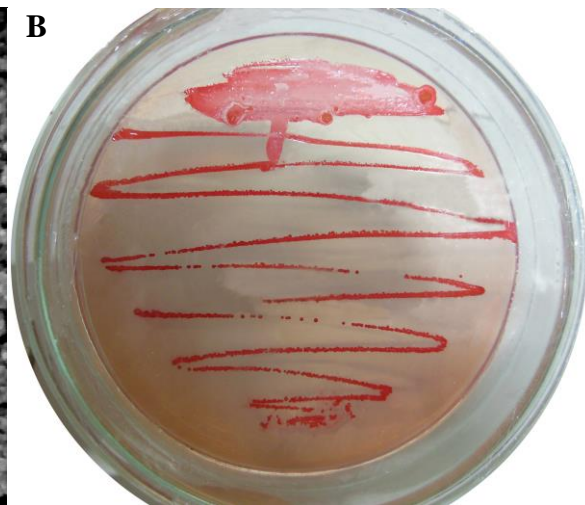
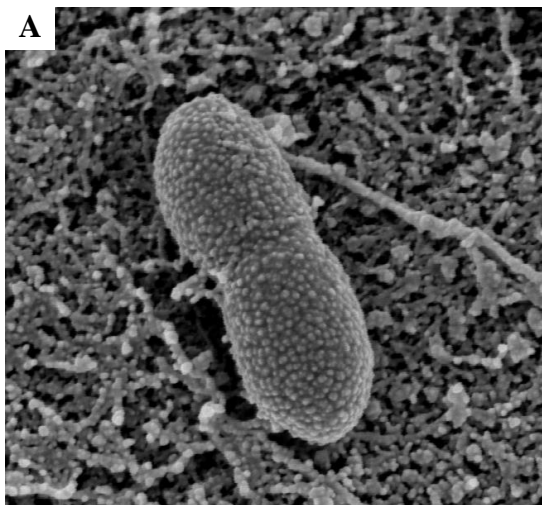


Contribución de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la nutrición de hierro y fósforo de plantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.)



TESIS DOCTORAL

Ing. Agr. Paola Adriana Georgina Delaporte Quintana

-2018-

Fotografías de portada:

- A. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, fotografía tomada con microscopía de barrido electrónico. Aumento 100.000 X.
- B. Colonias de *Azospirillum brasilense* REC3 crecidas sobre medio de cultivo NFb con agregado de Rojo Congo.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
AUTORIDADES

RECTOR

Prof. Ing. Agr. José Ramón García

VICERRECTOR

Prof. Ing. Sergio Pagani

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. Norma Carolina Abdala

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA
AUTORIDADES

DECANO

Mg. Ing. Agr. Roberto Daniel Corbella

VICEDECANA

Mg. Ing. Agr. Miriam Rosana Paz

SECRETARIA ACADÉMICA

Prof. Mag. Ing. Agr. Olga M. Baino

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

VICEDIRECTORA

Dra. Lucía Elena Claps

COMITÉ ACADÉMICO

Dra. Silvina Graciela Fadda

Dr. Raúl Osvaldo Pedraza

Dr. Alfredo Grau

**Trabajo de Tesis presentado para la obtención del grado
académico superior de DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Ing. Agr. Paola A.G. Delaporte Quintana
Tesista

Dra. Viviana A. Rapisarda
Codirectora

Dr. Raúl O. Pedraza
Director

Dra. María R. Rintoul
Dra. Marcela Ferrero
Comisión de Supervisión

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el marco de una
beca doctoral otorgada por el

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET)**

La misma fue realizada en

Facultad de Agronomía y Zootecnia (UNT)

Departamento de Ecología

Cátedra de Microbiología Agrícola

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas

(INSIBIO, CONICET-UNT)

e

Instituto de Química Biológica 'Dr Bernabé Bloj' Facultad de

Bioquímica, Química y Farmacia (UNT)

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca doctoral con la cual pude financiar mi Tesis doctoral.

A la Universidad Nacional de Tucumán, por darme la oportunidad de perfeccionarme mediante la realización de este trabajo.

A la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán, especialmente a la Cátedra de Microbiología Agrícola, por proporcionarme el lugar necesario para el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) y al Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj”, de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, por permitirme el uso de equipos y material de laboratorio.

Al Banco de Germoplasma Activo de la Universidad Nacional de Tucumán, por proporcionarme el material vegetal necesario para los experimentos planteados en este trabajo.

A la Estación Experimental Agrícola de INTA Famaillá, Sección Frutihortícola por el aporte de recursos y conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a las incontables personas que han aportado de una u otra forma al desarrollo y finalización de esta Tesis.

A mi mamá que siempre estuvo a mi lado dándome su apoyo y su ejemplo. Fue mi impulso en mi carrera y aún más durante estos años de desarrollo de Tesis.

A mi esposo Benjamín y a mis hijos Alma y Noah quienes me alegran el día, me ayudan a crecer como persona y profesional. Gracias por tanta paciencia, los amo eternamente.

A mis directores; Dr. Raúl Pedraza y Dra. Viviana Rapisarda por ser tan generosos al transmitirme sus conocimientos, responder mis dudas e inquietudes en cada momento y asesorarme durante estos años. Siempre han sido ejemplo para mi formación profesional. Muchas gracias por darme los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta Tesis.

A las Doctoras María Rintoul y Marcela Ferrero, miembros de la Comisión de Supervisión, por los aportes realizados en cada reunión de supervisión.

Al Dr. Sergio Salazar por compartir sus conocimientos, por ayudarme a tomar decisiones en mis bioensayos, y por aportar recursos que me fueron de mucha utilidad.

A la Dra. Katia Teixeira por aportarme material muy valioso para realizar mi Tesis y para publicar mi primer trabajo de investigación.

A todos los miembros de la Cátedra de Microbiología Agrícola por brindarme su colaboración y compañía, por hacerme sentir parte de la cátedra y valorar mis aportes.

A las Cátedras de Caña de Azúcar y Física II por colaborar siempre con el agua destilada.

A Nadia Lovaisa, con quien compartí cada día en el laboratorio, gracias por enseñarme a dar mis primeros pasos en la microbiología, gracias por tu ayuda constante; apoyo, consejos y amistad.

A Mariana Grillo por ayudarme en los experimentos, colaborar siempre en todo y por la buena onda en cada momento compartido.

A Lucía Toffoli, Eliana Neme y Juliana Elías por los lindos momentos vividos en el laboratorio.

A los técnicos Julio Maidana y Marcos Acosta por ayudarme cada día con mis tareas, por estar dispuestos a colaborar en todo lo que necesito e interesarse en cada cosa que hago.

A mis muy queridos amigos que me han dado ánimo en los momentos difíciles, han compartido mis alegrías y siempre están presentes en mi vida. Más que amigos son familia.

¡Muchas gracias a todos!

A mis hijos Alma y Noah

PUBLICACIONES EN REVISTAS

- **Delaporte-Quintana, P.**, Grillo-Puertas, M., Lovaisa, N. C., Rapisarda, V. A., Teixeira, K. R., & Pedraza, R. O. (2016). Solubilización de diferentes fuentes de fosfatos insolubles por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Revista Agronómica del Noroeste Argentino, 36 (1), 33-35.
- **Delaporte-Quintana, P.**, Grillo-Puertas, M., Lovaisa, N. C., Teixeira, K. R., Rapisarda, V. A., Pedraza, R. O. (2017). Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. Plant and Soil, 419 (1-2), 335-347.
- Grillo-Puertas, M.; **Delaporte-Quintana, P.A.G.**; Pedraza, R. O.; Rapisarda, V. A. Intracellular polyphosphate levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus* affect tolerance to abiotic stressors and biofilm formation. Aceptado con correcciones en Microbes and Environments (ME18044).

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1. Solubilización de distintas fuentes fosfatadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y sus mutantes deficientes en la producción de ácidos orgánicos. **Delaporte Quintana P**, Lovaisa N, Guerrero Molina M, Amigo J, Salazar S, Teixeira K, Pedraza R. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias-UCA-Palermo, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 25-27 de noviembre de 2015.
2. Solubilización de distintas fuentes fosfatadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante 16D10. **Delaporte Quintana P**, Lovaisa N, Guerrero Molina M, Salazar S, Teixeira K, Pedraza R. Cuarta Jornadas sobre Ciencia del Suelo del NOA para Estudiantes y Jóvenes Profesionales. Horco Molle, Tucumán. 4 y 5 de septiembre de 2015.
3. Estudio de la adhesión de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en raíces de plantas de frutilla bajo distintas concentraciones de fosfato. **Delaporte Quintana P**, Grillo Puertas M, Lovaisa N, Rapisarda V, Pedraza R. IX Reunión de Producción Vegetal y VII de Producción Animal del NOA. Facultad de Agronomía y Zootecnia. 9 al 11 de noviembre de 2016.

4. Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 to phosphorus nutrition in strawberry plants. **Delaporte Quintana PAG**, Grillo Puertas M, Lovaisa NC, Rapisarda VA, Pedraza RO. 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology, LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 7 al 10 de noviembre de 2016. Pabellón Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

5. Polyphosphate is involved in resistance to abiotic stress and biofilm formation in *G. diazotrophicus*. Grillo Puertas M, **Delaporte Quintana PAG**, Pedraza RO, Rapisarda VA. 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology, LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 7 al 10 de noviembre de 2016. Pabellón Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

6. Contribución a la nutrición con hierro en plantas de frutilla por dos bacterias PGPB. **Delaporte-Quintana PAG**, Lovaisa NC, Mainardi-Grellet V, Arroyo J, Rapisarda V, Pedraza RO y Salazar SM. XXXIV Jornadas Científicas, Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle-Tucumán. 26 y 27 de octubre de 2017.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
I-INTRODUCCIÓN	2
1. La frutilla: generalidades	3
1.1. Descripción de la planta	3
1.2. Importancia del cultivo	4
2. El fósforo como macronutriente en la nutrición vegetal	5
3. El hierro: como micronutriente en la nutrición vegetal	7
4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: generalidades	10
4.1. Aplicaciones agronómicas de las PGPB	14
4.2. <i>Azospirillum brasilense</i>	15
4.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	17
4.4. Polifosfatos	18
II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
1. Hipótesis de trabajo	22
2. Objetivo general	22
3. Objetivos específicos	22
III-MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Material vegetal	24
2. Microorganismos	24
3. Soluciones nutritivas y medios de cultivo	24
Solución Nutritiva Fåhraeus (1957) modificada	24
Solución Nutritiva Hoagland (Bussler y Epstein, 1972)	24
Medio NFb (Baldani y col., 2014b)	25
Medio M1 (Gupta y col., 1999)	25

Medio LGI-P (Baldani y col., 2014b)	25
Medio NBRIP (Nautiyal, 1999)	25
Medio TSA (Difco-BBL, Sparks, MD)	25
4. Curvas de crecimiento con distintas concentraciones de fósforo y recuento de unidades formadoras de colonia	25
5. Solubilización de fosfatos en medio sólido y líquido	26
6. Determinación del contenido de polifosfato intracelular en bacterias	27
7. Formación de biopelícula sobre superficie inerte	28
8. Evaluación de la adhesión de PGPB en raíces de plantas de frutilla	28
9. Determinación de la producción de sideróforos totales	28
10. Determinación de la producción de sideróforos de tipo catecol en medio líquido	29
11. Inoculación con PGPB a plantas de frutilla crecidas en distintas condiciones nutricionales	30
11.1 Participación de <i>G. diazotrophicus</i> en la nutrición con fósforo	30
11.2 Participación de <i>G. diazotrophicus</i> y <i>A. brasilense</i> en la nutrición con hierro	30
12. Parámetros evaluados en los ensayos de inoculación con PGPB	31
12.1. Índice de crecimiento (IC)	31
12.2. Acidificación radicular	31
12.3. Superficie radicular y observación de pelos radiculares	31
12.4. Recuento de diazótrofos (NMP)	32
12.5. Índice de verdor	32
12.6. Contenido de fósforo	32
12.7. Contenido de hierro	32
12.8. Análisis estadístico	32

IV-RESULTADOS	33
1. Curvas de crecimiento y recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)	34
2. Solubilización de fosfatos en medio sólido	35
3. Solubilización de fosfatos en medio líquido	37
4. Acumulación de polifosfato intracelular en bacterias	39
5. Relación del polifosfato en la formación de biopelícula y en la adhesión a raíces de plantas de frutilla de bacterias promotoras del crecimiento vegetal	40
6. Efecto promotor del crecimiento y la composición nutritiva de fósforo en plantas de frutilla, mediado por la solubilización de fosfatos	44
7. Producción de sideróforos totales	52
8. Producción de sideróforos de tipo catecol en medio líquido	53
9. Efecto promotor del crecimiento y la composición nutritiva en plantas de frutilla, mediado por la producción de sideróforos	54
V- DISCUSIÓN	61
1. Solubilización de fosfatos	62
2. Relación del polifosfato intracelular de <i>G. diazotrophicus</i> en la formación de biopelícula en superficies abióticas y en la adhesión en raíces de plantas de frutilla	63
3. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva de fósforo en plantas de frutilla inoculadas con <i>G. diazotrophicus</i>	64
4. Producción de sideróforos	66
5. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva de hierro en plantas de frutilla inoculadas con <i>G. diazotrophicus</i> y <i>A. brasilense</i>	67
VI- CONCLUSIONES	70
VII-PROYECCIONES	72
VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, denominadas PGPB *Plant Growth Promoting Bacteria*, son un grupo de diferentes géneros bacterianos que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Las PGPB son promisorias en los enfoques tendientes a lograr una adecuada provisión de nutrientes a las plantas y reducir los efectos ambientales negativos de los fertilizantes.

