyó el 26% del nitrógeno (Lopez et al., 1997). En Chile

con alfalfares de uno y dos años manejados bajo riego y en andisoles sin limitaciones de fertilidad, se han reportado valores entre 255 y 670 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Campillo et al., 1995), habiéndose alcanzado al tercer año hasta 756 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Campillo y Barrientos, 1999). En Uruguay existen datos de 360 Kg N ha⁻¹ año⁻¹, fijados en alfalfares de dos años de edad (Garcia et al., 1994).

1(i). Situación Inicial. Justificación del Proyecto

1. En los sistemas agrícola-ganaderos de los tres países, la alfalfa participa en un elevado porcentaje del área de cultivo.
2. La alfalfa es un fuerte demandante de N, capaz de sustentarse a través del tiempo solo si un alto % de ese N lo toma de la atmósfera
3. Esto solo es posible si se encuentra correctamente asociada a cepas específicas de rizobios de alta eficiencia en FBN.
4. Un alto % de la semilla disponible es importada y mucha de ella viene preinoculada con cepas de rizobios de eficiencia y adaptación desconocidas en las condiciones locales.
5. Una nueva cepa que entra al ecosistema del suelo, produce nuevos equilibrios poblacionales que pueden tener consecuencias neutras, positivas o negativas.
6. No se conoce la eficiencia relativa de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que aportan los sistemas nodulares formados a partir de cepas introducidas respecto de las nativas o naturalizadas.
7. Necesidad de mejorar los bancos de germoplasma microbiano con nuevas accesiones caracterizadas por su capacidad y eficiencia en FBN y PGPR (bacterias promotoras del crecimiento vegetal).

1(ii). Objetivos y metas

Objetivos

1. Cuantificar la eficiencia relativa en la fijación de nitrógeno de sistemas nodulares formados por cepas introducidas y por cepas nativas o naturalizadas, con diferentes grados de ocupación nodular.
2. Estudiar la biodiversidad en poblaciones de rizobios nativos o naturalizados y seleccionar las mejores cepas en diferentes regiones de los países que componen el Proyecto.
3. Caracterizar y seleccionar bacterias PGPR y NPR, que solas o co-inoculadas con rizobios mejoren la productividad de la alfalfa.
4. Generar criterios normativos para el uso de microorganismos rizosféricos que participan en la sustentabilidad del cultivo de alfalfa.

Metas

1. Disponer de información sobre la importancia de la fijación de nitrógeno a partir de cepas introducidas con los inoculantes respecto a la que se logra con las cepas nativas o naturalizadas.
2. Disponer de una colección de cepas de rizobios identificadas por su eficiencia que sea representativa de las distintas regiones involucradas en el Proyecto.
3. Disponer de cepas PGPR eficientes para la producción de inoculantes.

1(iii). Metodologías Utilizadas

Para la evaluación de la eficiencia relativa de las cepas introducidas en inoculantes se implantaron dos ensayos denominados “Ensayos Núcleos” (EN) en cada uno de los países intervinientes según el protocolo previamente establecido. Los EN involucraron parcelas de alfalfa inoculada y no inoculada y parcelas de un cultivo de referencia no fijador para la determinación de FBN mediante la técnica de ^{15}N . Los EN de Argentina se implantaron en Balcarce y Manfredi, los dos de Uruguay en Punta Espinillo (I y II) y los de Chile en Gorbea y Pitrufquén.

En cada corte de forraje y durante tres ciclos de cultivo, se determinó: i) rendimiento de materia seca, ii) contenido de nitrógeno en el forraje y iii) proporción de nitrógeno derivado de la atmósfera, iv) grado de ocupación nodular (en muestreos de primavera y otoño), v) contenido de humedad del suelo (en primavera). Todos los suelos fueron caracterizados previamente respecto a variables edáficas y al tamaño de la población de rizobios pre-existentes.

Complementario a los EN, se realizó una colección de cepas de rizobios nativos a través de muestreos regionales para determinar biodiversidad. El muestreo se realizó en localidades con y sin limitantes edafoclimáticas de cada uno de tres los países. Los aislamientos de bacterias fueron conservados, identificados y caracterizados tanto genotípicamente como en cuanto a su capacidad de fijación biológica de nitrógeno en etapas sucesivas de laboratorio e invernáculo.

También se colectaron otros aislamientos obtenidos de la rizósfera de cultivos de alfalfa de los tres países para la identificación de cepas promotoras del crecimiento de nódulos y/o plantas. El análisis de la capacidad PGPR/NPR se realizó mediante caracterización morfológica, respuesta bioquímica y ensayos de coinoculación sobre plantas de alfalfa.

El intercambio de experiencias entre los profesionales participantes se realizó permanentemente a través de la coordinación y de encuentros anuales de monitoreo en el que participaron todos los investigadores principales responsables de cada acción. La responsabilidad de los distintos grupos de investigación fue procesar todas las muestras de todos los ensayos según su especialidad, i.e. aspectos de producción de forraje, edáficos, microbiológicos, de fijación biológica de nitrógeno, de stress hídrico, de identificación de cepas, de caracterización genética, de evaluación de eficiencia como material biológico para la producción de inoculante.

1 (iv). Resultados Obtenidos

La población de rizobios específicos existentes en el suelo antes de la siembra, permitió clasificar a los suelos en tres grandes grupos: 1) suelos con abundante población de rizobios, con 10^3 o más rizobios/gr de suelo, y que poseen, en general, un pH comprendido entre 6,5 y 7,5 (Manfredi), 2) suelos con escasa población de rizobios, con niveles microbianos comprendidos entre 10^1 - 10^2 rizobios/gr de suelo, que generalmente poseen pH entre 6,5 y 5,8 (Chile y Balcarce) y 3) suelos con población de rizobios no detectable, con pH inferiores a 5,8 (Uruguay). Por otro lado, y a lo largo de los tres años de ensayos, se comprobó que cepas infectivas de *Sinorizobium* estuvieron presentes en todas las localidades de Argentina y Chile. Existió una relación bastante marcada entre respuesta a la inoculación y presencia/ausencia de microflora pre-existente: En suelos del grupo 3 la respuesta es muy notable, es menos evidente en las del grupo 2 y no detectable en la del grupo 1.

Respecto a la producción de forraje, medido en $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el cultivo inoculado y el no inoculado en los EN de Uruguay, Balcarce y en la última campaña de Gorbea. De las estimaciones realizadas hasta el presente para FBN surge que: 1) en Uruguay el 70% de Nitrógeno Total incorporado por el cultivo proviene de FB, 2) en Argentina ambos EN arrojaron valores similares entre sí, con un promedio de porcentaje de Nitrógeno derivado de la FB de 69% correspondiente a más $240 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de Nitrógeno, 3) en Chile, con suelos mucho más ricos en materia orgánica, los porcentajes de fijación cayeron a un 18% (promedio de ambos EN).

Se concluyó que las diferencias en producción de forraje entre el cultivo inoculado y no inoculado se evidencian solo cuando: 1) la población de rizobios pre-existente en el suelo es baja (ej. Uruguay, Balcarce), 2) hay baja disponibilidad de materia orgánica en suelo (ej, Uruguay) o 3) no hay otro factor limitante.

Respecto a la meta de colección de cepas, se observó que de 100 aislamientos provenientes de Argentina, 74 de Chile y 23 de Uruguay, y

tras las pruebas de infectividad (Burton) y eficiencia (MS), 8 de los provenientes de Argentina, fueron mas eficientes que la cepa testigo utilizada (B399); 10 de los provenientes de Chile también superaron a su respectivo testigo en tanto que dos se mostraron como ineficientes o parasitarias. De los aislamientos provenientes de Uruguay, algunos superaron ampliamente la cepa comercial (U143), y otros fueron ineficientes o parasitarias. Utilizando las técnicas moleculares ajustadas durante el primer año del Proyecto, se está estudiando la diversidad molecular de las cepas que fueron seleccionadas desde estos ensayos. Tendiente a la obtención de cepas PGPR eficientes para la producción de inoculantes, se caracterizaron morfológicamente más de 1000 cepas de las cuales se seleccionaron 400 para ensayos bioquímicos consistentes de 6 pruebas para evaluar características PGPR (Solubilización de Fósforo, de Hierro, Hidrólisis de Almidón, Producción de Exopolisacáridos, Biocontrol de *M. phaseolina* y *Rhizoctonia spp*). Se estudiaron las asociaciones entre características PGPR para cada conjunto de cepas definido según el país y el origen del suelo desde donde se aislaron (suelo de presiembra, de postsiembra o suelo del último muestreo primaveral y otoñal). En los muestreos de presiembra se detectó alto consenso en las asociaciones entre características PGPR a través de los grupos de cepas. Las solubilizadoras no fueron, en general, controladores biológicos. El control estuvo asociado con la producción de exopolisacaridos. En Chile predominaron las bacterias solubilizadoras de fósforo, excepto en muestras otoñales donde los niveles de fósforo fueron altos. Se detectó una población baja de biocontroladoras y cepas con mayor captación de hierro. Mientras que en Argentina y Uruguay hubo mayor proporción de bacterias con actividad antifúngica. Se clasificaron todas las cepas recolectadas según el número de pruebas PGPR positivas. Una decena de cepas con 5 características PGPR positivas, fueron evaluadas en ensayos de laboratorio que incluyeron inoculaciones simples de semillas de alfalfa con estas cepas, inoculaciones dobles (la cepa PGPR seleccionada + el rizobio nodulante B399) y controles (control Agua y control Nitrógeno). El análisis de los pesos secos de parte área y radicular a los 45 días de

ensayo, demostró una clara ventaja de la coinoculación de B399 con la mayoría de las cepas PGPR seleccionadas. La mejor respuesta se obtuvo con una bacteria PGPR seleccionada de suelo rizosférico Chileno.

1 (v). Medidas en que se lograron los objetivos

Los objetivos específicos planteados fueron ejecutados en un 100% respecto a las tareas de campo, faltando aún la concreción del análisis de muestras para determinar FBN mediante la técnica de ^{15}N . Las actividades no se ejecutaron completamente por razones ajenas a los investigadores involucrados, sino por cambios que se produjeron debido a la falla de equipos específicos de alta tecnología. (Ver nota adjunta). No obstante del proyecto se han derivado productos que ya están siendo difundidos en el medio productivo.

1 (vi). Nuevos conocimientos y tecnologías desarrolladas

Luego de los análisis realizados en el marco del proyecto, se concluye que:

- 1) la nodulación inicial total (% de plantas noduladas) fue mayor en suelos con alto contenido de Ca y pH cercanos a la neutralidad.
- 2) en suelos con pH inferior a 6 solo presentan nódulos aquellos que poseen altos niveles de Ca.
- 3) altos niveles de material orgánica (MO) en el suelo (mayores a 5%), no impiden la nodulación pero limitan su expresión.
- 4) a niveles de producción de MS altos (superiores a 25 tn/ha.año), esos mismos niveles de MO no limitan la expresión nodular, mostrando la importancia del balance del N en si mismo.
- 5) con el avance de la ontogenia del cultivo la ocupancia nodular se inclina a favor de las cepas naturalizadas, excepto en los ensayos de Uruguay.
- 6) respecto a las cepas PGPR se observa que en Uruguay y Chile, prevalecen las solubilizadoras de P, en tanto las predominantes en Argentina son las de acción biocontroladora.

El proyecto proveyó del marco necesario para el desarrollo de nuevas tecnologías:

- Obtención de una colección de cepas tanto nodulantes como PGPR para mejorar la eficiencia en la FBN en alfalfa.
- Para el manejo del cultivo.
- Para la investigación de alto nivel científico en FBN (productos para la implementación de pruebas de competencia a nivel molecular).