El objetivo de esta Tesis fue evaluar la contribución de dos géneros de PGPB, *Azospirillum brasilense* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*, en la nutrición con fósforo y hierro en plantas de frutilla, con énfasis en la solubilización de fosfatos, en el metabolismo de los polifosfatos y en la producción de sideróforos.

Se evaluó la capacidad de las PGPB de solubilizar fosfatos en medio sólido y líquido, se determinó el índice de solubilización, y la disminución del pH en el sobrenadante de las muestras. Como resultado la cepa *G. diazotrophicus* PAL5 solubilizó las fuentes de fosfato insoluble presentes, y disminuyó el pH del sobrenadante. Las restantes cepas evaluadas no solubilizaron ninguna fuente de fosfato, ni en medio sólido ni en medio líquido.

En ciertas bacterias (no PGPB), el fosfato ambiental modula los niveles de polifosfato intracelular, afectando la aptitud celular y la capacidad de formación de biopelículas. Se determinó el polifosfato intracelular por fluorescencia, utilizando la sonda DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Se observó acumulación del polímero en todas las cepas evaluadas.

Se cuantificó la formación de biopelícula en vidrio y poliestireno basándose en la habilidad de las células de adherirse y crecer en una superficie. Se observó un aumento en la formación de biopelícula al aumentar el contenido de fosfato del medio. Además, se analizaron muestras de raíces de plantas de frutilla, inoculadas con PAL5, mediante microscopía electrónica de barrido, observándose la formación de una matriz en muestras con alto contenido de fosfato.

En bioensayos controlados se evaluaron plantas de frutilla regadas con solución nutritiva conteniendo fosfato insoluble e inoculadas con PAL5. Las plantas inoculadas y las plantas regadas con solución nutritiva con fosfato soluble presentaron valores similares de índice de crecimiento, superficie radicular e índice de verdor. Sin embargo, las plantas inoculadas mostraron una mayor proliferación de pelos radiculares.

La producción de sideróforos determinada por el método del Cromo Azurol Sulfonato, mostró que la cepa mutada *G. diazotrophicus* 16D10 no produce sideróforos. Además se confirmó que la cepa *A. brasilense* REC3 produce sideróforos de tipo catecol.

Finalmente, en bioensayos controlados, se evaluaron plantas de frutilla regadas con solución nutritiva conteniendo hierro no disponible e inoculadas con las PGPB. Las plantas inoculadas presentaron valores mayores de biomasa, índice de crecimiento y proliferación de pelos radiculares, respecto a plantas sin inocular, destacándose las inoculadas con REC3.

Todos los experimentos realizados permiten concluir que las PGPB evaluadas contribuyen en la nutrición con fósforo y hierro en plantas de frutilla, mediante la solubilización de fosfatos, el metabolismo de los polifosfatos y la producción de sideróforos.

I-INTRODUCCIÓN

1. La frutilla: generalidades

1.1. Descripción de la planta

La frutilla es una planta herbácea, estolonífera y de buen porte (Figura 1). Perteneció a la Familia *Rosaceae*, Subfamilia *Rosoidea*, Tribu *Potentillea* y género *Fragaria*, siendo *Fragaria ananassa* Duch. la especie cultivada comercialmente (<http://www.inta.gov.ar/famailla/frutilla/info>). Esta especie es originaria de Europa a principios del siglo XVIII, y representa el cruce experimental de *Fragaria virginiana* del este de Norteamérica, notable por su fino sabor, y *Fragaria chiloensis* de la costa pacífica del continente americano (desde Norteamérica hasta la Patagonia) y conocida por su gran tamaño.

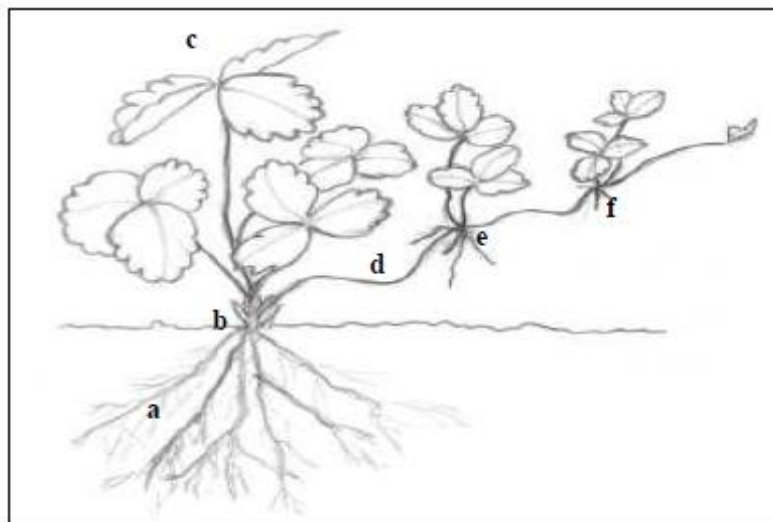


Figura 1. Esquema de *Fragaria ananassa* Duch. madre e hijos. (a) Raíz, (b) corona, (c) Hoja, (d) Estolón, (e) Hijo primera serie, (f) Hijo segunda serie. (Pedraza y col., 2007).

Las hojas de las frutillas tienen tres folíolos de bordes aserrados y la parte inferior de las hojas es pubescente. Están sostenidas por un pecíolo corto que las une a la corona, que forma el tallo de la planta y de ella se originan distintos tipos de yemas que generan hojas, flores y estolones. Las flores son blancas con cinco pétalos, de aproximadamente 2 cm de diámetro, dispuestas en inflorescencias. El sistema radicular es fibroso y está formado por raíces principales engrosadas, responsables del anclaje de la planta y del almacenamiento de reservas junto con un sistema de raicillas más finas, de color claro, que se desarrollan principalmente en los primeros 25 cm de suelo (Miserendino, 2007). Los estolones son tallos superficiales de crecimiento horizontal, de longitud y tamaño variable. En la extremidad del estolón hay una serie de entrenudos cortos que conforman la corona del futuro plantín, allí se encuentra también la yema axilar que

puede emitir un nuevo estolón y así sucesivamente (<http://www.inta.gov.ar/famailla/frutilla/info>).

La frutilla se adapta bien a climas húmedos con temperaturas medias anuales entre 15°C y 20°C, con una mínima no inferior a los -6°C y una máxima no mayor de 35°C. Se cultiva en diferentes tipos de suelo, desde arcillosos a arenosos, y los más aptos son los francos a franco-arenosos, de buena fertilidad y drenaje, y con pendiente para evacuar el exceso de agua en los períodos de altas precipitaciones. El rango óptimo de pH es de 5,5 a 7. La frutilla es sensible a la salinidad del suelo, por lo tanto la conductividad eléctrica (CE) del extracto de saturación no debe superar 1 dS/m. Tiene un requerimiento hídrico mínimo de 600 mm anuales. El agua de riego debe ser libre de sodio, cloro, boro, y el contenido total de sales no mayor de 400-600 ppm (Pritts y Handley, 1999). Los cultivares de frutilla tienen diferentes requerimientos de fotoperíodo y se los clasifica de acuerdo a su respuesta a las horas de luz del día. Las plantas que responden al fotoperíodo para florecer se llaman plantas de días cortos y las indiferentes a la longitud del día son llamadas plantas neutras o reflorescientes (Brandán, 2009).

1.2. Importancia del cultivo

El cultivo de la frutilla a nivel mundial alcanzó importancia por la atracción que ofrecen sus características de forma, color, sabor y aroma. El mismo tiene importancia tanto para consumo directo como para la industria en la elaboración de mermeladas, salsas, conservas, congelados, yogures, bebidas y helados. Además, la frutilla constituye una importante fuente de nutrientes tales como minerales, vitamina C, ácido fólico, compuestos fenólicos y fibras, que son esenciales para la salud (Giampieri y col., 2013).

La producción mundial de frutilla estimada por la FAO en el año 2014 fue de aproximadamente 8.100.000 t (FAOSTAT, 2017), siendo China el primer productor ya que aporta 37,5 % de la producción total (<http://faostat.fao.org>).

En Argentina se produce frutilla durante todo el año, concentrándose en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Tucumán el 70% de la producción total del país (Kirschbaum y Hancock, 2000). Tucumán es el segundo productor nacional y puede producir en las cuatro estaciones debido a sus características climáticas, contando con dos regiones agrológicas contrastantes: pedemonte y valles de altura. El pedemonte alberga emprendimientos desde Lules hasta Alberdi y concentra el 99% del área frutillera tucumana. Esta región se caracteriza por sus inviernos suaves, permitiendo cosechas anuales desde otoño a primavera. En el caso de Tafí del Valle, el cultivo es bianual, con cosechas entre el verano y mediados del otoño, por tener inviernos severos y veranos frescos. En esta zona, también se realizan viveros en pequeña y mediana escala (Kirschbaum, 2014). Esta amplia distribución en la producción hace que exista

fruta fresca disponible durante todo el año en el país.

La frutilla es un cultivo que requiere de un manejo agronómico intensivo. Esto incluye desde el período previo a la plantación en relación con la preparación y desinfección del suelo, armado de bordos y aplicación de fertilizantes de base. Estas prácticas requieren de elevada mano de obra debido a su carácter de cultivo intensivo. Luego de su cosecha los diversos destinos de la fruta junto con su delicada morfología hacen necesario un tratamiento personal de la fruta. Así, la importancia del cultivo de frutilla no solo es económica, sino que abarca también la fase social y cultural de la región.

2. El fósforo como macronutriente en la nutrición vegetal

El fósforo (P) está involucrado en un rol tanto estructural como funcional, en casi todos los organismos. Se encuentra en los componentes celulares, tanto como fosfolípidos, algunos cofactores y ácidos nucleicos, entre otros. A través del enlace fosfato, juega un papel importante en las plantas ya que actúa en la fotosíntesis, respiración, almacenamiento y transferencia de energía e interviene en la formación de tejidos en las mismas.

Mientras que el nitrógeno proviene de la atmósfera, el P deriva principalmente de las rocas minerales, convirtiéndolo de esta manera en un recurso no renovable. La mayor reserva de P son los sedimentos oceánicos que representan un pequeño pero importante reservorio de P terrestre originado por la erosión de minerales o liberado por la biota. La concentración de P en los suelos se encuentra en el rango de 0,01 a 0,30 ppm (Bowen, 1979), lo que representa el 1 % del P total en la superficie terrestre.

El sistema radicular de las plantas únicamente puede captar el P desde la fracción soluble en el suelo, cuando se encuentra como iones ortofosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}), la que a su vez es reabastecida por la fracción lábil de naturaleza orgánica e inorgánica. Esta fracción de P lábil está en equilibrio con fracciones moderadamente lábiles y de muy baja labilidad. Dada la baja concentración de P soluble, el abastecimiento de P desde la fracción lábil es de extrema importancia para garantizar un adecuado suministro de P a las plantas (Ciampitti, 2009). La absorción de P se realiza contra un gradiente electroquímico, por lo que es activa, con gasto de energía, y se realiza a través de *carriers* o transportadores (Gardner y col., 1985). El P absorbido no necesita ser reducido para su asimilación, integrándose rápidamente a compuestos orgánicos; en menos de 10 min el 80 % del P absorbido pasa a formar parte de los mismos (Uhart y Echeverría, 1998).

Sin embargo, en suelos ácidos, los iones fosfato con carga negativa se adhieren rápidamente a las superficies de los minerales que contienen iones de carga positiva, como y hierro (Fe^{3+}) y aluminio (Al^{3+}), a través de procesos de adsorción/desorción.

Éstos también precipitan con el calcio (Ca^{2+}) proveniente de minerales de carbonato de calcio (CaCO_3) en suelos calcáreos, formando compuestos relativamente insolubles. Ya sea en suelos ácidos o alcalinos, estos procesos tienen como resultado P fijado o asociado, eliminándolo de la solución del suelo y por lo tanto, poco disponible para las plantas (Schulte y Kelling, 1996). De este modo, la disponibilidad óptima de ortofosfato del suelo se obtiene a un pH de aproximadamente 6,5, valor en que las precipitaciones por aluminio y calcio son mínimas (Boone y col., 1978). Los compuestos de Ca-P más conocidos son: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ (fosfato monocálcico), $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato dicálcico dihidratado, DCTD, brucita), CaHPO_4 (fosfato dicálcico, DCP, monetita), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfato tricálcico, TCP), $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (fosfato octocálcico, OCP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$ (hidroxiapatita, HA) y otras apatitas solubles (Lindsay y col., 1989). En general, la solubilidad de minerales de Ca-P es $\text{DCPD} > \text{DCP} > \text{TCP} > \text{HA}$ (Whitelaw y col., 1999).

Este elemento es importante para el crecimiento vegetal, ya que contribuye a aumentar la resistencia a algunas enfermedades, mejora la calidad y acelera la madurez de los cereales, verduras, forrajes, frutos, entre otras funciones. En consecuencia, cuando se produce un suministro inadecuado de P, el crecimiento de la planta se ve disminuido, la madurez se retrasa y se reduce el rendimiento (Hernández y col., 2009). Su deficiencia provoca en ciertas plantas la formación de manojos radiculares en raíces laterales denominados *proteoidroots*, que son zonas con una alta tasa respiratoria y, por lo tanto, con una gran demanda de oxígeno (Gilbert y col., 2000). A estas zonas se les atribuyen una elevada tasa de exudación, especialmente de ácido cítrico, que parece estar implicado en la mejor captación del P en plantas que viven en ambientes deficitarios de este nutriente (Johnson y col., 1996).