1 (vii). Impactos logrados

El conocimiento desarrollado hasta el momento ha sido difundido a través de **publicaciones en revistas científicas y congresos** (ver ítem 3.2). **Charla a productores en “días de campo”**, y se está preparando una **Publicación Técnica** para ser difundida en los tres países miembro del consorcio.

Numerosos resultados generados por el proyecto han sido presentados en la **XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología** que, con el **auspicio de Fontagro, CyTED, CONICET e INTA**, ha sido realizado en Córdoba del 25 al 29 de marzo del presente año (ver www.relar.com.ar).

1 (viii) Restricciones y limitantes para el desarrollo del proyecto

Existieron dos restricciones importantes para el desarrollo normal del Proyecto: 1) las fallas en los equipos para la determinación de ^{15}N (espectrómetro de masas y emisión), que provocó atraso en los análisis de las muestras 2) los continuos inconvenientes aduaneros que se tuvieron con la remisión de muestras entre los países, a pesar de los trámites formales que se hicieron al respecto. Este es un aspecto que debería solucionarse para mejorar la performance de estos proyectos consociados.

2. METODOLOGÍAS UTILIZADAS

Evaluación de la eficiencia relativa de las cepas introducidas:

En cada uno de los países intervinientes se seleccionaron dos regiones agroecológicas diferentes, en donde se implantaron ensayos idénticos denominados “Ensayos Núcleos” (EN). En todos ellos se efectuó control previo de malezas combinando el laboreo mecánico con herbicidas de presembrado (trifluralina al 60%: 1.5 l pc ha⁻¹). En caso de ser necesario y de acuerdo a los resultados de análisis previos de suelo, se ajustó la fertilidad de manera de eliminar limitantes nutricionales no deseables. Se prestó especial atención al contenido de P para que los suelos del ensayo no tuviesen menos de 25 ppm.

Los ensayos principales se diseñaron en bloques completos al azar con dos tratamientos (inoculado y no inoculado) y cuatro repeticiones por tratamiento. Cada una de las parcelas tuvo una dimensión de 6 m de ancho por 14 m de largo. La distancia entre bloques fue de 1 m; cada parcela, dentro del bloque, se separó 3 m de la contigua. Los cultivares elegidos fueron los más difundidos de cada país. En Argentina se utilizó *Bárbara SP-INTA*, en Uruguay *Chaná* y en Chile *A.C.Baldrich 350* sembradas a una distancia de 20 cm entre líneas y una densidad promedio de 11 kg.ha⁻¹.

Los tratamientos fueron: i) inoculado con una cepa de *Sinorhizobium meliloti* seleccionada, eventualmente diferente para cada país. Argentina y Chile utilizaron la B399 y Uruguay la U143, y ii) control no inoculado. Complementariamente se implantaron cuatro parcelas de achicoria para ser utilizadas como cultivo de referencia no fijador, requeridas para la técnica de dilución isotópica del ¹⁵N (Rennie et al., 1978). Las cepas usadas para la inoculación fueron previamente marcadas por resistencia a antibióticos (con 500 mg de spectinomicina y 500 mg de streptomina) para permitir la diferenciación del origen (nativo o introducido) de los rizobios responsables de la nodulación. En Uruguay y Manfredi, donde no se marcaron las cepas, el GON se realizó por perfiles de enzimas metabólicas o electroforesis de isoenzimas.

Durante el ensayo, para cada corte de forraje y durante tres ciclos de cultivo, se determinó: *i*) el rendimiento de materia seca, *ii*) contenido de nitrógeno en el forraje y *iii*) proporción de nitrógeno derivado de la atmósfera por la técnica de dilución isotópica del ^{15}N . En algunos momentos se determinó también: *iv*) población inicial de rizobios nativos en suelos, *v*) grado de ocupación nodular (en muestreos de primavera y otoño), *vi*) contenido de humedad del suelo (en primavera).

El rendimiento de materia seca, se obtuvo por cortes realizados cuando las plantas alcanzaron un 10% de floración o los rebrotes tuvieron 5 cm de altura. El forraje cosechado en la muestra, fue secado en estufa a 65 °C hasta peso constante.

Sobre este mismo material se evaluó el contenido total de nitrógeno por Kjeldhal y la eficiencia del sistema de FBN se determinó mediante la técnica del valor A con ^{15}N (los datos de los últimos cortes se encuentran aún en procesamiento). Para estimar la fijación por este método fue necesario aplicar ^{15}N en microparcels de 0.5 m² definidas dentro de cada parcela del ensayo. El sitio de aplicación nunca fue repetido dentro de la parcela en la misma temporada.

Para la determinación de la población inicial de microorganismos en suelo se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP) (Vincent, 1975). A partir de muestra tomadas antes de la implantación de los EN, en estratos de 20 cm, a profundidades de cero a 120 cm, siempre y cuando las condiciones estructurales del suelo lo permitiesen.

El grado de ocupación nodular se evaluó en muestras de nódulos obtenidas de calicatas realizadas en tres de las cuatro repeticiones de cada tratamiento en dos muestreos anuales (primavera y otoño), y a tres niveles de profundidad (0-40, 40-90 y 90-150 cm). Las calicatas se excavaron sobre el borde de 14 m de la parcela (paralelo a la línea de siembra), exponiendo el sistema radicular completo. Se consideró una cara de 1 m de ancho por 1.50 m de profundidad (o hasta donde llegue el sistema radicular) como zona de medición. En cada calicata, 0.5 m del frente expuesto se destinó a la colección de nódulos, dejando los restantes 0.5 m para la obtención de las muestras de suelo rizosférico para posteriores determinaciones de presencia/ausencia de organismos

PGPR y NPR (ver protocolo específico). Durante la colección de nódulos en cada estrato se tomaron todos los nódulos visibles en un espesor máximo de 10 cm de suelo hacia el interior de la parcela. Los nódulos obtenidos fueron colocados en frascos con silicagel o Cl_2 Ca hasta ser procesados. Para la determinación del grado de ocupación nodular se utilizaron las técnicas de resistencia a antibiótico o electroforesis de isoenzimas, según se dispusiese o no de cepas marcadas.

Para monitorear el consumo de agua del cultivo, se determinó el contenido hídrico del perfil del suelo, por sonda de neutrones o gravimetría, hasta 3 m de profundidad, en capas de 20 cm, al momento de la siembra. Complementariamente se caracterizó el límite superior e inferior de agua y la Densidad Aparente (*DA*) de cada uno de los horizontes de suelo para así determinar Agua Útil (*AU*). El contenido de humedad del suelo se midió al inicio del ensayo y una vez por año en cada primavera. Para el análisis de posibles limitantes hídricas, se estimó Grado de Satisfacción Hídrica del cultivo (*GSH*) como el cociente entre el consumo observado y el consumo potencial, y Eficiencia del Uso del Agua (*EUA*= Producción de materia seca / mm consumidos).

Colección, caracterización y selección de cepas de rizobios nativos o naturalizados:

A través de un muestreo regional realizado en cada uno de los países iparticipantes en el proyecto, se conformó una colección de nódulos provenientes de ambientes sin limitantes edafoclimáticas tanto como de ambientes con algunas características adversas para el cultivo y su sistema de FBN, (suelos ácidos, con bajos niveles de P, alto niveles de Al y Mn). La selección de sitios con características adversas se basó en el conocimiento previo existente en cada uno de los países intervinientes.

En todos los casos, se realizaron aislamientos de las cepas provenientes de las colecciones a campo de estos ambientes con limitantes edafoclimáticas. También se recolectó material desde los EN donde habían sido corregidas las principales limitantes edáficas. Los

aislamientos de bacterias fueron conservados mediante técnicas de criopreservación. Los datos de localización de los suelos y el origen de las muestras, fueron organizados en base de datos georeferenciadas.

Posteriormente, se realizó la identificación de los aislamientos de la colección y la caracterización genotípica de la biodiversidad bacteriana que representan. La identificación se realizó empleando marcadores apropiados de resistencia a antibióticos, o mediante el uso del gen de la proteína verde fluorescente GFP (Pistorio *et al.*, 2002). También se usaron, geles de isoenzimas (Grassano *et al.*, 1996). La caracterización se efectuó mediante: i) Perfiles de plásmidos por la técnica de lisis in situ, y ii) Fingerprinting de ADN por técnicas de PCR empleando primers conservados en genomas de bacterias: ERIC, REP, MBOREP y BOX (Versalovic *et al.*, 1991). Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de conglomerados para información molecular a los efectos de definir las relaciones de parentesco entre las cepas y su identidad.

La selección de las mejores cepas se realizó evaluando la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de los aislamientos en etapas sucesivas de laboratorio e invernáculo. En laboratorio, se analizó también el crecimiento de los aislamientos según diferentes valores de pH, su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno, y la competitividad de los mismos para la ocupación de nódulos radicales. La metodología para el manejo de plantas en ensayos de nodulación y competición se realizó según Del Papa *et al.*, 1999 y Segundo *et al.*, 1999.

Colección y selección de cepas con efecto PGPR y NPR

Se colectaron cepas a partir de aislamientos obtenidos de la rizósfera de cultivos de alfalfa, haciéndolas crecer en medios específicos para evaluar su capacidad como promotora del crecimiento de nódulos y/o plantas. Se analizaron muestras provenientes de los 3 países que, según una caracterización morfológica previa, permitieron separar más de 1000 cepas. De éstas se seleccionaron 400 para ensayos bioquímicos realizados a partir de 6 pruebas: Producción de sideróforos, Solubilización de Fósforo, de Hierro, Hidrólisis de Almidón, Producción de Exopolisacáridos y Biocontrol de *M. phaseolina* y *Rhizoctonia spp.*

Las cepas rizosféricas seleccionadas como promisorias, a partir de los ensayos bioquímicos, se ensayaron en invernáculo a fin de evaluar combinación rizobacterias/planta en función del preso fresco aéreo y radicular de las plantas inoculadas. Para este ensayo se seleccionaron cepas que habían manifestado en las pruebas bioquímicas al menos cinco características PGPR positivas. Estas cepas se usaron en inoculaciones simples y en inoculaciones dobles (la cepa PGPR seleccionada + el rizobio nodulante B399) de semillas de alfalfa. Además se incorporaron al ensayo dos tipos de controles (control Agua y control Nitrógeno). Se cuantificaron los pesos secos de parte área y radical semanalmente y hasta los 45 días de iniciado el ensayo.

En la Figura 1 se presentan fotos de EN relacionados a la meta 1 del presente proyecto y en la Figura 2 y 3 esquemas de las estrategias de intervención utilizadas para las meta 2 y 3.



Figura 1. Ensayos núcleo de Argentina, Chile y Uruguay.

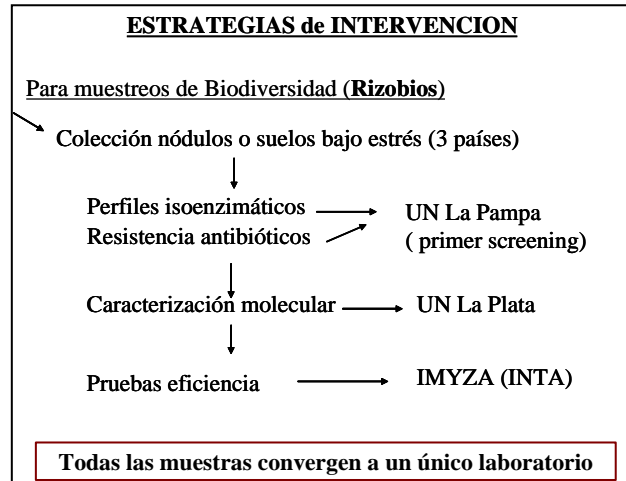


Figura 2. Estrategias de intervención utilizadas en la meta 2.