En el caso particular de la frutilla, el desarrollo del sistema radicular y la floración son los períodos más críticos para la demanda de P. Por tanto, la deficiencia de P promueve la disminución del número de pedúnculos florales, del tamaño de las flores, atrasa la maduración de frutos, reduce el tamaño y firmeza de los mismos, favorece el albinismo, aumenta la acidez y deteriora el aroma (Kirschbaum y Borquez, 2006). Además, las nervaduras más chicas toman color verde azulado y a medida que avanza la deficiencia, esta coloración cubre los folíolos. Las hojas viejas son rojizas y luego púrpura y los peciolo son rojos (Figura 2).

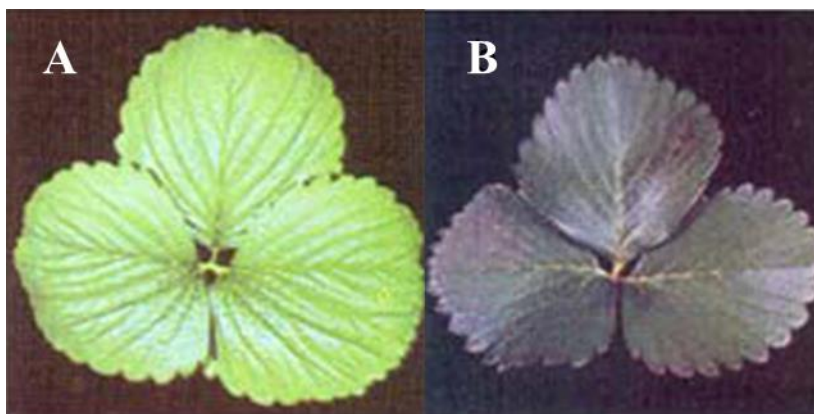


Figura 2. Hojas de frutilla y nutrición con fósforo. **A.** Hoja proveniente de planta crecida con dosis óptima de fósforo. **B.** Hoja proveniente de planta crecida con deficiencia de fósforo.

Cuando el P es agregado en formulaciones químicas, se convierte en iones ortofosfato en el suelo, luego de un par de horas posteriores a su aplicación (Schulte y Kelling, 1996). La humedad del suelo disuelve las partículas del fertilizante, aumenta la concentración de P en la solución alrededor de las partículas ya disueltas y difunde a una distancia muy corta (Hinsinger, 2001).

Las formas solubles de los fertilizantes fosfatados son ampliamente aplicadas en los suelos agrícolas para cubrir las deficiencias de P, pero 75-90% de lo aplicado precipita rápidamente, resultando las formas insolubles no disponibles a las plantas (Crespo y col., 2011). Las pérdidas de fertilizantes conducen a efectos tóxicos o dañinos para el medio ambiente; así, por ejemplo, el P junto al nitrógeno, son los responsables de la eutrofización de lagos y diques con la consecuente muerte de la ictofauna debido a la sobrepoblación de algas (que disminuyen el oxígeno disponible). Por lo tanto, convertir el P insoluble del suelo en disponible para las plantas es una necesidad para lograr producciones agrícolas sostenibles.

A diferencia del carbono y el nitrógeno, el P no muestra grandes flujos desde y hacia la atmósfera mediados biológicamente. No obstante, los organismos del suelo están íntimamente implicados en el ciclo de este elemento ya que participan en la solubilización de P inorgánico y en la mineralización de la materia orgánica.

3. El hierro como micronutriente en la nutrición vegetal

El hierro forma parte del 5% de la litósfera (capa de la tierra a una profundidad de 10 km) y es el cuarto elemento más abundante después del oxígeno, silicio y el aluminio. Está presente en todos los suelos y es frecuentemente responsable de su color rojo o marrón. En el suelo, el hierro está presente como mineral (hematita), precipitados inorgánicos (óxidos de hierro), complejos orgánicos (humatos) y como iones. Químicamente hay dos formas o dos estados de oxidación principales: férrico (Fe^{3+}), estado oxidado e insoluble en agua, y ferroso (Fe^{2+}), estado reducido y soluble en agua

(Powell y col., 1980; Matzanke y col., 1989).

Debido a que en el suelo el hierro se mueve por difusión, existen distintos factores involucrados en la carencia del mismo. En ambientes aeróbicos el hierro reducido Fe^{2+} pasa rápidamente a hierro oxidado Fe^{3+} , por lo tanto la solubilidad del hierro en estos sistemas depende de las propiedades de los sólidos, del tamaño de las partículas, del pH, de la fuerza iónica y de la concentración de ligandos orgánicos (Stumm y Morgan, 2012). Así, la combinación de pH alto, altos niveles de carbonato, suelos calizos, suelos fríos y húmedos disminuyen la disponibilidad del hierro ferroso (Kirschbaum y Borquez, 2006).

En la solución de agua del suelo la concentración mínima reportada para obtener un crecimiento razonable en diferentes cultivos es de 10^{-9} M. Incluso bajo condiciones estándar con pH=7 la concentración de hierro derivado del $\text{Fe}(\text{OH})_3$ es de 2×10^{-18} M (Neilands y col., 1987; Budzikiewicz, 2010). Así, las plantas deben tener forzosamente medios para solubilizar el Fe^{3+} de los óxidos e hidróxidos del metal.

Las plantas tienen dos diferentes vías o estrategias por medio de las cuales son capaces de aumentar la disponibilidad de Fe^{3+} en la solución de agua del suelo: (i) **Estrategia I.** Las monocotiledóneas no gramíneas y las dicotiledóneas pueden disminuir el pH en la rizósfera. La disminución en el pH solubiliza el Fe^{3+} y promueve la reducción del mismo a Fe^{2+} . El Fe^{3+} solubilizado debe reducirse a Fe^{2+} antes de atravesar la membrana celular a través de la acción de proteínas reductoras asociadas a las membranas celulares. (ii) **Estrategia II.** Las gramíneas excretan fitosideróforos, aminoácidos no proteínicos, que solubilizan los iones Fe^{3+} formando un complejo hierro-fitosideróforo. La liberación de fitosideróforos se correlaciona positivamente con diferencias genotípicas en la resistencia a la clorosis férrica. Se sabe que los fitosideróforos también transportan otros cationes como zinc, manganeso y cobre. Las plantas con la estrategia I disponen de aminoácidos no proteínicos para el transporte interno de hierro como la nicotinamina. La carencia de nicotinamina da lugar a déficit de hierro en los tejidos como se ha observado en el mutante cloronerva del tomate (*Lycopersicon esculentum*) que tiene una falla en el gen que controla la síntesis del mencionado compuesto (Ling y col., 1996). Los fitosideróforos de las gramíneas presentan estructuras químicas muy parecidas a la nicotinamina, siendo de hecho la metionina el precursor y la nicotinamina un intermediario en la síntesis (Römheld, 1991). Por ello se ha dicho que la estrategia II es una extensión extratisular de los mecanismos de transporte de hierro intra e intercelulares. En la estrategia I, la disminución en el pH se lleva a cabo a través de la excreción de protones (provenientes de una ATPasa asociada a la membrana plasmática) y, en menor medida, de una mezcla compleja de ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato, los que pueden funcionar como agentes quelantes del hierro y como fuente de carbono para los microorganismos. Se supone que la mayor actividad respiratoria de los microorganismos asociados a la

rizósfera disminuye el nivel de oxígeno, generando microambientes facilitadores de la reducción de Fe^{3+} . La producción y acumulación de citrato y malato en las raíces se consigue por la inducción de mayor actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa en las raíces. En el caso de las gramíneas, con estrategia II, estas producen ácidos orgánicos, pero aparentemente no excretan protones (Bienfait, 1988).

La absorción de Fe^{2+} por las plantas con estrategia I puede ser en forma de complejos con ligandos de bajo peso molecular o bien en la forma iónica libre, siendo al parecer esta última la más común. En *Arabidopsis thaliana* la proteína IRT1 (*iron-regulated transporter*) es un transportador de Fe^{2+} asociado a la membrana. Se sabe que IRT1 se expresa en las raíces, que la síntesis es inducida por la deficiencia de hierro y que su actividad es inhibida por cadmio (Eide y col., 1996). En las plantas que utilizan la estrategia II los complejos Fe-fitosideróforo, que se encuentran en alta concentración (de 1 a 2 mM) alrededor de las raíces, son transportados desde el exterior hacia el interior de la célula por una proteína transportadora de alta afinidad que es inducido exclusivamente por hierro (Römheld, 1991).

Una vez que es absorbido por las raíces el Fe^{2+} se incorpora en primera instancia en ferritinas, que son proteínas de almacenamiento de hierro que se acumulan en los plástidos de hojas y semillas (Clarkson y Hanson, 1980; Caris y col., 1995). El hierro es liberado de las ferritinas por la acción reductora del ascorbato (Laulhere y Briat, 1993) o de compuestos fenólicos reductores como el ácido caféico, el ácido clorogénico, el ácido dihidrocaféico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Según los resultados de Boyer y col. (1988) la tasa de removilización de hierro de las ferritinas depende de la concentración de fenólicos y del poder reductor de los mismos. Los mismos autores observaron que las enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) y compuestos atrapadores de radicales como el manitol no mostraron efecto sobre la tasa de remoción de hierro. Por el contrario, el EDTA y el oxalato inhibieron la liberación de hierro. Las ferritinas son proteínas con estructura altamente conservada en plantas y animales pero con diferente localización citológica y distinto control en respuesta al exceso de hierro. Las ferritinas de las plantas se exportan a los plástidos y se regulan transcripcionalmente en respuesta a la disponibilidad de hierro. Al ser liberado de las ferritinas del tejido radical el Fe^{2+} se moviliza a las restantes partes de la planta vía el xilema en donde toma de nuevo la forma Fe^{3+} . El pH promedio del exudado de xilema de diferentes especies es 5,5, lo cual tiende a convertir el Fe^{2+} en Fe^{3+} . Este último es transportado hacia las partes aéreas de la planta como citrato férrico. Existe evidencia que indica que antes de la incorporación del hierro a las ferritinas en las hojas o semillas el Fe^{3+} unido al citrato debe reducirse de nuevo a Fe^{2+} (Laulhere y Briat, 1993).

El contenido normal de hierro en el tejido vegetativo de hortalizas es de 50-300 mg/kg (ppm) en términos de materia seca (Zuang, 1982); el mismo se encuentra involucrado en la formación de la clorofila, interviene en la respiración y en la

formación de algunas proteínas. La deficiencia de este metal en frutilla se observa en las hojas más jóvenes, iniciando como clorosis internerval y luego tornando toda la hoja color verde-amarillento, amarillo-limón y finalmente amarillo pálido (Figura 3). Debido a la inmovilidad del mismo, solo las hojas nuevas presentan síntomas, mientras que las hojas viejas permanecen verde oscuras. Para corregir estas deficiencias, se realizan aplicaciones de hierro inorgánico, las cuales no son efectivas; además, se realizan aplicaciones foliares de quelatos de hierro, y se aumenta la materia orgánica en el suelo (Kirschbaum y Borquez, 2006).

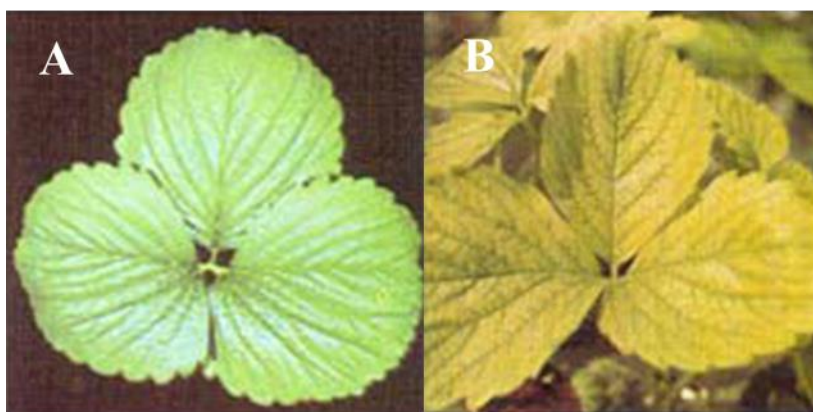


Figura 3. Hojas de frutilla y nutrición con hierro. **A.** Hoja proveniente de planta crecida con dosis óptima de hierro. **B.** Hoja proveniente de planta crecida con deficiencia de hierro.

4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: generalidades

Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, conocidas por su nombre inglés como PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), constituyen un grupo heterogéneo de bacterias beneficiosas que se pueden encontrar en la rizósfera, asociados a la superficie de raíces, y que son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas y protegerlas de enfermedades y estrés abiótico (Dimkpa y col., 2009; Grover y col., 2011; Glick, 2012). Entre los géneros más conocidos figuran *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, y *Azospirillum* (Bashan y de Bashan, 2010).

Las PGPB pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo al mecanismo de acción: (i) las que promueven el crecimiento de las plantas mediante distintos mecanismos que afectan directamente el metabolismo de las plantas (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, actividad ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato)-desaminasa y producción de hormonas y sideróforos, entre otros), mejorando el desarrollo radicular (mayor absorción de agua y minerales), modificando las actividades enzimáticas de las plantas, o contribuyendo en la acción de otros microorganismos benéficos (Bashan y de

Bashan, 2010); y (ii) las que tienen capacidad de control biológico, promoviendo el crecimiento de las plantas al inhibir o suprimir a los fitopatógenos (Compant y col., 2005; Tortora y col., 2011; 2012). Las PGPB son promisorias en los enfoques biotecnológicos tendientes a lograr una adecuada provisión de nutrientes a las plantas, reduciendo los efectos ambientales negativos de los fertilizantes (Antoun y Presvost, 2006). La promoción del crecimiento en plantas por algunas PGPB ha sido asociada, en algunos casos, con la solubilización e incremento de la captación de fosfatos; en otros casos, con la absorción de nitratos y fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Bashan y de Bashan, 2010), y también con la producción de auxinas, como el ácido indol acético (AIA), provocando un importante aumento de la superficie radicular, lo cual permite que éstas exploren un mayor volumen de suelo para captar agua y nutrientes (Kloepper y col., 2007).

Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

Los diazótrofos son bacterias con habilidad para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio e incorporarlo a su metabolismo para producir aminoácidos y sintetizar proteínas (Paul y Clark, 1996). Por ello, los diazótrofos presentan ventajas competitivas que les permiten prosperar en ambientes ricos en carbono y pobres en nitrógeno (Döbereiner y Pedrosa, 1987). De la misma manera que los diazótrofos simbióticos, como los pertenecientes al género *Rhizobium*, que se asocian con plantas fabáceas, en la naturaleza se establecen también importantes interacciones entre plantas no fabáceas y microorganismos fijadores de N₂ de vida libre o asociativa como *Azospirillum*. En este tipo de asociaciones, la planta proporciona la fuente de energía orgánica que necesitan las bacterias y un ambiente favorable para fijar nitrógeno mientras que las bacterias facilitan el nitrógeno fijado para el crecimiento de la planta (Madigan y col., 2000).

Solubilización de fosfatos

El principal mecanismo de las bacterias solubilizadoras de fosfato mineral es la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas, que desempeñan un papel importante en la mineralización de fósforo orgánico en el suelo. Esto permite aumentar la absorción de fósforo por la planta e incrementar el rendimiento del cultivo. Existen diversos estudios que muestran que en las bacterias Gram-negativas la expresión directa de una vía oxidativa extracelular permite una mayor capacidad para solubilizar fosfatos (Crespo y col., 2011). A través de dicha ruta, también llamada oxidación no fosforilativa, la glucosa es oxidada a ácido glucónico y ácido 2-cetoglucónico directamente en el espacio periplásmico. Así, estos ácidos orgánicos fuertes pueden disolver los fosfatos insolubles del suelo y quedar disponibles para la bacteria y la

planta. Los géneros *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, y *Rhizobium* se encuentran entre los más potentes inductores de solubilización de fosfatos (Crespo y col., 2011; Rodríguez y Fraga, 1999).

Producción de sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios quelantes de hierro con bajo peso molecular (< 2.000 Da) (Budzikiewicz, 2010). Los sideróforos son producidos por bacterias, hongos y plantas para facilitar la absorción de hierro (Chu y col., 2010; Hider y Kong, 2010). Esto permite a los microorganismos del suelo captar y solubilizar hierro en ambientes limitados en este metal. La producción de sideróforos por bacterias PGPB constituye una de las características promotoras del crecimiento de dicho grupo, debido a su capacidad para estimular el desarrollo de las plantas a través de diferentes mecanismos. Por un lado, los sideróforos bacterianos pueden mejorar el estado nutricional de las plantas, ya que en ambientes donde la disponibilidad de hierro es baja, algunas plantas son capaces de liberar el ión férrico (Fe^{3+}) del sideróforo bacteriano y utilizarlo para su crecimiento (Bashan y de Bashan, 2005). Por otro lado, pueden estimular el crecimiento de las plantas indirectamente, limitando el daño causado por microorganismos fitopatógenos, ya sea disminuyendo la cantidad de hierro disponible para su desarrollo (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Miethke y Marahiel, 2007; Chaiham y col., 2009; Sayyed y Chincholkar, 2009), o bien, induciendo en la planta mecanismos de defensa (Audenaert y col., 2002; Leeman y col., 1995).

Si bien se conocen más de 500 tipos diferentes de sideróforos (Boukhalfa y Crumbliss 2002, Chu y col., 2010; Hider y Kong, 2010), solo 270 han sido caracterizados estructuralmente (Boukhalfa y col., 2003; Hider y Kong, 2010). La mayoría de los sideróforos son ligandos hexadentados que forman complejos 1:1 con Fe^{3+} (Kraemer, 2004), y su capacidad para formar complejos estables con Fe^{2+} es bastante bajo (Miethke y Marahiel, 2007).

Los sideróforos se dividen en tres grupos principales según sus estructuras químicas: hidroxamatos, catecoles y carboxilatos (Budzikiewicz, 2010). La mayoría de los sideróforos bacterianos son catecoles, aunque algunas bacterias producen sideróforos de tipo carboxilatos e hidroxamatos (Matzanke, 1991). Sin embargo, también hay ciertos tipos de sideróforos bacterianos que contienen una mezcla de los principales grupos funcionales (Cornelis, 2010; Budzikiewicz, 2010).

Hidroxamatos: los sideróforos de tipo hidroxamato son producidos por bacterias y hongos. Su estructura general es $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{OH})\text{R}$, donde R es un aminoácido o un derivado (Figura 4-A). Cada grupo hidroxamato proporciona dos átomos de oxígeno, que forman un ligando bidentado con hierro. Por lo tanto, cada sideróforo forma un complejo octaédrico hexadentado con Fe^{3+} . Los sideróforos de tipo hidroxamato por lo

general muestran una fuerte absorbancia entre 425 y 500 nm cuando está ligado al hierro. Este tipo de sideróforo fue detectado por espectrofotometría con el método de Neilands (Neilands, 1981). Algunos ejemplos de hidroxamatos son: ferricromo producido por el hongo *Ustilago sphaerogena*, el cual fue el primer sideróforo en ser aislado y probado como factor de crecimiento para otros microorganismos (Messenger y Ratledge, 1985); ferribactina producida por *Pseudomonas Fluorescens*; gonobactina y nocobactina producidas en pequeñas cantidades por *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

Catecoles: los sideróforos de tipo catecol proporcionan dos átomos de oxígeno para la quelación con hierro formándose un complejo octaédrico hexadentado (Figura 4-B) como en el caso de los sideróforos de tipo hidroxamato. Algunas especies producen catecoles lineares, tales como *Agrobacterium tumefaciens* (agrobactin) (Ong y col., 1979) y *Paracoccus denitrificans* (parabactin) (Tait, 1975; Peterson y Neilands, 1979). La naturaleza química del sideróforo de tipo catecol también fue detectada por espectrofotometría con el método de Neilands (Neilands, 1981), formando un complejo color vino con $FeCl_3$ que absorbe como máximo a 495 nm.

Carboxilatos: los sideróforos de tipo carboxilato son producidos generalmente por microorganismos que viven en ambientes ácidos. El carboxilato mejor caracterizado es rhizobactin el cual es producido por *Rhizobium meliloti* DM4 y es un amino poli (ácido carboxílico) con etilendiaminodicarboxilo y restos de hidroxicarboxilo como grupos quelantes de hierro (Figura 4-C). Staphyloferrin A, producida por *Staphylococcus hyicus* DSM20459, es otro miembro de esta clase de sideróforos.

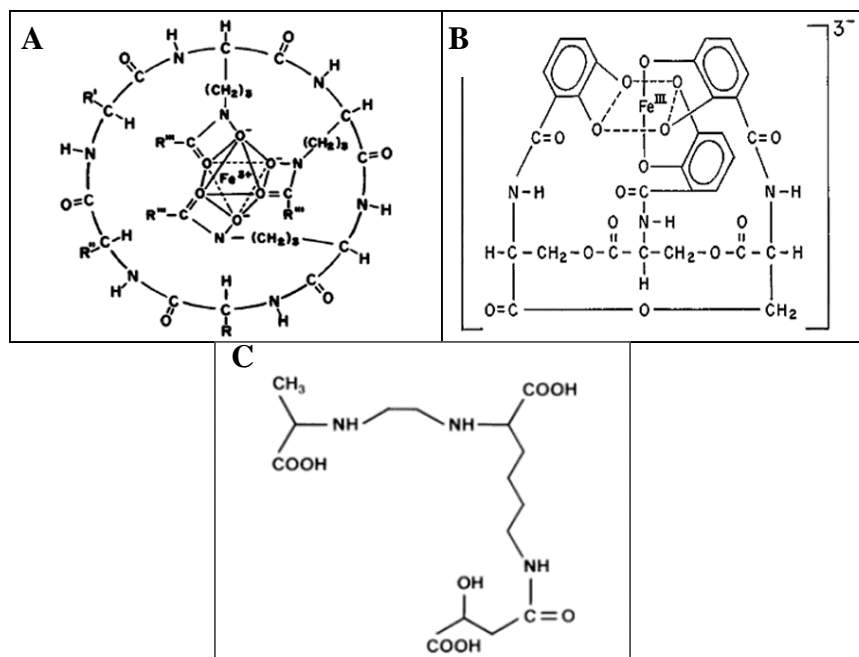


Figura 4. Tipos principales de sideróforos de acuerdo con su estructura química. **A.** Sideróforo de tipo hidroxamato. **B.** Sideróforo de tipo catecol. **C.** Sideróforo de tipo carboxilato.

Todos los sideróforos son agentes quelantes con una alta afinidad por Fe^{3+} cuyas constantes de estabilidad son aproximadamente 10^{30} M^{-1} (Albrecht-Gary y col., 1994; Raymond y col., 2003). Por lo tanto, la estabilidad del complejo hierro-sideróforo varía en un rango de 30 órdenes de magnitud dependiendo de la estructura química y del tipo de ligando. Debido a esto los carboxilatos no pueden competir con los catecoles a pH fisiológico (Dertz y Raymond, 2004), ya que estos últimos son sideróforos tienen mayor afinidad por el Fe^{3+} . La cadena peptídica que lleva los sitios del ligando de los catecoles, generalmente contiene estructuras cíclicas (anillos) en los extremos que impiden su degradación por enzimas proteolíticas. Otro factor importante es el pH del medio ambiente, el cual influye fuertemente en la eficacia de la quelación (Miethke y Marahiel, 2007). Los sideróforos hidroxamatos prevalecen en pH ácido, mientras que los sideróforos catecoles son producidos en pH alcalino o neutro (Valdebenito y col., 2006).

4.1. Aplicaciones agronómicas de las PGPB

Los múltiples mecanismos de promoción del crecimiento y estrategias de biocontrol que presentan las bacterias PGPB han impulsado actualmente el desarrollo y comercialización de una gran variedad de bioinsumos, entre los que se encuentran los inoculantes. Estos cumplen con el objetivo de reducir el uso de fertilizantes químicos y pesticidas sobre los cultivos, contribuyendo al desarrollo de una agricultura sostenible.

Hay numerosos estudios en invernadero y en campo que demuestran que la interacción PGPB-planta es beneficiosa incrementando los rendimientos de los cultivos agrícolas. Por ejemplo, en la inoculación con *Azospirillum* se han observado efectos positivos en el crecimiento de numerosos cultivos (maíz, trigo, sorgo, cebada, arroz, frutilla, etc.), con incrementos del rendimiento total en el campo que oscilan entre 5-30% (Fulchieri y Frioni, 1994; Kucey, 1988; Okon y Labandera-González, 1994; Parra y Cuevas, 2001; Salazar y col., 2007). Al inocular semillas de maíz con *Azospirillum* aumentó el crecimiento de la planta y la producción de granos comparado con el control que solo tenía fertilización nitrogenada (Ferreira y col., 2013); en arroz aumentó el número de cañas y por tanto aumentó el rendimiento de semillas a nivel comercial (Isawa y col., 2010), además aumentó la longitud de la parte aérea comparado con los tratamientos no inoculados (Bao y col., 2013); en trigo la inoculación con *A. brasilense* mostró respuestas positivas en el 70% de los sitios evaluados independientemente de la fertilización, prácticas de cultivo y manejo del suelo, dando como resultado un crecimiento vegetal vigoroso y un aumento en la acumulación de materia seca tanto en raíces como en parte aérea (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009); al inocular trigo y maíz disminuyendo la dosis de fertilizante nitrógeno al 27% y 31% (respectivamente) los rendimientos aumentaron (Hungria y col., 2010). La inoculación con

Gluconacetobacter diazotrophicus en caña de azúcar aumentó la germinación, el contenido de sólidos solubles y el rendimiento del jugo (Beneduzi y col., 2013); promovió eficientemente el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* luego de 50 días desde la inoculación, aumentó la fotosíntesis en la canopia, disminuyó la transpiración de la planta y aumentó la eficiencia de uso del agua (Rangel de Souza y col., 2016). La inoculación de guisantes con cepas del género *Pseudomonas*, con actividad ACC-deaminasa, disminuyó significativamente los efectos del estrés producidos por la sequía, además aumentó la eficiencia de uso del agua con niveles bajos de humedad del suelo (Zahir y col., 2008). En maní la inoculación con *Pseudomonas* aumentó el número de vainas y el contenido de nitrógeno y P tanto en el suelo como en brotes y granos durante estaciones lluviosas y post lluvia (Dey y col., 2004). Al inocular semillas de soja con *Bacillus* observaron aumento en el rendimiento de semillas, en el contenido de nitrógeno, en el peso seco aéreo (Bullied y col., 2002), además al realizar una co-inoculación con *Azospirillum* el aumento en el rendimiento llegó a ser 16,1% mayor que en el control sin inocular (Hungria y col., 2013); en caña de azúcar aumentó un 20% la biomasa en campo (Govindarajam y col., 2006). La inoculación con *Pseudomonas* y *Bacillus* en plantas de cereza incrementa su crecimiento y rendimiento frutal (Esitken y col., 2006).