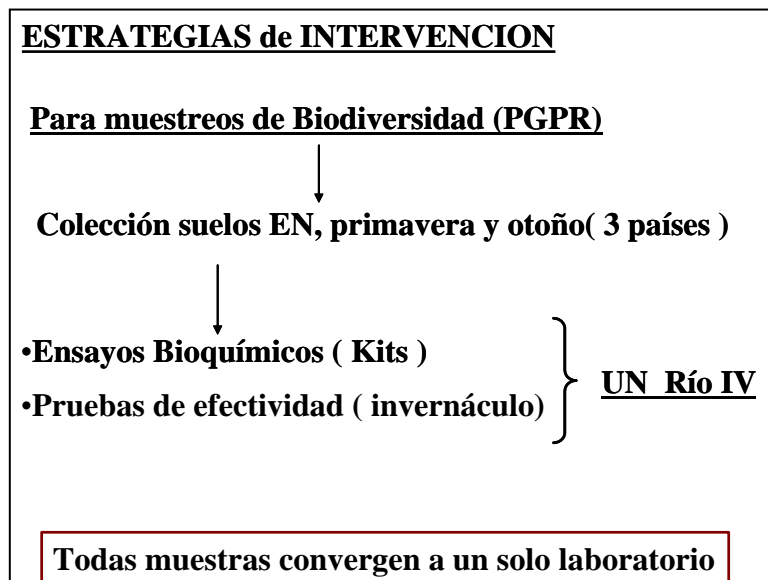


Figura 3. Estrategias de intervención utilizadas en la meta 3.

3. RESULTADOS OBTENIDOS

3. 1. Principales Resultados Técnicos

De Meta 1: Evaluación de la eficiencia relativa de las cepas introducidas

Los seis *EN* cumplieron su ciclo (tercero en Argentina y Uruguay y segundo en Chile). En Argentina y en Uruguay se dispone de bases de datos completas de rendimiento en forraje de las temporadas 2003-2004, 2004-2005 y 2005-2006 y en Chile de las temporadas 2004-2005 y 2005-2006. En la Figuras 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan los datos estadísticos referidos a la producción de forraje en cada país.

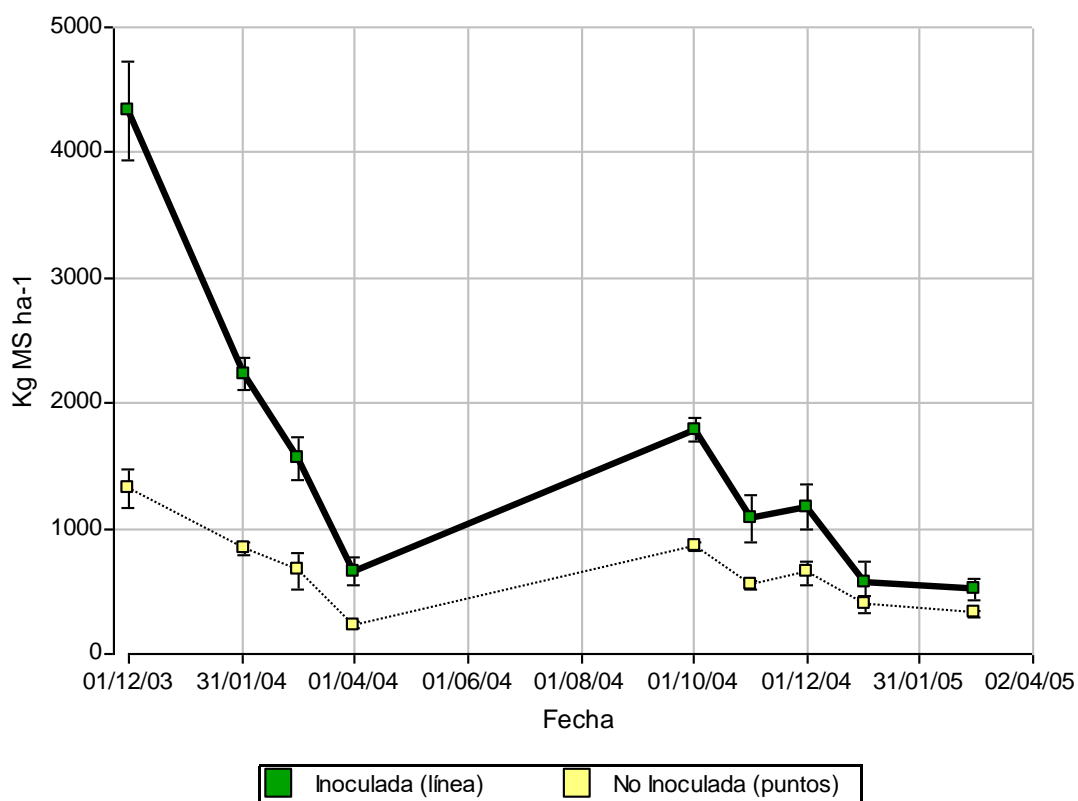


Figura 4. Producción de forraje / corte en Argentina (Balcarce) en cultivos inoculados y no inoculados.

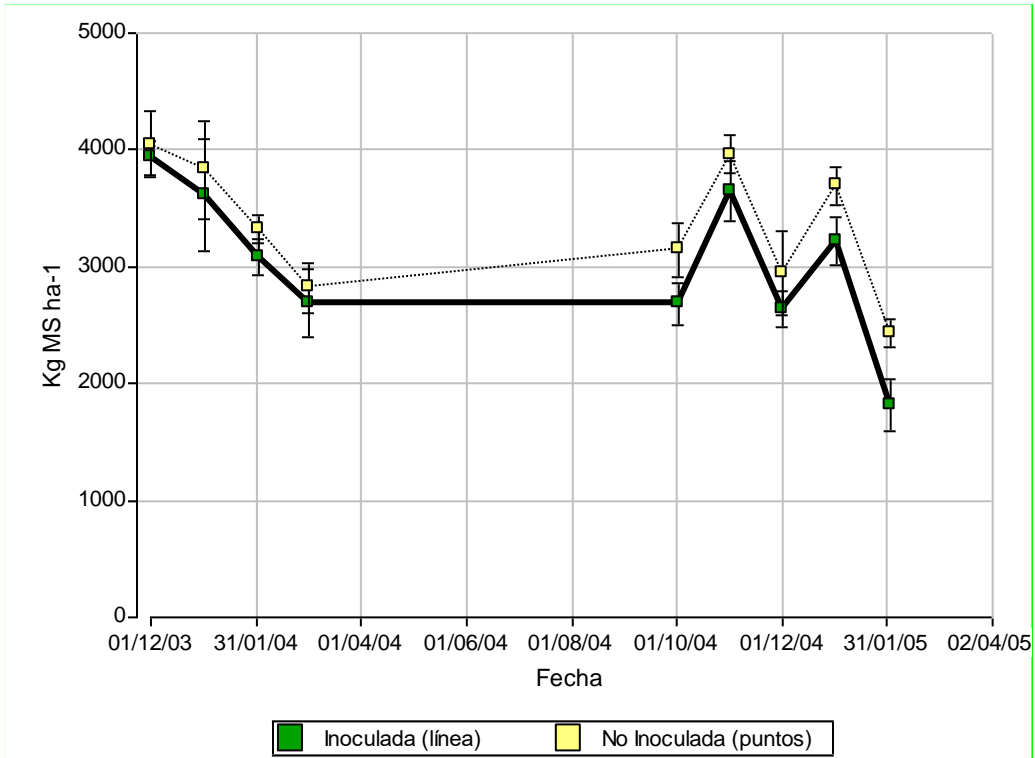


Figura 5. Producción de forraje/ corte en Argentina (Manfredi) cultivos inoculados y no inoculados.

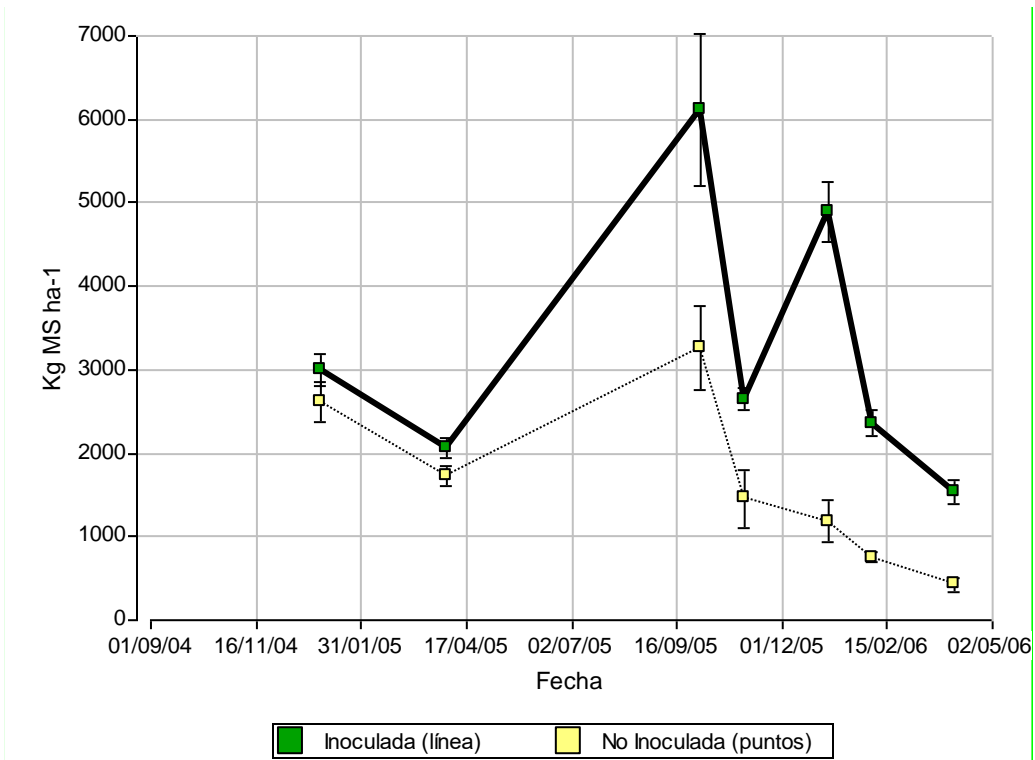


Figura 6. Producción de forraje en Chile (Gorbea).

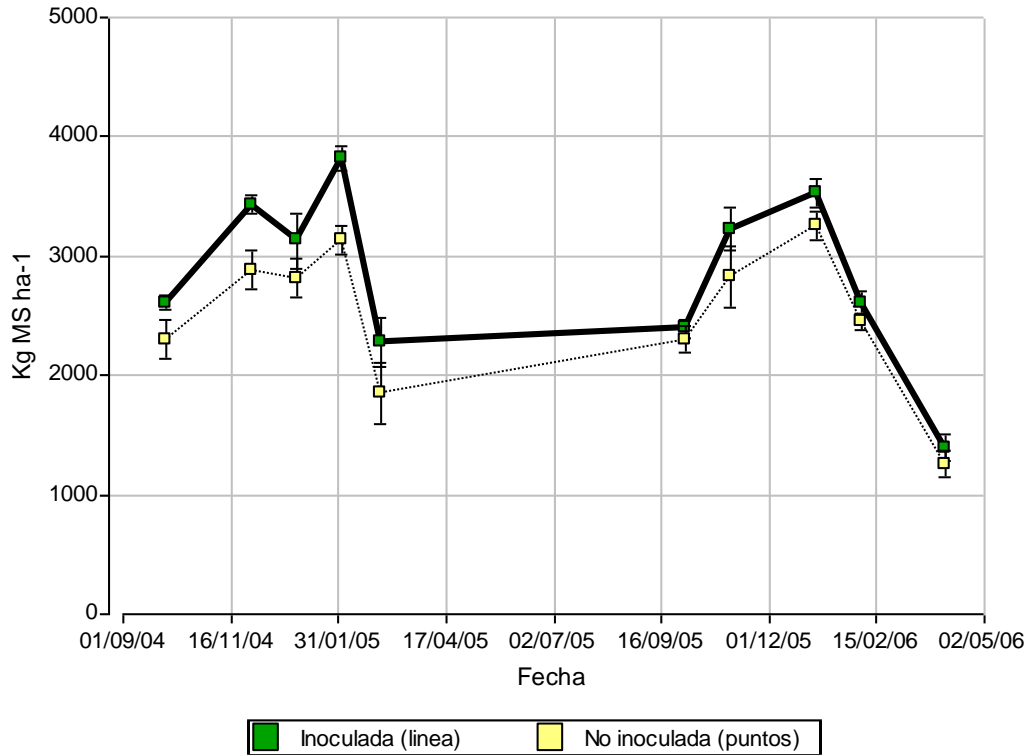


Figura 7. Producción de forraje en Chile (Pitrufquen).