De acuerdo a los ejemplos de PGPB utilizadas actualmente en la agricultura, a continuación se describen las dos PGPB estudiadas en esta Tesis doctoral.

4.2. *Azospirillum brasilense*

Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* son conocidas por su efecto de promoción del crecimiento vegetal y el incremento en los rendimientos de especies de interés agronómico bajo condiciones apropiadas (Fages, 1994; Bashan, 1999; Dobbelaere y col., 2001). El género *Azospirillum* se encuentra incluido en la subclase Alfa de las Proteobacterias, perteneciendo a la superfamilia ARNr IV (Baldani y col., 2014a). Son bacilos cortos, Gram negativos de forma vibroide, presentan pleomorfismo y movilidad mediante un flagelo polar y varios laterales. Aunque pueden desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, son preferentemente microaeróbios en presencia o ausencia de fuentes combinadas de nitrógeno.

Como una de las bacterias PGPB más extensamente investigadas (Bashan y de-Bashan, 2010), *Azospirillum brasilense* se ha convertido en la piedra angular de la investigación de las interacciones benéficas planta-bacteria en la rizósfera, además de su aplicación en la agricultura. Esta bacteria resulta un excelente modelo para el estudio de la asociación planta-bacteria (Bashan y Levanony, 1990) y aunque fue aislada por primera vez de raíces de cultivos de cereales, ésta puede ser encontrada en asociación

con las raíces de casi cualquier especie de planta, estableciéndose como un colonizador radical ubicuo (Bashan y Holguin, 1997).

Muchos autores han descripto los efectos sobre el crecimiento que produce la inoculación de diferentes cultivos con distintas especies de *Azospirillum*, tanto en invernadero como en el campo. Entre ellos se encuentran: el aumento en el peso seco total de la planta, contenido de nitrógeno en hojas, granos y brotes, floración, aparición temprana de la espiga, número de espigas y granos en éstas, peso y tamaño del grano, altura de la planta, tamaño de la hoja, índice de área foliar y tasa de germinación. Además se ha observado que la inoculación con *Azospirillum brasilense* va acompañada de cambios morfológicos en el sistema radical que incluyen: incrementos en la longitud de las raíces, particularmente de la zona de elongación radicular, en el número de raíces por planta, en el número y la longitud de las raíces laterales, las cuales incrementan el volumen radical, aumento en el peso seco de la raíz, número, densidad y aparición temprana de los pelos radicales, incrementos en la superficie radicular y en la velocidad de división celular en el meristema, cambios en la disposición de las células del córtex, y aumento en la secreción de exudados radiculares (Bashan y Levanony, 1990; Parra y Cuevas, 2001).

Bashan y de-Bashan (2010) revisaron extensamente los mecanismos por los cuales bacterias del género *Azospirillum* ejercen su efecto promotor sobre las plantas. Estos resultan ser en esencia los mecanismos generales que muestran otras PGPB, algunos mencionados anteriormente. Esta multiplicidad de procesos realizados por *Azospirillum* que llevarían a la modificación del crecimiento vegetal, condujo al planteo de la denominada “hipótesis aditiva” (Bashan y Lavanony, 1990) la cual ha acumulado gran cantidad de evidencia a su favor a lo largo los últimos 20 años de investigación (Bashan y de-Bashan, 2010; Reis y col., 2011). Esta hipótesis considera que múltiples mecanismos, en lugar de sólo uno, participan en la promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum*.

Estos mecanismos operan simultáneamente y/o de manera sucesiva, y la contribución individual de un mecanismo resulta menos significativa cuando es analizada de manera separada del resto. La suma de las actividades de cada mecanismo resulta en los cambios observados en el crecimiento vegetal (Bashan y Lavanony, 1990). Entre estos mecanismos se encuentran: **fijación del nitrógeno** (Huergo y col., 2005; de-Bashan y col., 2012), **actividad nitrato reductasa** (Steenhoudt y col., 2001), **producción de compuestos reguladores del crecimiento** (Bar y Okon, 1992; Prinsen y col., 1993; Costacurta y col., 1994; Thuler y col., 2003; Bashan y col., 2004; Cassán y col., 2009), **producción de compuestos osmoprotectores** (Bashan y Holguin, 1997; Cassán y col., 2009), **solubilización de fosfatos** (Seshadri y col., 2000), **producción de sideróforos** (Saxena y col., 1986; Tapia-Hernandez y col., 1990; Shah y col., 1992), **absorción de**

agua y nutrientes (Bashan y Levanomy, 1990; Rodriguez y col., 2004; Bashan y de-Bashan, 2005; Hungria y col., 2010).

4.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

El género *Gluconacetobacter* se encuentra en la subclase Alfa de las proteobacterias, perteneciendo al orden Rhodospirillales y dentro de este a la familia Acetobacteraceae (Kerstens y col., 2006; Reis y Teixeira, 2015). *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria endófito Gram-negativa, fijadora de nitrógeno, la cual no forma esporas ni produce nódulos. Esta bacteria es un aerobio obligado con células en forma de cilindros rectos de extremos redondeados que miden 0,7-0,9 µm por 2 µm y aparecen como estructuras únicas, en pares o en forma de cadena cuando se ven bajo un microscopio. Poseen entre 1 y 3 flagelos laterales o peritricos, los cuales son utilizados para la motilidad. *G. diazotrophicus* es una bacteria tolerante a los ácidos, que es capaz de crecer en pH por debajo de 3, sin embargo, su pH óptimo para el crecimiento es 5,5, y un 10 % p/v de sacarosa, pero tolera hasta un 30 % p/v de este azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Gillis y col., 1989; Li y Macrae, 1991; Reis y Teixeira, 2015).

G. diazotrophicus crece bien en medios de cultivo sintéticos que contengan sacarosa, glucosa, fructosa, gluconato, lactato, piruvato, acetato, manitol, sorbitol o glicerol como única fuente de carbono (Gillis y col., 1989; Stephan y col., 1991; Ureta y Nordlund, 2002). Es capaz de crecer y fijar nitrógeno en cultivos *batch* con una dosis *starter* de nitrógeno fijado (Stephan y col., 1991). En quimiostato, empleando N₂ como única fuente de Nitrógeno puede crecer mientras la concentración de O₂ disuelto se mantenga en 1 - 2 % de saturación de aire. En este sistema de cultivo, una vez alcanzadas las condiciones de FBN (síntesis de nitrogenasa) este microorganismo puede ser cultivado continuamente sin la necesidad del suministro de Nitrógeno fijado e independientemente de la fuente de Carbono y energía empleada (Luna y col., 2000).

Originalmente aislado como endófito (capaz de penetrar y colonizar tejidos internos) de caña de azúcar, se ha encontrado asociado con numerosos cultivos de importancia agronómica, tales como batata, ananá, zanahoria, té y banana, entre otros (Saravanan y col., 2008). Estudios previos consideraban a este microorganismo como un endófito obligado ya que no se podía aislar de suelo o regiones de la rizósfera en un número significativo. No obstante, estudios recientes han revelado la ocurrencia y supervivencia de este microorganismo en la rizósfera de diversos cultivos tales como remolacha, ananá, café, zanahoria y mucho otros (Reis y Teixeira, 2015). Experimentos de aislamiento y recuento en placa revelaron la presencia de *G. diazotrophicus* en rizósfera de plantas de café, y estudios conducidos en la India con *primers* sitio específicos, permitieron la identificación de *G. diazotrophicus* en suelo rizosférico además de encontrarlo en raíces, tallo y hojas de la pastura *Eleusine coracana* (Saravanan y col.,

2007). Otros estudios, revelaron la presencia de este microorganismo como endófito y en la rizósfera de cultivos de arroz (Saravanan y col., 2007).

G. diazotrophicus se ha postulado como responsable de los altos niveles de FBN en caña de azúcar (Sevilla y col., 2001). La FBN, la producción de fitohormonas y la solubilización de nutrientes minerales, entre otras características, hacen que este microorganismo pueda incluirse dentro de los PGPB (Saravanan y col., 2007). Han sido realizados experimentos de inoculación con *G. diazotrophicus* en plantas no solo de caña de azúcar, para testear si este microorganismo es capaz de colonizar y promover el crecimiento vegetal (Sevilla y col., 2001; Loganathan y Nair, 2004; Adriano-Anaya y col., 2006). Se conoce que la solubilización de fosfatos minerales es generalmente conducida por bacterias de la rizósfera, no obstante, bacterias endófitas pueden poner de manifiesto esta capacidad durante la colonización inicial e incluso con posterioridad (Saravanan y col., 2007). A través de ensayos cualitativos en placa ha sido observada la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles en algunas cepas de *G. diazotrophicus* (Maheshkumar y col., 1999), pero hasta el trabajo de esta Tesis doctoral, no se demostró su participación en la nutrición de P en plantas. A pesar de que la comunidad científica ha aumentado su interés por *G. diazotrophicus*, los efectos de la inoculación en las plantas hospedantes todavía necesitan ser investigados, al igual que los aspectos fisiológicos básicos de este microorganismo.

4.4. Polifosfatos

El polifosfato-inorgánico (poliP) es una molécula que se ha involucrado en la supervivencia bacteriana ante distintos factores ambientales. Este polímero lineal está formado por decenas a cientos de ortofosfatos unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía (Kornberg, 1995; Kornberg, 1999).

Considerado clásicamente como un componente con función de reserva energética, la regulación y función del poliP en los seres vivos permaneció desconocida por muchos años debido a la falta de métodos analíticos específicos. Las primeras descripciones del poliP en microorganismos dan cuenta de la presencia de gránulos metacromáticos. Estas partículas teñidas de rosa con colorantes básicos fueron llamadas “volutina” (Meyer, 1904) y se las confundía con ácidos nucleicos. Luego, con el advenimiento de la microscopía electrónica, el poliP se observó como gránulos electrodensos que desaparecían rápidamente bajo el haz de electrones, diferenciándose de la cromatina (Wiame, 1947). Utilizando estos métodos, el poliP ha sido encontrado en todos los seres vivos: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Wood y Clark, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990). Su carga negativa sugiere que podrían haberse adherido a las superficies de pirita donde se cree que se originaron los primeros metabolizadores quimioautotróficos en un ambiente no reductor y de altas

temperaturas (Wächtershäuser, 1992). El poliP habría cumplido un rol en la activación de grupos funcionales como dador de fosfato en reacciones de fosforilación. El posible origen prebiótico y el carácter ubicuo del poliP sugieren una multiplicidad de funciones dependiendo del organismo o de la localización subcelular. Entre las funciones propuestas, se encuentran la de sustituto de ATP en reacciones de fosforilación, reserva de fosfato, quelante de metales, *buffer* para álcalis, virulencia bacteriana (Kornberg, 1995). Además, se ha informado que el poliP cumple un rol importante en la respuesta biológica ante ciertos factores de estrés (Ault-Riché y col., 1998).

En eucariotas, el poliP se encuentra en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y col., 1999). En bacterias, el polímero es principalmente citoplasmático y se encuentra como gránulos o en forma soluble (Rao y col., 1998). También existen pequeñas cantidades de poliP en las membranas plasmáticas formando complejos con poli-hidroxi-butirato y calcio, componentes fundamentales de los poros generados en las células competentes para el ingreso del ADN durante la transformación (Reusch y Sadoff, 1988). Generalmente, el poliP se acumula a medida que las células avanzan a través de la fase exponencial de crecimiento y se degrada durante la fase estacionaria debido a que éste se utiliza principalmente como reserva de energía. Los niveles de poliP pueden ser modificados por la presencia de diferentes agentes estresantes, como algunos antibióticos (Tsutsumi y col., 2000), o por un cambio en la osmolaridad del medio (Ault-Riché y col., 1998).

Ya sea en forma soluble o formando gránulos, con localización citoplasmática o en compartimentos, las variaciones fisiológicas que registran los niveles de poliP en los organismos sugieren la existencia de enzimas responsables de su síntesis y degradación y de cuya actividad dependen las fluctuaciones observadas en diferentes condiciones (Akiyama y col., 1992 y 1993).

La degradación del polifosfato (poliP) en la fase estacionaria de *Escherichia coli* desencadena la formación de biopelículas (Grillo-Puertas y col., 2012). En medios que contienen exceso de fosfato, se mantienen altos niveles de poliP en la fase estacionaria con la consecuente inhibición de la formación de biopelículas.

La tolerancia del metal en las bacterias se ha relacionado con el poliP, en un modelo en el que los metales pesados estimulan la hidrólisis del polímero, formando complejos de metal y fosfato que se exportan. Recientemente, se ha demostrado la desintoxicación del cobre en las fases estacionaria y exponencial de *E. coli*, que implica el sistema del transportador Pit y la degradación de poliP (Grillo-Puertas y col., 2014). Los datos reflejan la importancia de la concentración de fosfato ambiental en la regulación del estado fisiológico microbiano.

La importancia del poliP en la colonización y supervivencia de las bacterias PGPB en los cultivos agrícolas es un aspecto que debe ser estudiado en profundidad para complementar al nuevo enfoque de agricultura amigable con el medio ambiente.

De acuerdo con los antecedentes presentados, en este trabajo de Tesis doctoral se propone como estrategia biotecnológica la utilización de dos PGPB, *A. brasilense* y *G. diazotrophicus*, en el aporte nutricional de fósforo y hierro a plantas de frutilla, basado en la capacidad de solubilizar fosfatos y de producir sideróforos. Adicionalmente, también se explora la participación del polifosfato intracelular bacteriano en la capacidad para formar biopelículas y tolerar situaciones de estrés abiótico. Con todo esto se espera profundizar los conocimientos sobre las PGPB y los beneficios de su asociación en el cultivo de frutilla.

II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

“Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal contribuyen a la nutrición de fósforo y hierro en plantas de frutilla por medio de la solubilización de fosfatos, del metabolismo de los polifosfatos y en la producción de sideróforos.”

2. Objetivo general

Evaluar la contribución de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la nutrición con fósforo y hierro en plantas de frutilla, con énfasis en la solubilización de fosfatos, en el metabolismo de los polifosfatos y en la producción de sideróforos.

3. Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos de las cepas en estudio con distintas fuentes fosfatadas en el medio de cultivo.
2. Determinar la acumulación de polifosfatos en las cepas en estudio considerando distintas concentraciones de fosfato en el medio de cultivo.
3. Evaluar la relación del polifosfato en la formación de biopelícula y en la adhesión a raíces de plantas de frutilla de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
4. Evaluar el efecto promotor del crecimiento y la composición nutritiva de fósforo (en hojas y raíces) en plantas de frutilla inoculadas o no con las cepas de estudio y distintas fuentes de fósforo.
5. Evaluar la capacidad productora de sideróforos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y las características de los mismos.
6. Evaluar el efecto promotor del crecimiento en plantas de frutilla, mediado por la producción de sideróforos de las cepas en estudio, utilizando distintas fuentes de hierro.

III-MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se utilizaron vitroplantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) cv. 'Pájaro', obtenidas del Banco Activo de Germoplasma de Frutilla perteneciente a la Universidad Nacional de Tucumán.

2. Microorganismos

Se emplearon 4 cepas pertenecientes al grupo de las PGPB,

- *Azospirillum brasilense* **REC3** (FJ012319.1) aislada de raíz frutilla y caracterizada previamente en un trabajo de Pedraza y col. (2007).
- *A. brasilense* **Sp7** (ATCC 29145) cepa de referencia aislada de raíces de *Digitaria decumbens* por Döbereiner y Day (1975).
- *Gluconacetobacter diazotrophicus* **PAL5** (ATCC 49037) cepa de referencia aislada de tallos de caña de azúcar por Cavalcante y Döbereiner (1988).
- *G. diazotrophicus* **16D10**, mutante por transposición de la cepa PAL5, defectiva en la producción de ácidos orgánicos.

3. Soluciones nutritivas y medios de cultivo

Solución Nutritiva Fåhraeus (Fåhraeus, 1957) modificada: CaCl₂•2H₂O (1%) 11 ml; KNO₃ (101,1 g/L) 6 ml; MgSO₄•7H₂O 0,12 g; K₂HPO₄ 0,21 g; KH₂PO₄ 0,1 g; Fe-EDTA Na₂ [64 mM (Fe 10%)] 0,5 ml; Solución de micronutrientes (H₃BO₃ 0,31 g; ZnSO₄•7H₂O 0,05 g; CuSO₄•5H₂O 0,22 g; KCl 0,041 g; NaMoO₄ 0,01 g; agua destilada 1.000 ml) 2 ml; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 6. La fuente de fósforo se reemplazó para algunos tratamientos por Ca₃(PO₄)₂ 2 mM.

Solución Nutritiva Hoagland (Bussler y Epstein, 1972): KNO₃ (101,1 g/L) 6 ml; Ca(NO₃)₂•4H₂O 4 ml; NH₄H₂PO₄ (115,08 g/L) 2 ml; MgSO₄•7H₂O (246,48 g/L) 1 ml; Fe-EDTA Na₂ [64 mM (Fe 10%)] 0,5 ml; solución de micronutrientes (KCl 1,864 g; H₃BO₃ 0,773 g; MnSO₄ 0,169 g; ZnSO₄ 0,288 g; CuSO₄ 0,062 g; HMoO₄ 0,040 g; agua destilada 1.000 ml) 2 ml; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 6. La fuente de hierro se reemplazó para algunos tratamientos por FeSO₄ [64 mM (Fe 10%)].

Medio NFb (Baldani y col., 2014b): ácido málico 5 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; NaCl 0,1 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,02 g; KOH 4,5 g; Fe-EDTA Na_2 (1,64%) 2 ml; extracto de levadura 0,5 g; agar 18 g; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 6,8 ajustado con KOH diluido. Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las cepas *A. brasilense* REC3 y Sp7.

Medio M1 (Gupta y col., 1999): manitol 25 g, extracto de levadura 5 g, peptona 3 g, agar 18 g; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 5,5 ajustado con ácido acético 10%. Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10. Con agregado de 100 $\mu g/ml$ de Kanamicina para la cepa 16D10.

Medio LGI-P (Baldani y col., 2014b): sacarosa 100 g, K_2HPO_4 0,2 g; KH_2PO_4 0,36 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; $CaCl_2$ 0,02 g; $NaMO_4 \cdot 2H_2O$ 0,002 g; $FeCl_3$ 0,01 g; extracto de levadura 0,5 g; agar 18 g; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 5,5 ajustado con ácido acético 10%. Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10. Con agregado de 100 $\mu g/ml$ de Kanamicina para la cepa 16D10.

Medio NBRIP (Nautiyal, 1999): glucosa 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$ 5 g; $MgCl_2$ 5 g; $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g; KCl 0,2 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 g; 17 g agar, agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 7. La fuente de fosfato puede ser reemplazada por $Ca_2H(PO_4)_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, Hidroxiapatita, Escorias Thomas o $FePO_4$. Utilizado para determinar la capacidad de solubilización de fosfatos en medio sólido y líquido, de todas las cepas.

Medio TSA (Difco-BBL, Sparks, MD): tripteína 15 g; peptona de soja (digestión enzimática de harina de soja) 5 g; NaCl 5 g; agar 15 g; agua destilada hasta volumen final 1.000 ml; pH 7,3. Utilizado para corroborar la ausencia o presencia de microorganismos en material vegetal.

4. Curvas de crecimiento con distintas concentraciones de fósforo y recuento de unidades formadoras de colonias

Se realizaron precultivos de las cepas *A. brasilense* REC3 y Sp7 en medio de cultivo líquido NFb, y de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 en medio de cultivo líquido M1, a partir de colonias puras. Luego de 24 h de crecimiento a 30°C y 60 rpm se ajustaron las densidades ópticas (DO) de los cultivos a 0,2 (longitud de onda = 560 nm) utilizando como blanco los respectivos medios de cultivo, sin inocular. Se sembraron alícuotas (1 ml) de los cultivos con DO ajustada en frascos de vidrio conteniendo 100

ml de los respectivos medios de cultivo y se pusieron a crecer en baño termostático con agitación (60 - 90 rpm) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta las 48 h para las cepas Sp7 y REC3, y hasta las 120 h para las cepas PAL5 y 16D10. Para realizar las curvas de crecimiento se tomaron alícuotas cada 2 h a partir del cultivo y se midieron las $\text{DO}_{560 \text{ nm}}$. Con los datos obtenidos se hicieron curvas de crecimiento para cada cepa en función del tiempo, utilizando el programa Excell.

Para el recuento de unidades formadoras de colonias se realizaron diluciones decimales seriadas de las alícuotas obtenidas para la curva de crecimiento y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo sólido (NFb y M1) por duplicado. Esto se repitió a las 12, 24, 36 y 48 h para las cepas Sp7 y REC3; a las 24, 36, 48 y 60 h para la cepa PAL5, y 48 y 60 h para la cepa 16D10. Las placas se colocaron en estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h y se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia.

Para determinar la influencia de las distintas concentraciones de fósforo, colonias puras de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 fueron crecidas por duplicado en medio de cultivo líquido LGI-P por 48 h. Alícuotas de 50 μl fueron diluidas en 50 ml del mismo medio de cultivo líquido conteniendo diferentes concentraciones de fósforo soluble: 1, 3, 5, 10, 20 y 30 mM, y crecidas con agitación (150 rpm) a 30°C durante 120 h. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinaron las $\text{DO}_{560 \text{ nm}}$ de las mismas para armar las curvas de crecimiento.

5. Solubilización de fosfatos en medio sólido y líquido

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos en medio sólido de las cepas *A. brasilense* REC3 y Sp7, y de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10, se partió de cultivos frescos de 24-48 h crecidos en medio de cultivo líquido NFb y LGI-P, se centrifugaron los mismos a 5.000 rpm durante 10 min y se lavaron las células obtenidas 2 veces con agua destilada estéril a 5.000 rpm por 5 min. Las células lavadas fueron re-suspendidas en agua destilada estéril y se ajustaron las $\text{DO}_{560 \text{ nm}} = 0,2$. Se sembraron 10 μl de cada cepa por triplicado en medio NBRIP (Nautiyal, 1999) sólido pH 7, utilizando las siguientes fuentes de fósforo insoluble: $\text{Ca}_2\text{H}(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Hidroxiapatita, Escorias Thomas y FePO_4 . Se llevaron a estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 96 h. Se midieron los diámetros de las colonias y de los halos y se calculó el índice de solubilización para cada cepa como la relación entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia ($\text{IS} = \text{D halo}/\text{D colonia}$) (Edi-Premono y col., 1996).

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfatos en medio líquido, cultivos frescos de las cepas *A. brasilense* REC3 y Sp7, y de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y

16D10, de 24-48 h fueron crecidos en medio de cultivo líquido NFb y LGI-P, los mismos fueron centrifugados a 5.000 rpm durante 10 min y las células obtenidas fueron lavadas 2 veces con agua destilada estéril a 5.000 rpm por 5 min. Las células fueron re-suspendidas en agua destilada estéril y se ajustaron las $DO_{560\text{ nm}} = 0,2$. Para evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos en medio líquido se utilizó el método colorimétrico de Ames (1966). Brevemente, se sembraron alícuotas de cada cepa en medio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) pH 7, con $Ca_3(PO_4)_2$ como fuente de fósforo insoluble y se hicieron crecer con agitación (180 rpm) a 30°C durante 96 h, tomando muestras cada 24 h. Se centrifugaron las mismas a 10.000 rpm por 10 min para obtener el sobrenadante; una alícuota del sobrenadante se mezcló con HCl y con el reactivo (molibdato de amonio y ácido ascórbico), y fueron puestas a incubar a 45°C por 20 min. Para cuantificar la cantidad de fósforo inorgánico se realizó una curva estándar con KH_2PO_4 1 mM y se midió la absorbancia a 800 nm. Para complementar esta determinación, se determinó el pH del sobrenadante en cada una de las muestras. El ensayo completo se repitió 2 veces.

6. Determinación del contenido de polifosfato intracelular en bacterias

Para determinar la acumulación del poliP intracelular se hicieron crecer las cepas *A.brasilense* REC3 y Sp7 en medio NFb, y las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 en medio LGI-P líquido con agitación (60-90 rpm) a 30°C durante 120 h, tomándose alícuotas cada 24 h. Para determinar los niveles de polifosfato intracelular se utilizó la sonda DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), y luego se midió la absorbancia por espectrofluorometría. Brevemente, las alícuotas fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min y las células obtenidas fueron lavadas dos veces con *buffer* Tris HCl 0,1 M pH 8 a 10.000 rpm por 5 min. Las células fueron re-suspendidas en cantidad necesaria del mismo *buffer* para obtener $DO_{560\text{ nm}}=0,02$ para 2 ml de volumen final. Se mezclaron las muestras con la sonda DAPI 1,25mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1% y cloroformo. Luego de 5 min en oscuridad con agitación se obtuvieron los espectros para cada muestra con λ excitación = 415 nm y λ emisión = 545 nm. El ensayo completo se repitió 2 veces.

Para determinar la acumulación del polifosfato intracelular utilizando distintas concentraciones de fósforo, se hicieron crecer las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y 16D10, en medio LGI-P líquido con 1, 10 y 30 mM de fosfato, en agitación (150 rpm) a 30°C durante 96 h, tomándose alícuotas cada 24 h. Se utilizó el protocolo descrito anteriormente. El ensayo completo se repitió 2 veces.

7. Formación de biopelícula sobre superficie inerte

La formación de biopelícula fue determinada en base a la habilidad de las células de adherirse y crecer en una superficie (O'Toole y Kolter, 1998). Cultivos en fase estacionaria de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y 16D10, crecidos en medio de cultivo líquido LGI-P fueron diluidos a una $DO_{560nm}=0,1$ (aproximadamente a $5-6 \times 10^7$ UFC/ml) en medio LGI-P con 1, 10 y 30 mM de fósforo soluble ($K_3H_3(PO_4)_2$) sin agitación a 30°C en placa de microtitulación y tubos de vidrio por 48 h. Luego de remover las células libres y lavar tres veces con agua destilada, se realizó la cuantificación de las células. Se agregó solución de Cristal Violeta 0,1 % a cada placa o tubo y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad. Luego las placas y tubos fueron lavados nuevamente tres veces con agua. El Cristal Violeta adsorbido se extrajo con etanol 95 % y se midió la absorbancia a 595 nm (SpectraMax Plus384 Absorbance Microplate Reader, US). Se realizaron 6 réplicas por condición de cada experimento.

8. Evaluación de la adhesión de PGPB en raíces de plantas de frutilla

Vitroplantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) cv. 'Pájaro' fueron colocadas asépticamente en frascos de vidrio (400 ml) conteniendo 100 ml de solución nutritiva Hoagland (Bussler y Epstein, 1972) pH 6, suplementada con 1 mM y 30 mM de fósforo soluble. Tres plantas de cada variación de la solución de Hoagland fueron inoculadas con 1 ml de suspensión de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10^8 UFC/ml). Una planta sin inocular en solución conteniendo 1 mM de fósforo fue utilizada como control. Luego de 72 h en cámara de crecimiento a 24°C y fotoperiodo de 16 h luz, se tomaron muestras de raíces por triplicado, las cuales fueron lavadas, fijadas y recubiertas para ser observadas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Para MEB, las raíces fueron fijadas con glutaraldehído 2,5 % y paraformaldehído 2,5 %, acetona y etanol deshidratado, y recubierto con oro JFC100 (JEOL). Las raíces que contenían las bacterias fueron unidas a soportes de aluminio y se analizaron usando microscopio electrónico Carl Zeiss SUPRA-55 perteneciente al CIME (UNT-CONICET-Argentina) con resolución de 1 nm a 15 kV y 1,7 nm a 1 kV en modo de alto vacío (HV) y 2 nm a 30 kV en modo de presión variable (VP).