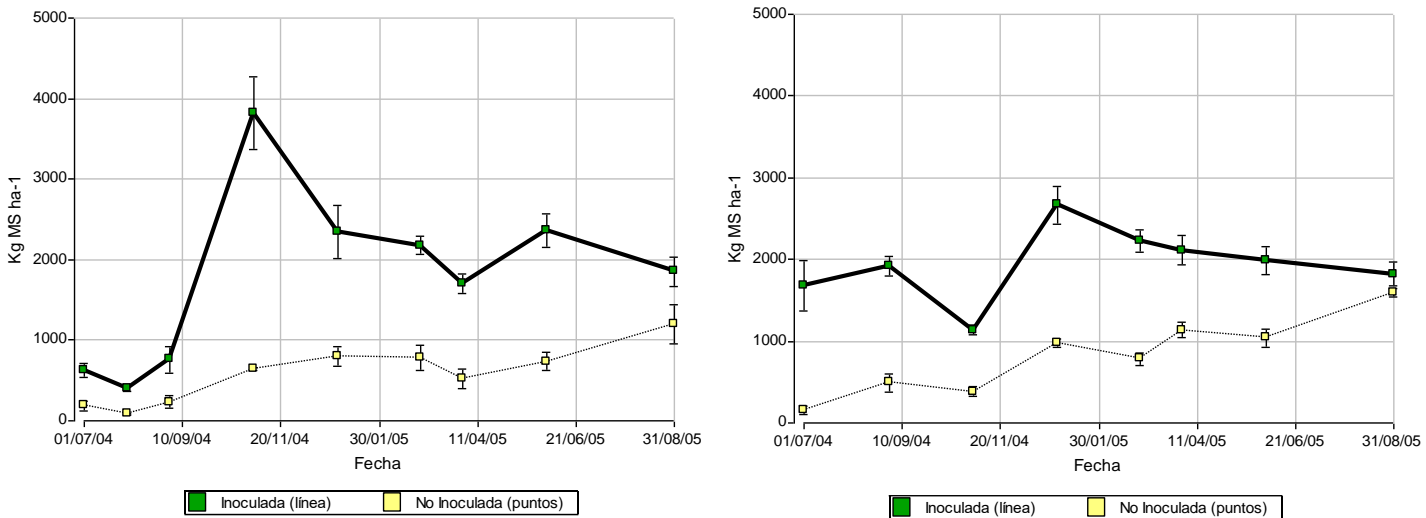


Figura 8. Producción de forraje en Uruguay (Punta Espinillo I y II).

Respecto a la producción de forraje, medido en $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el cultivo inoculado y el no inoculado en los EN de Uruguay, Balcarce, Gorbea y en el primer ciclo de Pitrufquen.

Las muestras para estimación de FBN de los EN de Argentina y Chile, adecuadamente conservadas, fueron enviadas a la Facultad de

Agronomía de la Universidad de la República en Montevideo, Uruguay, actualmente en proceso. De las muestras de Argentina faltan análisis de FBN de los cortes realizados en la campaña 2005-2006, por lo que se analizó el perfil completo de las dos primeras temporadas. También fueron procesadas las muestras de la campaña 2004-2005 de Uruguay y de Chile. Cuando sea posible obtener los datos de FBN en las muestras que esperan ser procesadas se podrá realizar un análisis completo de la evolución temporal de la FBN de acuerdo a la ontogenia del cultivo y a los cambios progresivos de la flora rizobial a través del tiempo. El dato de FBN es crucial para poder realizar un estudio multivariado que, combinando datos de fijación con datos de características de suelo y clima de los EN, permita identificar los principales limitantes de la fijación biológica. Los resultados de FBN obtenidos hasta el momento fueron procesados estadísticamente.

De las estimaciones realizadas hasta el presente surge que: 1) en Uruguay un 70% de Nitrógeno Total incorporado por el cultivo proviene de FB, 2) en Argentina ambos EN arrojaron valores similares entre sí, con un promedio de porcentaje de Nitrógeno derivado de la FB de 69% correspondiente a más 240 Kg.ha⁻¹ de Nitrógeno, 3) en Chile, con suelos muchos más ricos en materia orgánica, los porcentajes de fijación cayeron a un 18% (promedio de ambos EN) pero siempre manteniendo una diferencia significativa a favor del tratamiento inoculado (Fig 12).

Las gráficas de la evolución de Nitrógeno derivado de la atmósfera para los ensayos núcleos de Argentina se presentan en la Figuras 9 y 10. Se compararon mediante modelos de ANAVA las diferencias entre el cultivo inoculado y sin inocular tanto a nivel de los porcentajes de nitrógenos derivados del suelo y de la atmósfera como a nivel de los Kg.ha⁻¹ de Nitrógeno fijado. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en Balcarce (P<0.0001) pero no en Manfredi.

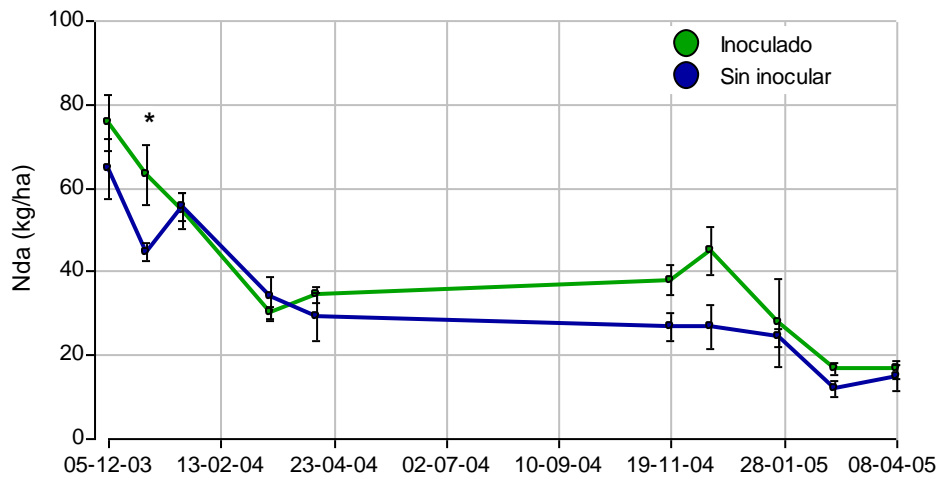


Figura 9. Nitrógeno derivado de la atmósfera en el EN de Manfredi

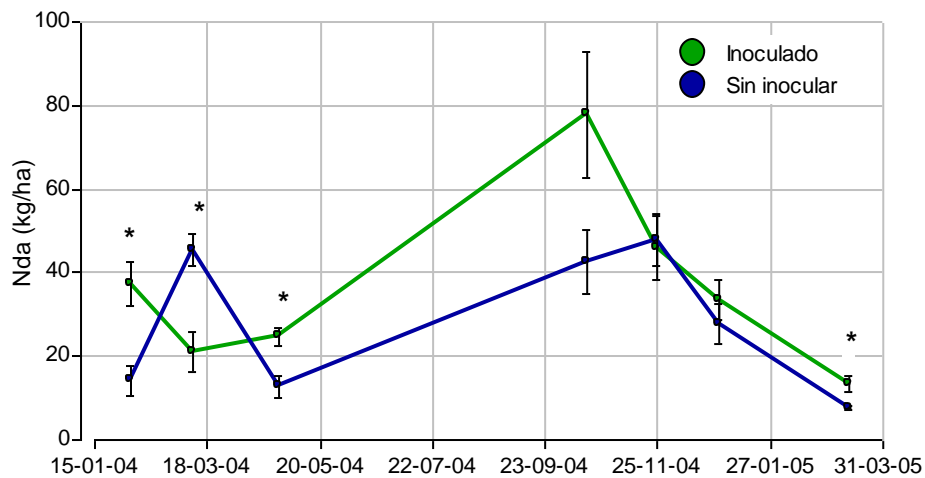


Figura 10. Nitrógeno derivado de la atmósfera en el EN de Balcarce

Los resultados en Uruguay indicaron un alto porcentaje de FBN, en ambos EN, donde la población inicial de rizobios ya establecida antes del cultivo fue no detectable. La Figura 11 presenta los porcentajes de FBN en ambos EN.

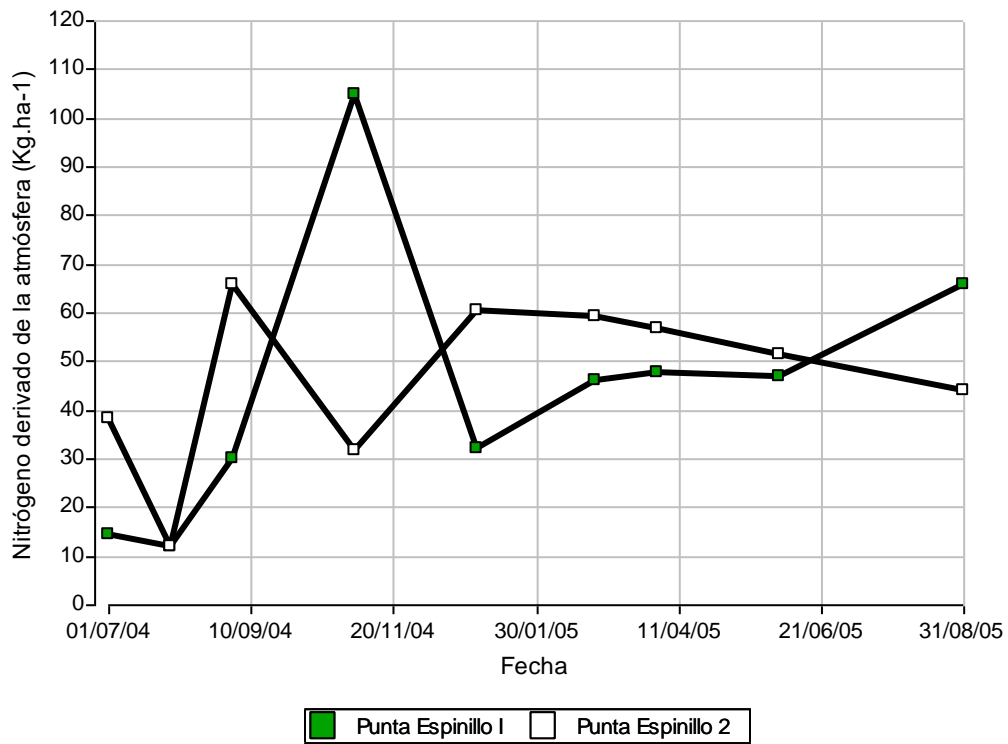


Figura 11. FBN en Uruguay (Punta Espinillo 1 y Punta Espinillo 2).

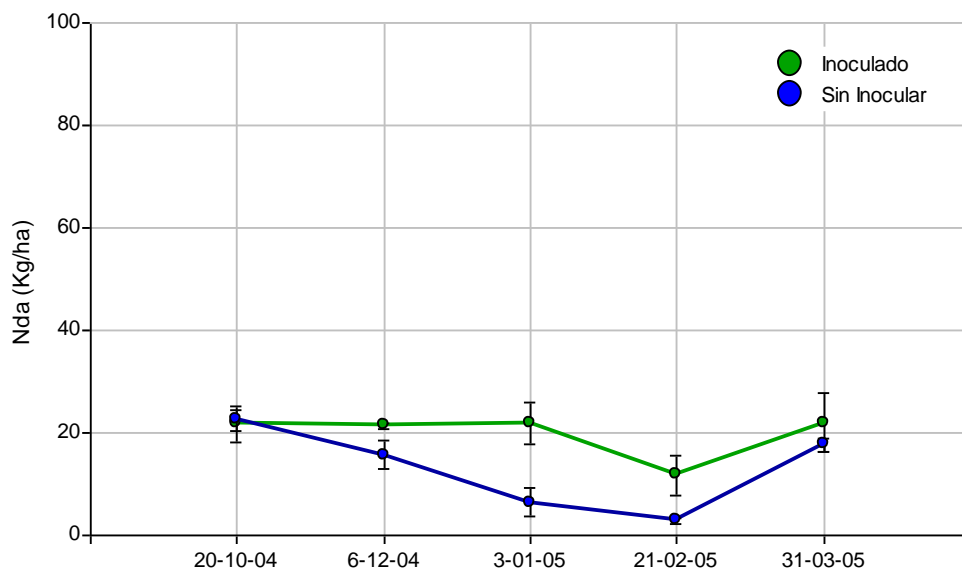


Figura 12. FBN en Chile (Pitrufquen).

En la figura 12 se muestra el nitrógeno derivado de la atmósfera (kg/ha) para Pitrufquen (Chile) en alfalfa inoculada y sin inocular.

Desde muestras de suelos donde se determinó NMP, se concluyó que los suelos de Uruguay y de Balcarce eran pobres en rizobios nativos al momento de siembra, mientras que en Manfredi se registraron hasta un orden de 10^3 (en superficie) y de 10^5 (a mayor profundidad) rizobios/gr. En Chile también se registraron niveles de un orden de 10^3 UFC/gr de suelo.

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de ocupación nodular de la cepa introducida con el inoculante a distintas profundidades, para distintos muestreo realizado a lo largo del periodo del proyecto. En la localidad de Balcarce sólo se muestrearon nódulos hasta 60 cm como consecuencia de la existencia de un horizonte petrocálcico, que impide el crecimiento de raíces a mayor profundidad.

Tabla 1. Grado de ocupación nodular en % de rizobios provenientes del inoculante en muestras de nódulos de los ensayos núcleos.

País	Localidad	Profundidad	Fecha de muestreo	Total		
Argentina	Balcarce	0-40	Otoño 04	44		
			Otoño 05	46		
			Otoño 06	50		
			Primavera 03	45		
			Primavera 04	0		
			Primavera 05	50		
	Balcarce	40-60	Otoño 05	56		
			Otoño 06	67		
			Primavera 05	55		
			Manfredi	0-40	Otoño 03	53
					Otoño 04	48
					Otoño 05	56
	Primavera 03	37				
	Primavera 04	46				
	Primavera 05	47				
Manfredi	40-90	Otoño 03	72			
		Otoño 04	60			
		Otoño 05	40			
		Primavera 03	47			
		Primavera 04	52			
		Primavera 05	38			
Manfredi	90-150	Otoño 03	50			
		Otoño 04	50			
		Otoño 05	36			
		Primavera 03	70			
		Primavera 04	59			
		Primavera 05	39			
Chile	Pitrufquen	0-40	Otoño 05	62		
			Otoño 06	50		
			Primavera 04	75		
	Pitrufquen	40-90	Otoño 06	56		
			Otoño 06	57		
			Gorbea	0-40	Otoño 05	66
Otoño 06	56					
Primavera 05	58					
Gorbea	40-90	Otoño 06	67			
		Uruguay	Punta Espinillo I	0-40	Otoño 04	59
					Otoño 05	41
Otoño 06	58					
Primavera 03	75					
Primavera 04	57					
Primavera 05	44					
Punta Espinillo I	40-90	Otoño 04	56			
		Otoño 05	63			
		Otoño 06	45			
		Primavera 04	75			
		Primavera 05	58			
		Punta Espinillo II	0-40	Otoño 04	70	
Otoño 05	57					
Otoño 06	49					
Primavera 03	72					
Primavera 04	50					
Primavera 05	56					
Punta Espinillo II	40-90	Otoño 04	44			
		Otoño 05	51			
		Otoño 06	56			
		Primavera 04	64			
		Primavera 05	57			

En Manfredi, y en Uruguay (Punta Espinillo I y II) se observa un incremento en el GON de la cepa con la cual se inoculó a medida que aumenta la profundidad, en general el % de ocupación nodular fue mayor al 50%.

En todos los EN se tomaron inicialmente muestras de suelo (0-200 cm) para la determinación inicial de la humedad edáfica por el método gravimétrico. Estos datos fueron usados para determinar agua útil en el perfil. También se extrajeron muestras para la caracterización inicial de la fertilidad de suelo (0-20 y 20-40 cm). Los registros climáticos que se recopilaban de cada sitio, junto con la humedad del suelo, permitieron estimar el balance hídrico.

Se calculó el grado de satisfacción hídrica (GSH) como el porcentaje de consumo (considerando pp efectiva) del cultivo respecto al consumo de un cultivo regado (consumo potencial). Se usó como referencia el dato de consumo anual potencial de 1432 mm y para el periodo octubre-noviembre de 120 mm PRONALFA (Lopez et al, 1997). En Uruguay el GSH fue similar en ambos EN (65%) y la eficiencia de uso del agua (EUA) de 11 Kg/mm. En Argentina, se registraron dos condiciones, según existiera o no aporte de napa: sin aporte el GSH fue en promedio del 45% con una EUA de 12 Kg/mm (Balcarce y último período en Manfredi), mientras que con el aporte de napa (primer período en Manfredi) el GSH fue del 70% y la EUA de 20 Kg/mm. El balance hídrico de los EN de Chile demostró que el cultivo no se encontró bajo stress hídrico (GSH=100%) en Pitrufoquén ni durante la segunda campaña en Gorbea (en la primera campaña del EN Gorbea, el GSH fue del 50%). La EUA fue 15 kg/mm en Gorbea sin stress hídrico y 11 Kg/mm en Pitrufoquén. Los rendimientos en forraje de Pitrufoquén, que fueron menores a los de Gorbea sin limitantes de agua, se asociaron a una menor eficiencia en el uso de la radiación (80%) ocasionada por bajas temperaturas promedio en el período (12°C).

De Meta 2: Colección, caracterización y selección de cepas de rizobios nativos o naturalizados

Se determinó en cada suelo donde se realizó la colección de nódulos (o suelo a partir del cual luego se obtuvieron nódulos) el pH en agua, % de MO, % de N Total, relación C/N y fósforo asimilable. Los datos conforman una base georeferenciada para estudios de asociación entre factores limitantes y eficiencia de cepas adaptadas a diferentes nichos ecológicos.

Actualmente conservados existen: 100 aislamientos provenientes de los suelos de Argentina, 74 de Chile y 23 de Uruguay, aunque se espera tener una mayor cantidad de aislamientos de esta procedencia ya que se están procesando más muestras. Cabe mencionar como importante que de las muestras procesadas se identificaron 4 aislamientos ineficientes (parasitarios) dos provenientes de Chile y dos provenientes de Uruguay:

Los aislamientos fueron sometidos a pruebas de infectividad. Los aislamientos provenientes de Argentina y Chile fueron ordenados según su producción de materia seca, observándose que en todos los casos los rendimientos de las plantas inoculadas fueron superiores a los de las plantas testigos (no inoculadas). Los ensayos realizados con suelo de Chile permitieron identificar 10 aislamientos con rendimientos superiores a la cepa usada en el inoculante (cepa marcada). Aquellos realizados con suelos de Argentina permitieron identificar 8 aislamientos mejores a la cepa del inoculante en cuanto a la producción de materia seca de plantas. Los ensayos equivalentes realizados en Uruguay también muestran la presencia de cepas con IER superiores al de la cepa comercial. De estos aislamientos se seleccionaron aquellos que fueron igual o superaron a la cepa del inoculante respecto a su capacidad de producir nódulos. Cinco de estos aislamientos fueron analizados más exhaustivamente respecto a su eficiencia en experimentos especialmente diseñados para tal fin. Los resultados del laboratorio donde se llevan a cabo estos análisis aún deben ser procesados.

Se comenzó a caracterizar la diversidad genética de rizobios noduladores de alfalfa por métodos de PCR-fingerprint empleando

primers correspondientes a secuencias repetidas y conservadas en genomas de bacterias. Se han procesado 81 aislamientos provenientes de diversas zonas de Argentina desde donde se extrajeron muestras de nódulos. Los resultados obtenidos indican una alta variabilidad molecular entre los aislamientos procesados (Figura 13). Actualmente se están procesando aislamientos provenientes de los muestreos de biodiversidad de Chile y Uruguay.

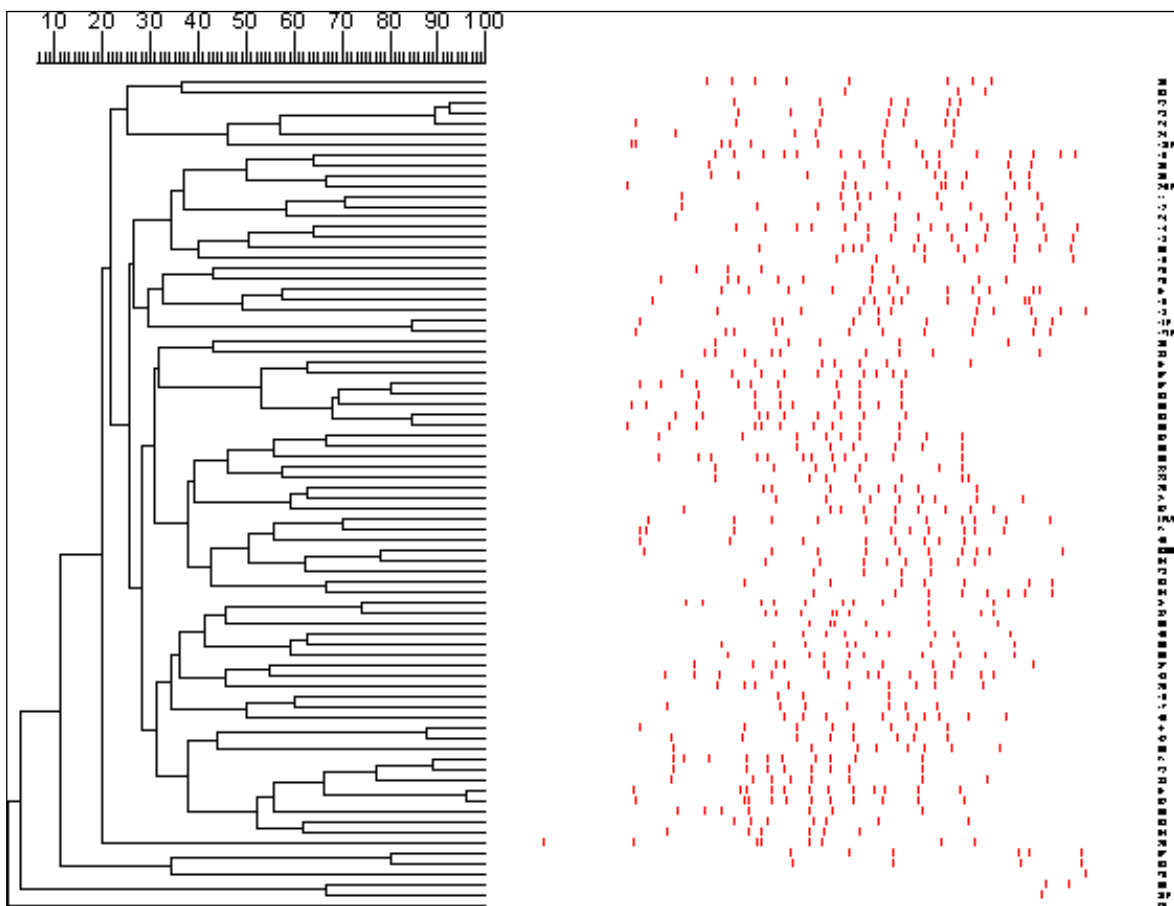


Figura 13. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados jerárquicos (UPGMA) para agrupar aislamientos.