9. Determinación de la producción de sideróforos totales

La producción de sideróforos se evaluó utilizando la técnica universal del Cromo Azurol Sulfonato (CAS, Sigma-Aldrich, USA) en medio sólido (Schwyn y Neilands, 1987) modificada por Pérez-Miranda y col. (2007). El fundamento de esta técnica está

basado en el cambio de color (de azul a naranja o de azul a violeta) que ocurre cuando el complejo CAS-hierro sufre un cambio de conformación debido a la captación del hierro por parte del sideróforo bacteriano. La preparación de los reactivos se realizó utilizando recipientes libres de hierro, tratados con HCl 1M y enjuagados tres veces con agua destilada pH 7. La solución del colorante CAS 10X se preparó de la siguiente manera: 60,5 mg de CAS se disolvieron en 50 ml de agua destilada pH 7 y se mezclaron con 10 ml de una solución de hierro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM en HCl 10 mM). Esta solución se mezcló lentamente con 72,9 mg de HDTMA (bromuro de hexadeciltrimetil amonio; Sigma-Aldrich, USA) previamente disuelto en 40 ml de agua destilada pH 7. La solución CAS resultante se esterilizó a vapor fluente durante 20 minutos. Se preparó 30,24 g/l de PIPES (ácido 1,4-piperazina dietano sulfónico; Sigma-Aldrich, USA) con 3 ml de NaOH 50% (p/v) hasta alcanzar un valor de pH de 6,8, se esterilizó a presión de vapor saturada 20 min a 1 atm y luego se mezcló con la solución CAS 10X (10:1).

Las bacterias de las cepas *A. brasilense* Sp7 y REC3 y de las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 fueron crecidas en medio de cultivo líquido NFb y LGI-P sin agregado de hierro, respectivamente. Al cabo de 24 – 48 h se ajustó la $\text{DO}_{560 \text{ nm}} = 0,2$ y se sembró una alícuota de 10 μl por triplicado en placas de Petri conteniendo medios de cultivo sólido NFb y LGI-P sin agregado de hierro. Las placas se colocaron en estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h, concluida la incubación se agregó el PIPES más la solución CAS para poner en evidencia los sideróforos producidos y nuevamente se llevó a estufa a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Pasado este tiempo se observó la producción de sideróforos por la formación de un halo amarillo o violeta alrededor de las colonias.

10. Producción de sideróforos de tipo catecol en medio líquido

Para determinar la producción de sideróforos de tipo catecol, se utilizó la técnica de Arnou (1937). Brevemente se pre-trató el material de vidrio utilizado con HCl 10% para eliminar las trazas de hierro que pudieran contener; las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo líquido NFb y LGI-P sin hierro para las cepas Sp7 y REC3 y para las cepas PAL5 y 16D10, respectivamente. Al cabo de 48 h se centrifugaron los cultivos a 10.000 rpm durante 15 min para obtener el sobrenadante. En un frasco se colocaron 500 μl del sobrenadante y se agregaron 500 μl de HCl 0,5 M, luego de mezclar se agregaron 500 μl del reactivo (NaNO_2 10% + $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10% en H_2O destilada). Luego de mezclar se agregaron 500 μl de NaOH 1 N y se llevó a volumen final de 2,5 ml con agua destilada. Se realizó una curva patrón con ácido 2,3-dihidroxibenzoico y se midió la absorbancia a 510 nm.

11. Inoculación con PGPB a plantas de frutilla crecidas en distintas condiciones nutricionales

Vitroplantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) Cv. 'Pájaro' de 6 meses de edad fueron evaluadas para corroborar la ausencia de microorganismos, sembrando macerados de raíces y hojas en medio agar triptona de soja sólido (TSA) e incubando a 30°C por 120 h; sólo las plantas libres de microorganismos fueron usadas en los experimentos.

11.1. Participación de *G. diazotrophicus* en la nutrición con fósforo

Las plantas fueron aclimatadas en sustrato químicamente inerte (4:1, arena:perlita), y regadas con Solución Nutritiva Fåhraeus (Fåhraeus, 1957) (SNF) con las siguientes modificaciones: 1- SNF sin agregado de fósforo (P₀), 2- SNF con agregado de fósforo soluble K₃PO₄ (Ps) y 3- SNF con agregado de fósforo insoluble Ca₃(PO₄)₂ (Pi). Al concluir el periodo de aclimatación se completaron los tratamientos inoculando un lote de plantas regadas con Pi y con *G. diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) (Pi + PAL5) y otro lote de plantas regadas con Pi y con la cepa 16D10 (10⁸ UFC/ml) (Pi + 16D10). Así se completaron 5 tratamientos en la etapa 1: P₀, Ps, Pi, Pi + PAL5 y Pi + 16D10. Luego de 50 días, un lote de 10 plantas P₀ con síntomas de deficiencia de P fueron regadas con SNF con agregado de fósforo soluble K₃PO₄ (P₀ + Ps*), y un lote 10 de plantas Pi fueron inoculados con PAL5 (Pi + PAL5*) para procurar revertir los síntomas de deficiencia mostrados. El ensayo duró 70 días y se evaluaron los siguientes parámetros: índice de crecimiento, acidificación radicular, superficie radicular, observación de pelos radiculares, recuento de diazótrofos en raíces (NMP), índice de verdor, contenido de fósforo en raíces y hojas. El ensayo se repitió 2 veces utilizando un diseño experimental completamente al azar.

11.2. Participación de *G. diazotrophicus* y *A. brasilense* en la nutrición con hierro

Durante el ensayo de aporte de hierro por PGPB, las raíces de las plantas seleccionadas fueron lavadas en agua destilada estéril para quitar el excedente de sustrato en el que fueron fijadas y crecidas. Luego de secar las raíces con papel absorbente, se colocaron en hidroponía con Solución Nutritiva Hoagland (Bussler y Epstein, 1972) (SNH) con las siguientes modificaciones, según los tratamientos: 1- SNH sin agregado de hierro (Fe₀); 2- SNH con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂ (FeD); y 3- SNH con agregado de hierro insoluble FeSO₄ (FeND). Además se inocularon 2 lotes de plantas, por inmersión durante 10 minutos, con las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilense* REC3, completando los tratamientos: 4- SNH +

hierro insoluble FeSO_4 e inoculadas con la cepa PAL5 (10^8 UFC/ml) (FeND + PAL5); y 5- SNH + hierro insoluble FeSO_4 e inoculadas con la cepa REC3 (10^6 UFC/ml) (FeND + REC3). Así se obtuvieron 5 tratamientos: Fe0, FeD, FeND, FeND + PAL5 y FeND + REC3. El ensayo duró 80 días y pasado ese tiempo se evaluaron los siguientes parámetros: síntomas de deficiencia de hierro, biomasa (aérea, radicular y total), índice de crecimiento, superficie radicular, observación de pelos radiculares, número de diazotrofos inoculados, índice de verdor y contenido de hierro total. El ensayo se repitió 2 veces utilizando un diseño experimental completamente al azar.

12. Parámetros evaluados en los ensayos de inoculación con PGPB

12.1. Índice de crecimiento (IC): las plantas fueron removidas de las macetas y el sustrato fue retirado cuidadosamente. Las raíces se lavaron con agua destilada y fueron secadas con papel absorbente. Luego fueron secadas en estufa 60°C hasta peso constante. El IC fue calculado a partir del peso seco de la biomasa total de las plantas obtenidas al comienzo (B_1) y al final del ensayo (B_2), de acuerdo con la fórmula: $\text{IC} = (B_2 - B_1) / B_1$.

12.2. Acidificación radicular: para el ensayo de acidificación de la rizósfera, plantulas de frutilla fueron crecidas durante 10 días, recibiendo los mismos tratamientos descritos en el bioensayo. Se utilizó azul de bromotimol como indicador de pH para conocer si las raíces de frutilla eran capaces de acidificar el medio en presencia o ausencia de nitrato de potasio. El sistema radicular de 5 plántulas, una de cada tratamiento, fueron colocadas en íntimo contacto en una placa de Petri conteniendo 20 ml de agua destilada pH 7, el indicador de pH y 0,9 % de agar. Otras 5 plántulas fueron colocadas en similares condiciones, pero suplementadas con 1 mM KNO_3 . Las placas fueron cubiertas con papel aluminio, quedando la parte aérea sin cobertura, y colocadas en cámara de cría por 24 h, al cabo de las cuales se verificó el cambio de color del indicador de pH y se fotografiaron. El ensayo fue repetido dos veces.

12.3. Superficie radicular y observación de pelos radiculares: la superficie radicular fue determinada con el método gravimétrico descrito por Carley y Watson (1966). Los resultados fueron expresados como g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ adsorbidos a las raíces. Para observar la proliferación de pelos radiculares, muestras de raíces fueron lavadas con agua corriente, secadas con papel absorbente y luego teñidas con Cristal Violeta 0,2 % por 5 min y lavadas con agua corriente. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con glicerol 30 % y observadas con microscopio óptico a 400X (Zeiss, Germany).

12.4. Recuento de diazótrofos (NMP): al final de los ensayos, muestras de raíces fueron colectadas y procesadas de acuerdo con Pedraza y col. (2007) para obtener el NMP en medios de cultivo LGI-P y NFb semisólidos (Baldani y col., 2014b), utilizando la Tabla de McCrady para 3 repeticiones.

12.5. Índice de verdor: esta determinación constituye una manera indirecta para medir el contenido de clorofila. En frutilla, la intensidad del color verde en hojas expresa deficiencia de P (color verde oscuro) (Ullio, 2010). El índice de verdor fue determinado con un clorilómetro Minolta SPAD 502 (Minolta, Japón). Las evaluaciones se llevaron a cabo por triplicado cada 10 días a partir del día 40 de implantado el ensayo. El color fue determinado en última hoja central completamente expandida en plantas de cada tratamiento y el resultado expresado como valores SPAD (Diodo de avalancha de un solo fotón).

12.6. Contenido de fósforo: fue determinado en raíces y parte aérea usando el método colorimétrico del vanadio-molibdato luego de digestión con ácido perclórico, de acuerdo con Estefan y col. (2013).

12.7 Contenido de hierro: fue determinado en la planta completa por espectrofotometría de absorción atómica luego de calcinación de los tejidos de acuerdo con Estefan y col., (2013).

12.8 Análisis estadístico: los resultados fueron evaluados utilizando el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Cuando las diferencias fueron significativas, se aplicó test de Tukey ($p \leq 0.05$). Ambos análisis fueron realizados usando el software InfoStat versión 2015 (Di Rienzo y col., 2015). Para comparar el efecto simultáneo de los diferentes tratamientos en la nutrición con P (por ej. P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhraeus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico insoluble; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo P_i e inoculada con *G. diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo P_i e inoculada con la cepa mutante 16D10), se realizó un Análisis de los Componentes Principales (ACP) usando el software estadístico R (RStudio Team, 2015). Para identificar los Componentes Principales, se usaron la regla de corte de Kaiser y la prueba de Scree junto con el % de varianza. Además, para identificar variables de cada componente, se aplicó el modelo de vara quebrada. La interpretación y evaluación del ACP fue graficada en el mapa de factor de variables y en el mapa de factor de individuos usando el paquete FactoMiner en el software estadístico R.

IV-RESULTADOS

1. Curvas de crecimiento y recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)

Las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3 entraron en fase exponencial de crecimiento luego de 18 h en agitación a 60 rpm, alcanzando la fase estacionaria a las 30 h (Figura 5-A). Las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y 16D10 luego de 48 h de crecimiento en agitación a 90 rpm continuaron en fase exponencial, alcanzando la fase estacionaria al cabo de 120 h (Figura 5-B). Se observó que luego de 24 h de crecimiento en agitación, las cepas Sp7 y REC tuvieron el mayor número de UFC a las 24 h (Figura 6-A); mientras que la cepa PAL5 tuvo su máximo valor a las 36 h y la cepa mutante 16D10 a las 48 h (Figura 6-B).