Los aislamientos obtenidos a partir de la recolección *in situ* se utilizaron para construir un banco de germoplasma de rizobios noduladores de alfalfa. Todos ellos se encuentran conservados *ex situ* mediante criopreservación en stock glicerol a -80°C .

De Meta 3: Colección y selección de cepas con efecto PGPR

Se obtuvieron muestras de suelo rizosférico de todos los EN a partir de las cuales se obtuvieron y caracterizaron aislamientos con potencialidades como promotores del crecimiento y de buen comportamiento en co-inoculaciones con rizobios proveniente de inoculantes. Los análisis realizados permitieron comparar una serie de cepas bacterianas con características PGPR que incluyó representantes tanto de Argentina, como de Chile y de Uruguay.

Para cumplir con este objetivo se tomaron numerosas muestras de suelo rizosférico de cada EN y en distintos tiempos involucrando muestreos de pre-siembra y de post-siembra, en este último caso tanto de parcelas inoculadas como no inoculadas. Se realizó el recuento de microorganismos totales y el de cepas morfológicamente diferentes en laboratorio de microbiología y a partir de estas caracterizaciones morfológicas se seleccionaron cepas que fueron posteriormente clasificadas en grupos mediante pruebas bioquímicas. Para la caracterización bioquímica se realizaron 6 pruebas de características PGPR (Solubilización de Fósforo, de Hierro, Hidrólisis de Almidón, Producción de Exopolisacáridos, biocontrol de *M. phaseolina* y *Rhizoctonia spp*). Los representantes del grupo con mayor número de características PGPR positivas fueron evaluadas en pruebas de competencia y caracterizadas molecularmente.

En el total de muestreos se obtuvieron más de 1000 aislamientos bacterianos, de los cuales se seleccionaron unas 200 cepas con características morfológicas diferentes que fueron principalmente Gram positivas y que mostraron alta frecuencia de cepas solubilizadoras de fósforo, productoras de sideróforos y capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Se estudiaron las asociaciones entre características PGPR para cada conjunto de cepas definido según el país y el origen del suelo desde donde se aislaron mediante análisis estadístico multivariado. Se detectó alto consenso en las asociaciones entre características PGPR independientemente de la procedencia del suelo y del momento del muestreo (Fig. 14). Observar que en los planos de representación

(Análisis Procrustes generalizado en base a coordenadas principales) las pruebas de solubilización, ya sea de fósforo (S.P.) o de hierro (S.Fe) se oponen a las de control biológico de hongos (M.p. y R. spp.) y a la producción de exopolisacáridos (P.Ex.), lo que sugiere que las cepas bacterianas solubilizadoras (con pruebas S-p y S. Fe positivas) no fueron en general, las que presentaban características de control biológico de hongos ni producción de exopolisacáridos. Se puede observar también que el control biológico estuvo asociado con la producción de exopolisacáridos.

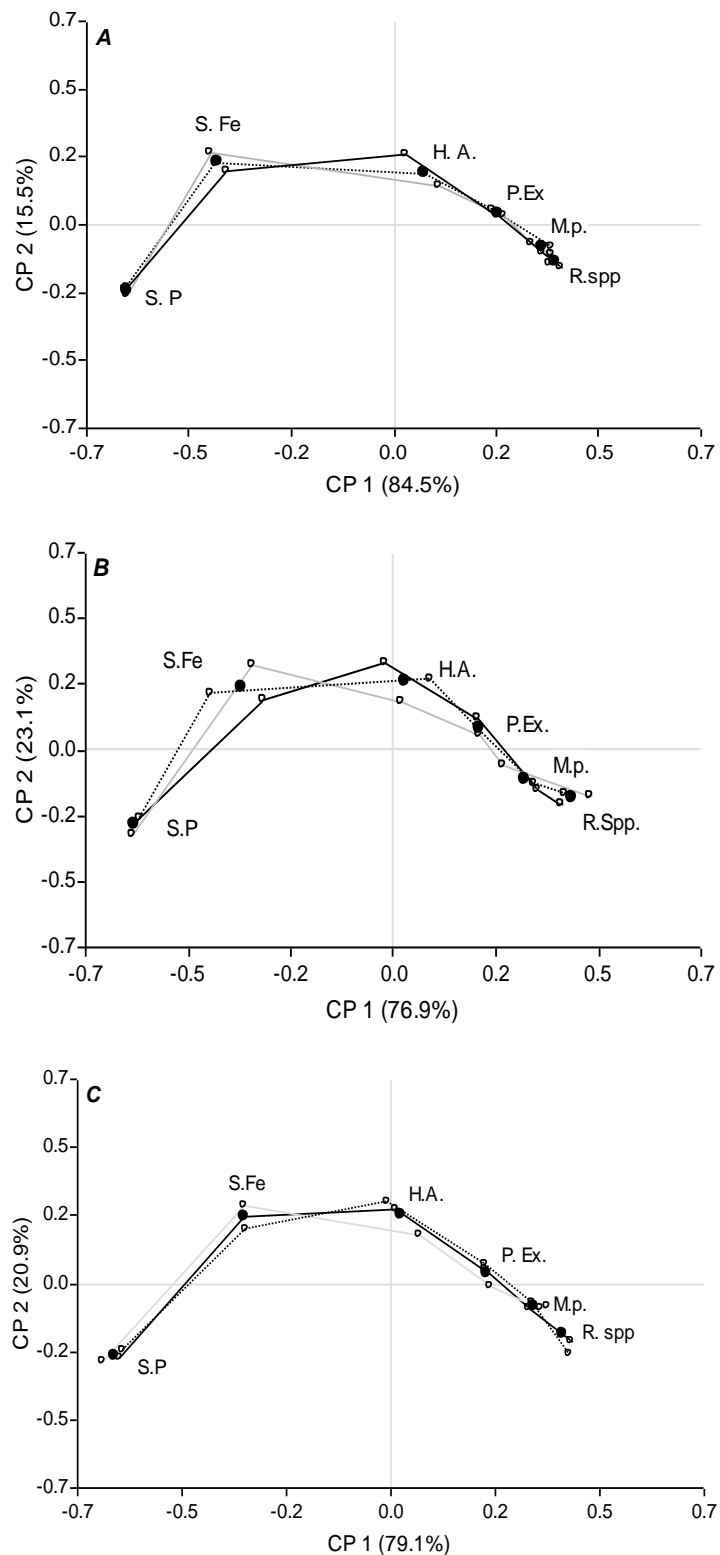


Fig.14. Ordenamientos de las pruebas PGPR para 3 conjuntos de aislamientos (presiembrado: línea clara; testigo: línea de puntos; con inóculos: línea oscura) de Argentina (A), Chile (B) y Uruguay (C). Puntos de mayor tamaño indican el ordenamiento de consenso.

En la Fig. 15 se muestra el ordenamiento de las características PGPR observado en el conjunto de aislamientos extraídos en los muestreos postsiembra. Se observa que las pruebas de solubilización, ya sea de fósforo (S.P.) o de hierro (P.S) se oponen en el plano de ordenación a la de hidrólisis de almidón (H.A.) y a la producción de exopolisacáridos (P.Ex.). Los resultados sugieren que, en los tres países, la composición de la población sufre algunos cambios respecto a los muestreos tempranos de pre-siembra ya que las diferencias poblacionales entre los cultivos inoculado y no inoculado son mayores. Pero cabe destacar que en suelos bajo cultivo de alfalfa sin inoculante también se detectaron cepas que presentaron todas las características PGPR positivas (2.25%).

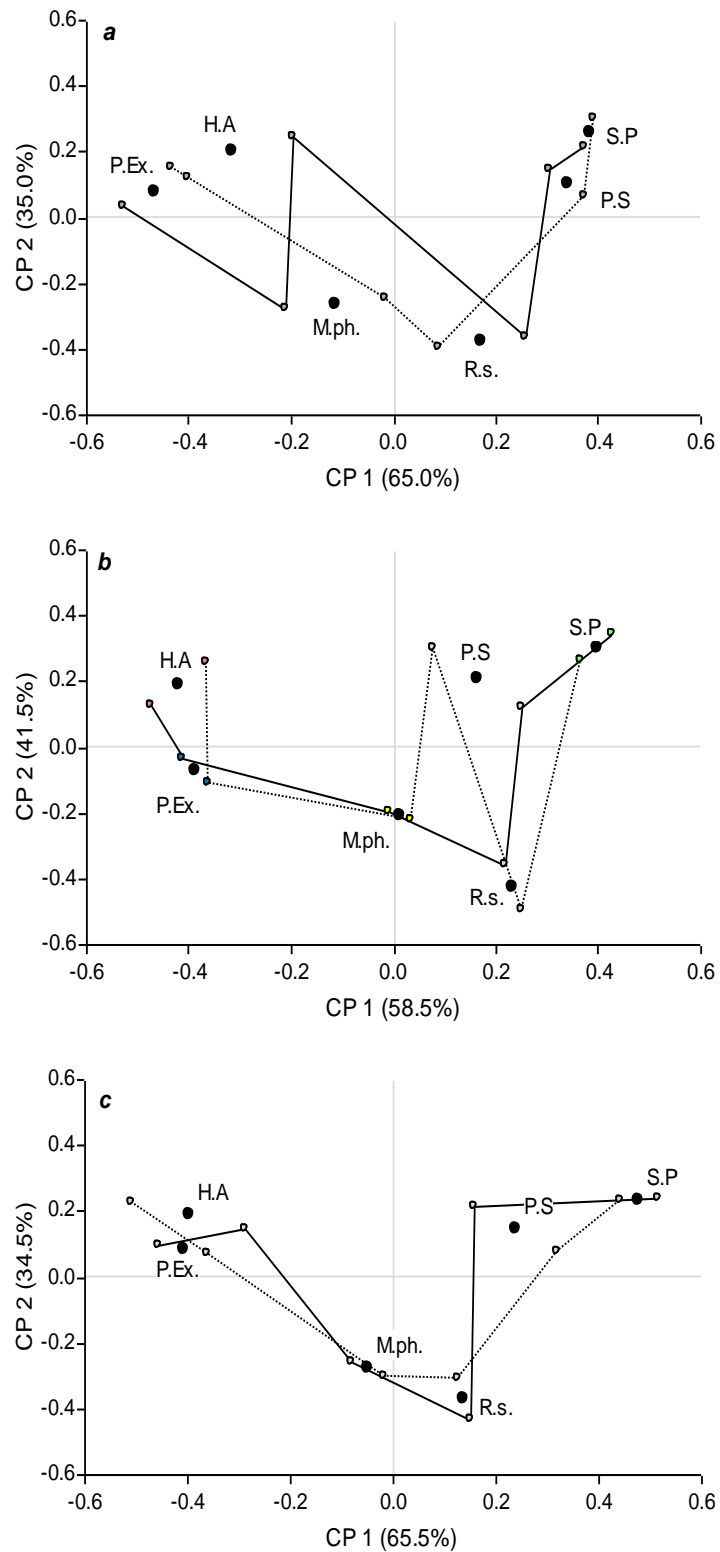


Fig. 15. Ordenamientos de las pruebas PGPR para 2 conjuntos de aislamientos (Sin inocular: línea de puntos; inoculados: línea oscura) de Argentina (A), Chile (B) y Uruguay (C). Puntos mayores indican el ordenamiento de consenso.

Los estudios de evolución de la población que se pudieron hacer a partir de muestreos subsecuentes, sugiere que en las dos localidades de Argentina (aunque Manfredi con mayor diversidad) la población permanece con pocos cambios en cuanto a sus características PGPR pero que se van incrementando diferencias en cuanto a estas características en las poblaciones proveniente de suelos con cultivo inoculado respecto a las no inoculadas.

A través del análisis del número de características PGPR positivas se clasificaron las cepas recolectadas en grupos definidos de acuerdo al número de características PGPR positivas y, desde el grupo con mayor número de características, se seleccionaron cepas para ensayos de coinoculación basados en el efecto de estas cepas sobre el crecimiento de plántulas. Se muestran los resultados obtenidos con las cepas denominadas URU1, UROII, Chile, Ba, Ma y SP2. Los ensayos se realizaron en invernáculo a fin de evaluar la combinación rizobacterias/planta en función del rendimiento del follaje y del peso de raíz, según el protocolo establecido usando como cepas controles a 3DOh13 (control PGPR ya que ésta es una cepa caracterizada como muy buena PGPR) y a B399 (control nodulante ya que esta es la cepa más frecuente en los inoculantes) e incluyendo controles nitrógeno (CN) y controles agua (CA) donde la cepa problema se siembra sola. Las cepas 3DOh13 y B399 fueron usadas solas y en coinoculación con las cepas promisorias.

Los resultados del análisis sugieren un interacción estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre los tratamientos y el tiempo de medición ya que las diferencias entre los tratamientos van cambiando con el tiempo, pero a los 45 días se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas promisorias. En la figura 16 se muestran los perfiles a través del tiempo para cada cepa problema, sus coinoculaciones y los controles respecto al peso seco de raíz. Comportamientos similares fueron observados a partir de las otras variables respuestas. Las cepas Ma, Sp2, y principalmente la cepa Chile coinoculadas con la cepa B399 fueron las que provocaron mayores pesos de plántulas a los 45 días de ensayo. En la figura 17 se presentan

los crecimiento de plántulas, medidos como peso seco aéreo y radicular, obtenidos bajo las distintas inoculaciones y en la figura 18 la performance de cada cepa en coinoculaciones dobles con la cepa nodulante B399. Los resultados muestran que algunas de las cepas seleccionadas favorecen el crecimiento de la alfalfa cuando son coinoculadas con la B399.

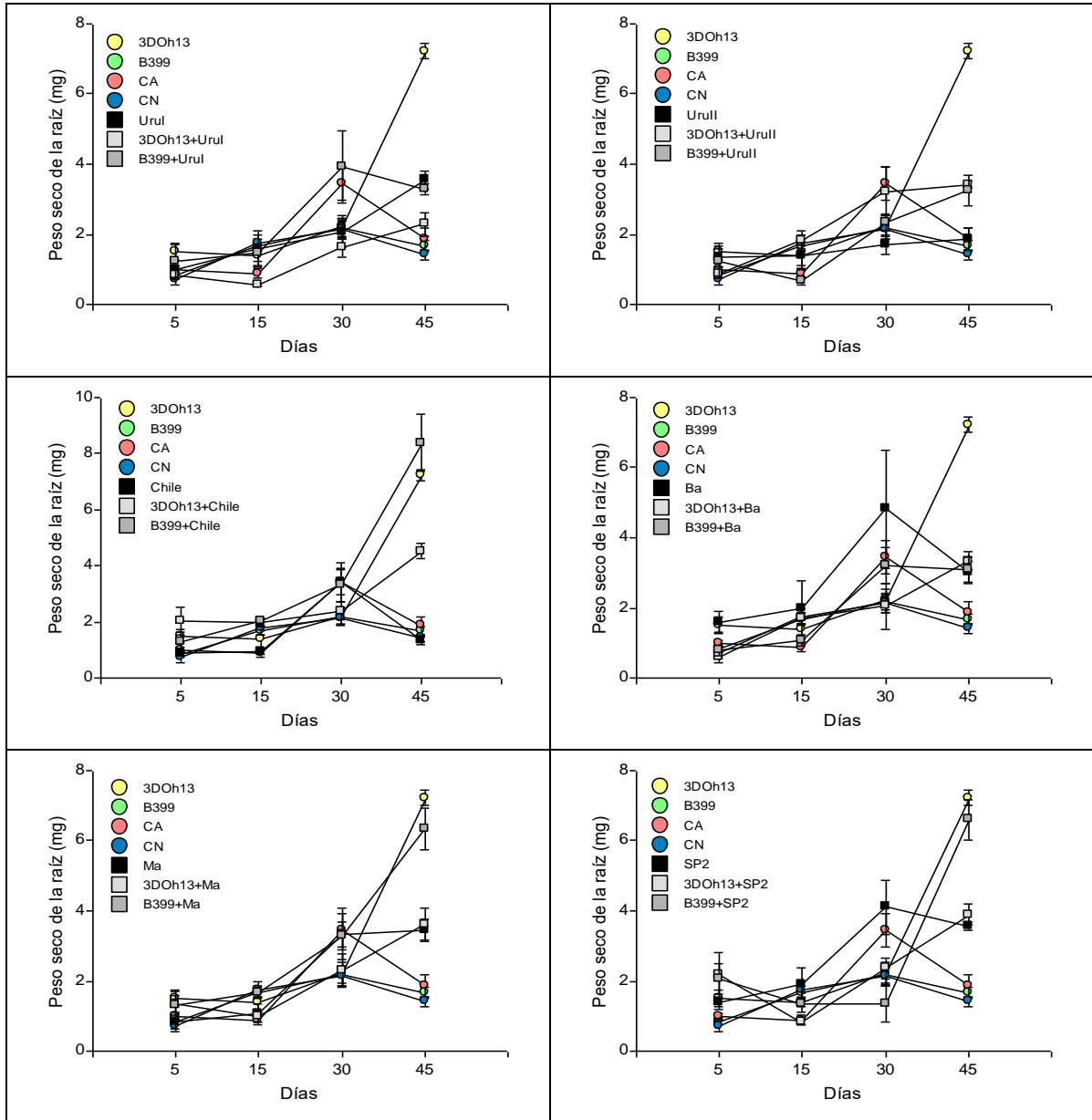


Fig 16: Peso seco de la raíz alcanzado por plántulas inoculadas con siete cepas PGPR, tratamientos control (3DOh13, B399, CN y CA) y coinoculaciones con cepas 3DOh13 y B399.

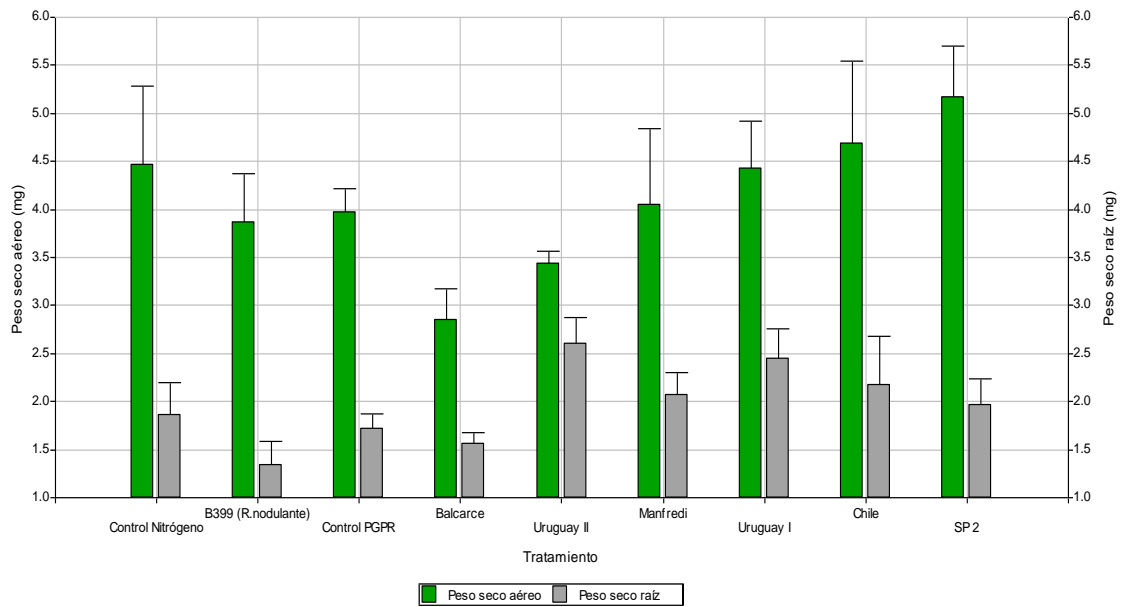


Fig 17: Peso seco de la parte aérea y de raíz alcanzado por plántulas inoculadas con con potenciales cepas PGPR (Ba, Urul, Urull, Chile, Ma y SP2) y por controles nitrógeno, nodulante y PGPR.

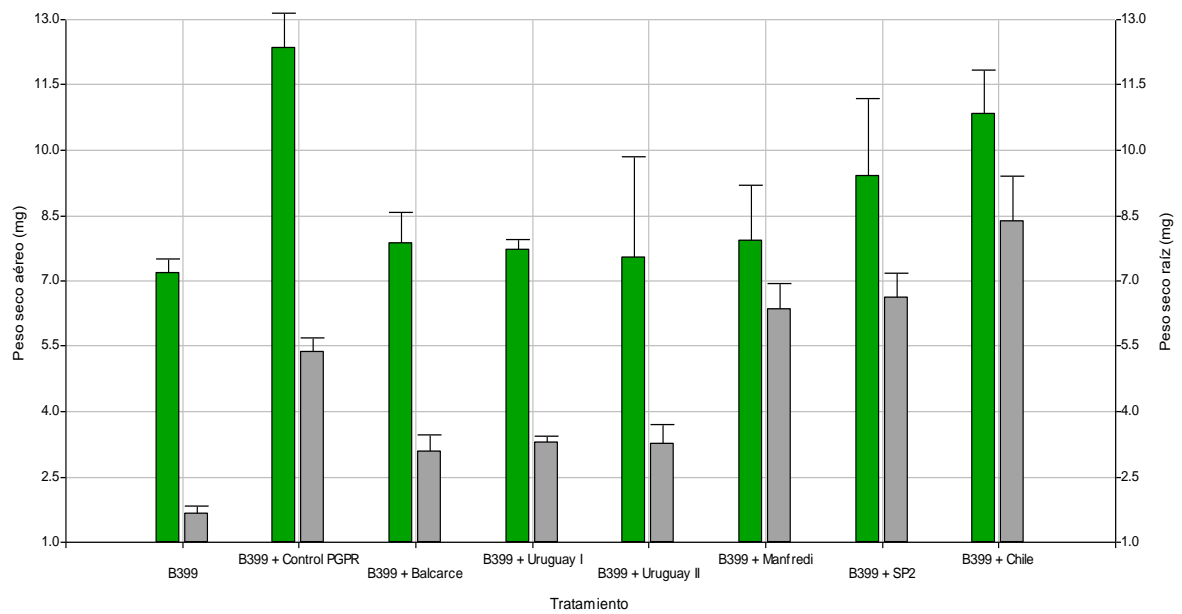


Fig 18: Peso seco de la parte aérea y de raíz alcanzado por plántulas inoculadas con potenciales cepas PGPR (Ba, Urul, Urull, Chile, Ma y SP2) coinoculadas con la cepa nodulante B399.

3.2 Productos Obtenidos

Publicaciones

Del Papa M. F., Pistorio M., Balagué L. J., Wegener C., Peticari, A., Niehaus K. and A. Lagares. "A microcosms study on the influence of pH and the host-plant on the soil persistence of different alfalfa-nodulating rhizobia". *Biology and Fertility of Soils*. 2003. Vol 39, p. 112-116.

Pistorio M., M. F. Del Papa, L.J. Balagué, y A. Lagares. "Characterization of a transmissible plasmid from an Argentine *Sinorhizobium meliloti* strain which can be mobilised by conjugal helper functions of the European strain *S. meliloti* GR4". *FEMS Microbiology Letters* 2003, Vol 225 ,p.p.15-21.

Pistorio M., L.J. Balagué, M.F. Del Papa, A. Pich Otero, A. Lodeiro, D.F. Hozbor y A. Lagares. "Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non-transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S64T". *FEMS Microbiol. Letters*. 2002, Vol 214, pp. 165-170.

Del Papa, M.F., Pistorio, M., Draghi, W.O., Balagué, L.J., Peticari, A., Hozbor, D.F. y A Lagares. "Condicionamientos Ambientales al Desarrollo de las Simbiosis Rizobio-Leguminosa: Estrés Ácido como Modelo de Análisis". En *Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación argentina*, Editorial: Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987- 99083-5-X.

Cangiano, C.A. y Gongález, N. "Componentes del rendimiento en alfalfa inoculada y sin inocular". 2004 *Inoculación en alfalfa. Visión Rural* N° 54:14-16, INTA.

Garcia Nero, F. y Cangiano, C.A. 2005. *Revista Argentina de Producción Animal*, Supl 1, 137-138.

Collino, D.J.; Dardanelli, J.L.; De Luca, M.J. and R.W. Racca. "Temperature and water availability effects on radiation and water use efficiencies in alfalfa (*Medicago sativa* L.)". *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45(4). 2005.

Del Papa M. F., Pistorio M., Draghi, W. O., Lozano, M. J., Giusti, M. A., Medina C., van Dillewijn P., Martínez-Abarca F., Moron Flores B., Ruiz-Sainz J. E, Megías M., Pühler, A., Niehaus, K., Toro N., and Lagares A. "Identification and characterization of a nodH ortholog from the alfalfa-nodulating Or191-like rhizobia." En prensa.

Guiñazú L., Andrés J., Rovera M., Pastor N., Rosas S. B. "Isolation and characterization of plant growth promoting microorganisms from alfalfa rhizofere". AUTORES: *Biocell* ISSN 0327-9545 (print) ISSN 1667-5746 (electronic), Vol. 29, N° 2, 2005, pp 228.

Cursos y talleres

Roberto W. Racca “Aspectos fisiológicos y Bioquímicos de las Relaciones Plantas / microorganismos”. Organizado por: INTA, INTA-IFFIVE y Soc. Arg. de Fisiología Vegetal. Tema: “Ecofisiología de la Simbiosis Rizobium/Leguminosas”. Coordinador- Profesor. Córdoba Octubre 2003.

Racca Roberto W. Curso de Post Graduación para Especialistas en Protección Vegetal. Fac. Cs. Agropecuarias de la Un. Cat. De Córdoba. Tema: “Fijación Biológica del N. en Cultivos”. Profesor invitado. Córdoba. Marzo de 2004.

Racca R. W. y O. Ruiz “ Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Argentina”. I Taller Iberoamericano sobre normativas y control de calidad de inoculantes para la agricultura “. Centro de Pesquisas Gonzalo Moniz. Salvador de Bahía (Brasil). 7-9 Septiembre de 2005.

Grassano, A. y Ronchi, A. (coordinadoras). Racca Roberto W, Labandera Carlos (profesores invitados). Curso de postgrado “Aspectos biotecnológicos del desarrollo de cepas de los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y sus aplicaciones agronómicas.” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. Abril 2005.

Racca R. W . “Estrategias para la obtención de germoplasma con tolerancia incrementada a los estreses hídricos y salinos”. Fight Against Desertification and Animal / Vegetal Production Improvement. Ministerio de Relaciones Exteriores (Cancillería) / INTA. Bs. As. Abril de 2006.

Racca Roberto W. Curso internacional “Producción de biofertilizantes desde el laboratorio hasta su aplicación en campo”. Instituto de Biotecnología de la Univ. Nac. de Colombia. 19 al 25 de junio de 2006. Profesor invitado.

Racca Roberto W. “Taller sobre inoculantes, estado actual y perspectivas”. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. Montevideo 27 al 30 de septiembre de 2006. Disertante invitado.

Capítulos de Libro

Racca, R.W. y Gonzalez, N. 2005. “Nutrición nitrogenada de la alfalfa e impacto de la fijación biológica del nitrógeno”. In: D.H. Basigalup (ed) El cultivo de la alfalfa en la Argentina. INTA. Capítulo 4. (En prensa).

Collino, D., J. Dardanelli y M. de Luca. 2006. “Uso del agua y la radiación para producción de forraje”. In: D. H. Basigalup (ed) El cultivo de la alfalfa en la Argentina. INTA. Capítulo 3. (En prensa).

Presentaciones en Congresos

Labandera C., González F., Grassano A., Ronchi A. "Contribución a una producción sostenible de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina, Chile y Uruguay". Fijación Biológica de Nitrógeno en Uruguay. XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología, RELAR, Los Cocos, Córdoba, 25 al 28 de Marzo de 2007.

Beltramo, A.; María F. Varela, Alicia Grassano, Ana Lía Ronchi. "Especificidad de la asociación simbiótica de *Medicago sativa* y *Sinorhizobium meliloti*". XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología, RELAR, Los Cocos, Córdoba, 25 al 28 de Marzo de 2007.

Guiñazú, L., Arroyo, A., Amaidén, R., Andrés, J. Balzarini, M. y Rosas, S. "Promoción del crecimiento en alfalfa por rizobacterias de suelos de Argentina, Chile y Uruguay". XXIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología, RELAR, Los Cocos, Córdoba, 25 al 28 de Marzo de 2007.

Eöry, C; A. Peticari; R. Campillo; R. Galdames; C. Labandera; M. Balsarini; M. De Luca y R. W. Racca "Cepas eficientes de *Sinorhizobium meliloti* presentes en suelos de Argentina, Chile y Uruguay." XXIII Reunión Latino Americana de Rizobiología. Los Cocos. Córdoba. Marzo de 2007.

Campillo R.; Galdames R.; Racca R.; De Luca M.; Brenzoni E.; Peticari A. "Estimación de la fijación de N en alfalfa mediante la metodología de 15 N en Andisoles del sur de Chile". XXIII Reunión Latino Americana de Rizobiología. Los Cocos. Córdoba. Marzo de 2007.

Guiñazú L; Andrés J.; Pastor N*.; Bergesse J.; Rosas S. y Rovera M. "Diversidad de rizobacterias en suelos alfareros y su importancia en los sistemas agrícola-ganaderos". Foro Argentino de Biotecnología. Universidad Argentina de la Empresa (UADE), Bs. As., 28 al 30 de Agosto de 2006.

Guiñazú, L.; Arroyo, A.; Rosas, S. y M. Balzarini. Clasificación e identificación de cepas bacterianas con características PGPR en suelos alfareros de Argentina, Chile y Uruguay. Congreso Latinoamericano de Recursos Naturales. Mar del Plata, 2005.

Guiñazú L. B., Arroyo A., Rosas S. B. y Balzarini M. "Clasificación e identificación de cepas bacterianas con características PGPR en suelos alfareros de Argentina, Chile y Uruguay" V SIRGEALC, V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, 23 al 25 de Noviembre de 2005. Montevideo, Uruguay.

Guiñazú, L, Arroyo A, Andrés, J, Rovera, M, Pastor, N, Avanzini, G, Balzarini M y Rosas, S. "Cepas rizosféricas de alfalfa y su uso como potenciales promotoras del crecimiento vegetal". V Semana del Microbiólogo. Asociación de Profesionales Microbiólogos de la República Argentina (APMRA). 5 al 7 de Octubre de 2005, Río Cuarto.

Guiñazú L., Andrés J., Rovera M., Pastor N., Rosas S. B. "Aislamiento y caracterización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal de la rizósfera de alfalfa" AUTORES: XV Jornadas Científicas, Sociedad de Biología de Córdoba. Villa Giardino, Córdoba, 4-6 de Agosto de 2005. Publicado en Libro de Resúmenes pp 174.

Perticari, A.; Eöry, C.; Campillo, R. y Galdames, R. "Aislamiento y caracterización de cepas de *Sinorhizobium meliloti* de la IX Región de Chile". V Reunión Nacional de Biología de suelo. Jujuy. Julio 2005.

Galdames, R.; Campillo, R.; Perticari, A.; Del Papa, M.; Racca, R. y P. Andrade. "Caracterización genotípica mediante ERIC-PCR de cepas seleccionadas de Rizobios en alfalfa. XXVI Congreso Chileno de Microbiología. Valparaíso. Diciembre 2004.

Ronchi, Ana Lía; Grassano, Alicia; García, Patricia "Incidencia de la población naturalizada de *Sinorhizobium meliloti* en el porcentaje de ocupación nodular. Correlación de metodología ensayada". 22 Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Miguel Pereira (Brasil). Septiembre 2004.

M. Melchiorre, R. Lazcano, R. Parola, G. Robert, R. Racca and V. Trippi. "Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase overexpressed in *Lotus japonicus*: a tool to study Reactive Oxygen Species incidence during the Nitrogen Fixation". 22 Reunión Latinoamericana " de Rizobiología y 1 Reunión Nacional de FBN. Miguel Pereira (Brasil). Septiembre 2004.

Guiñazú, L.; Marisa Rovera, Nicolás Pastor, Daniel Basigalup, Javier Andrés, Néstor Correa y Susana Rosas. "Producción sostenible de alfalfa por manejo rizosférico en suelos de Argentina, Chile y Uruguay". XXV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Santa Rosa, La Pampa, 22-24 de Septiembre de 2004. pp 257.

Formación de RR.HH.

- Soraya Kiriachek, integrante original del Proyecto, que en este momento está becada en el exterior, adquirió su grado académico de Magister en Biotecnología en la UNRC, realizando su trabajo de Tesis en tema relacionado con los objetivos del FONTAGRO.
- Durante el desarrollo del Proyecto, se entrenaron a María Florencia Varela, Nanci Kloster, Paula Andra Ferreyra y Amalia Anahí Beltramo, estudiantes avanzadas de la Carrera Licenciatura en Química, en las técnicas aplicadas para cumplir los objetivos correspondientes. En este momento las mismas están desarrollando su trabajo de Tesina de Grado, en temas relacionados.
- Biólogo German Robert. Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Córdoba (CONEAU: A). Tema: "Control de la senescencia y productividad en

leguminosas. Efectos de la expresión de supresores de muerte celular". En ejecución.

- Dra. Mariana Melchiorre. Beca Posdoctoral del CONICET. Tema: Sobreexpresión de Mn-superóxido dismutasa y glutatión reductasa en raíces noduladas de *Medicago truncatula*: sistema antioxidante y actividad nitrogenasa en condiciones de estrés. 2003 2005.
- Entrenamiento de la Lic. Florencia González, integrante del proyecto en Uruguay, en el tema "*Caracterización de Microorganismos Rizosféricos*" en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa. Octubre de 2005.

Congresos y Reuniones de divulgación

Los trabajos y resultados generados por el Proyecto, fueron presentados en diferentes Reuniones de Ciencia y Técnica de los países participantes, destacándose , en particular, los presentados en :

- XXIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología . Los Cocos . Córdoba . Marzo de 2007.
- Primer Workshop sobre " Inoculantes en Iberoamérica : Necesidades y oportunidades". Córdoba . Marzo de 2007.

En donde existió una activa participación de un numeroso grupo de profesionales y técnicos que integraban el proyecto

Roberto W. Racca
Lider Proyecto