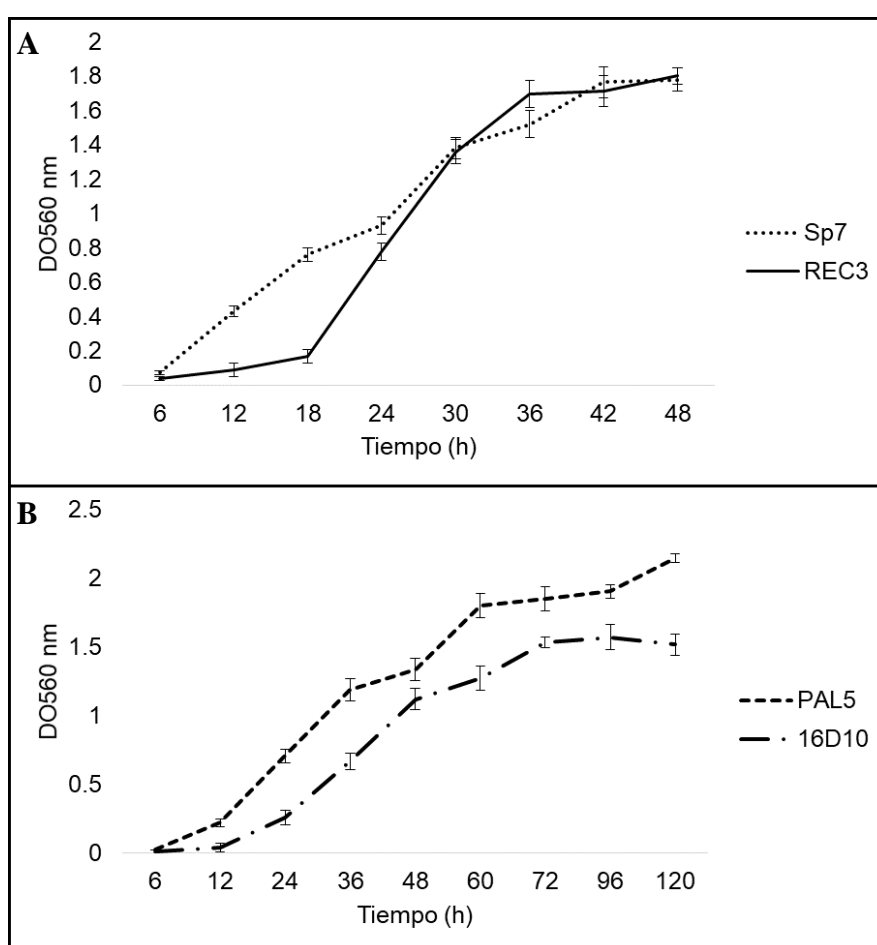


Figura 5. Crecimiento de las cepas en estudio. Densidad óptica medida a 560 nm de longitud de onda en función del tiempo de crecimiento de las cepas. **A.** Curvas de crecimiento de las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3. **B.** curvas de crecimiento de las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y su mutante 16D10.

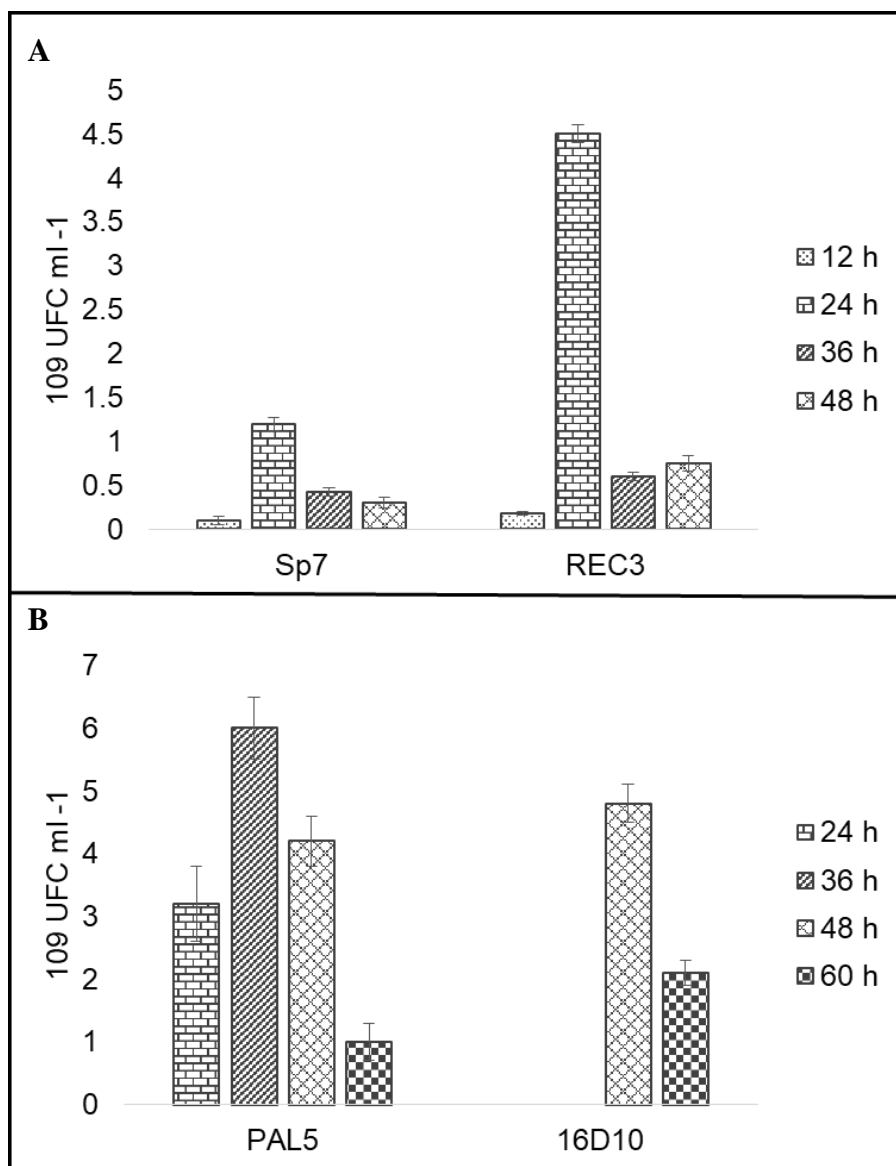


Figura 6. Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en función del tiempo de las cepas en estudio. **A.** UFC de las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3, crecidas en medio NFb líquido. **B.** UFC de las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y su mutante 16D10, crecidas en medio LGI-P líquido.

2. Solubilización de fosfatos en medio sólido

Las cepas *A. brasilense* Sp7 y REC3 al igual que la cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10, no mostraron halos de solubilización alrededor de las colonias en el medio de cultivo con ninguna de las fuentes de fosfato insoluble utilizadas (Figura 7). Por el contrario, la cepa *G. diazotrophicus* PAL5 fue capaz de solubilizar todas las fuentes de fosfato insoluble, siendo mayor la solubilización en el medio conteniendo fosfato dicálcico y menor en el medio con Escorias Thomas y fosfato de hierro. El índice de solubilización de fosfatos de cada cepa se muestra en la Tabla 1.

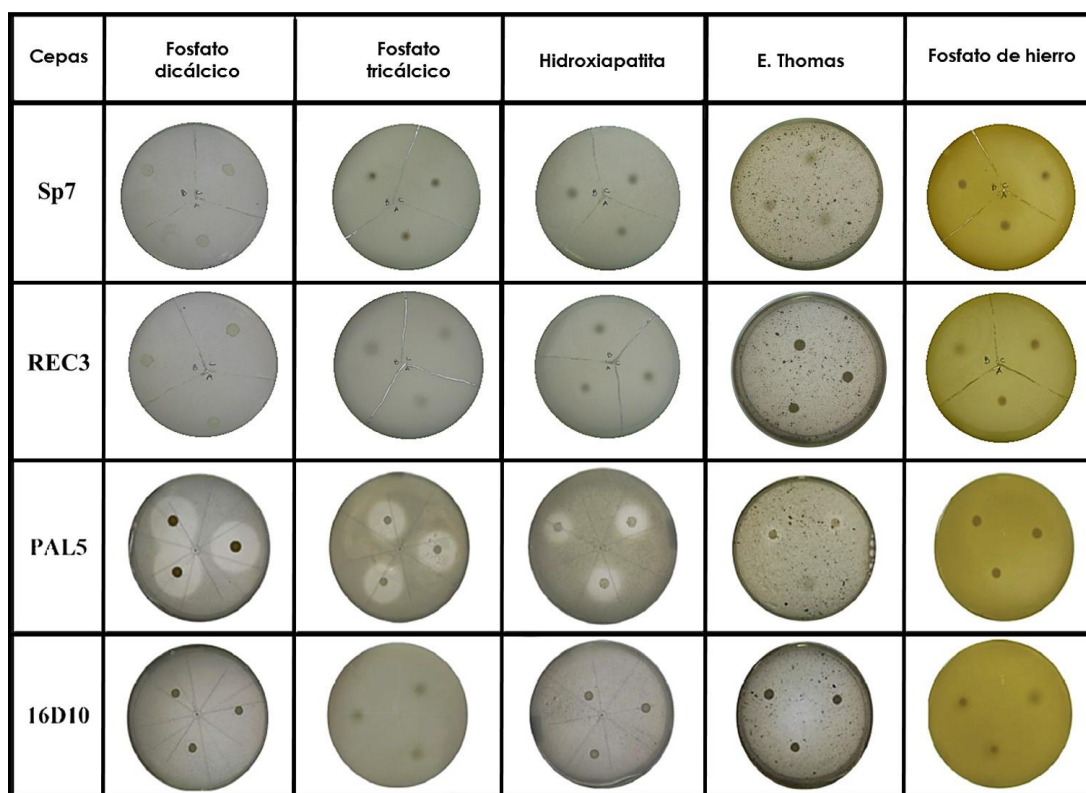


Figura 7. Solubilización de distintas fuentes fosfatadas por las cepas en estudio. Fotos de colonias sembradas por triplicado de cada cepa en medio NBRIP sólido con distintas fuentes de fosfato insoluble. Cepas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y mutante *G. diazotrophicus* 16D10, *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3.

Tabla 1. Índice de solubilización de las distintas cepas en medio NBRIP con distintas fuentes de fosfato (IS = Diámetro del halo/Diámetro de la colonia). Cepas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y mutante *G. diazotrophicus* 16D10, *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3.

Cepas	Fosfato dicálcico	Fosfato tricálcico	Hidroxiapatita	Escorias Thomas	Fosfato férrico
Sp7	NS	NS	NS	NS	NS
REC3	NS	NS	NS	NS	NS
PAL5	9,23 ± 0,89A	6,84 ± 0,30B	2,82 ± 0,29C	1,11 ± 0,05D	1,20 ± 0,05D
16D10	NS	NS	NS	NS	NS

Los valores corresponden al promedio de 3 repeticiones y su desvío estándar. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey con un valor $p = 0,05$. NS: no se observó solubilización.

3. Solubilización de fosfatos en medio líquido

Se observó que el sobrenadante del medio de cultivo NBRIP líquido sembrado con *G. diazotrophicus* PAL5 presentó variaciones en el contenido de fósforo libre y que el pH del medio disminuyó de 7 a 4,5 luego de 96 h de crecimiento (Figuras 8-A y B). Por el contrario, en los medios sembrados con las cepas *A. brasilense* Sp7 y REC3, al igual que con *G. diazotrophicus* 16D10, los sobrenadantes no presentaron variaciones en el contenido de fósforo libre y el pH del medio de cultivo se mantuvo constante hasta las 96 h (Figuras 8-A y B). Visualmente se observó un cambio de color en el medio de cultivo donde creció PAL5, pasando de blanco a ámbar (Figura 9) y al someter el sobrenadante al método colorimétrico de Ames (1966), se produjo un viraje a color azul, indicando la presencia de P libre (Figura 10).

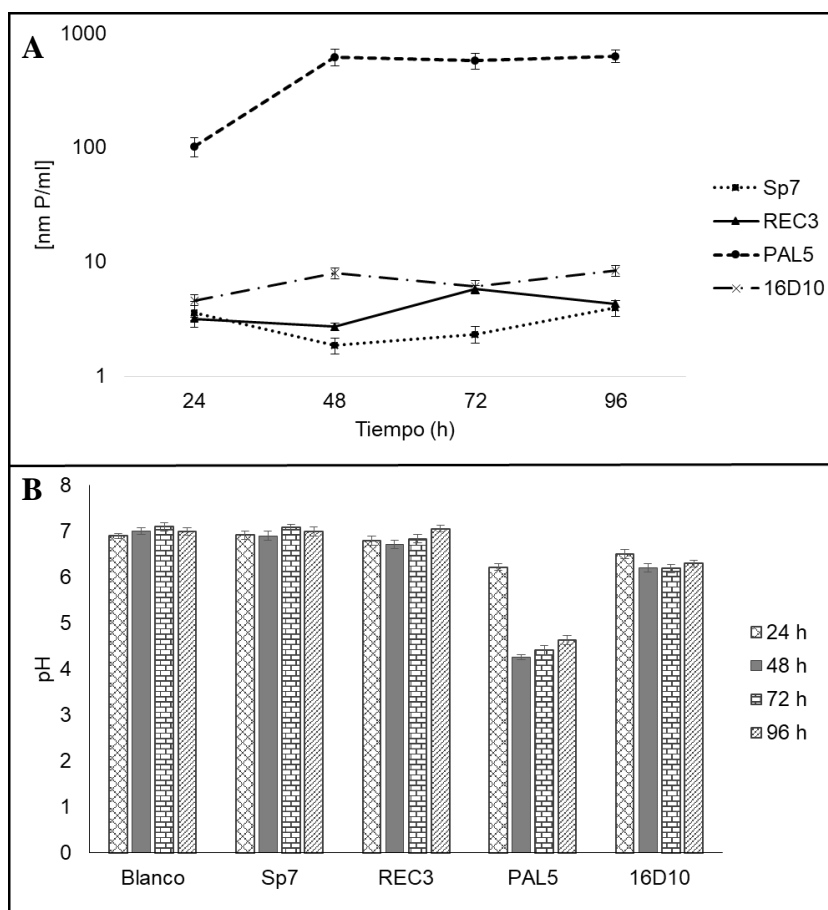


Figura 8. Contenido de fósforo libre y valores de pH. Valores obtenidos a las 24, 48, 72 y 96 h de crecimiento en medio NBRIP líquido. Cepas: *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y mutante *G. diazotrophicus* 16D10. **A.** Fósforo libre presente en los sobrenadantes. **B.** pH del medio en cada tiempo de muestreo.

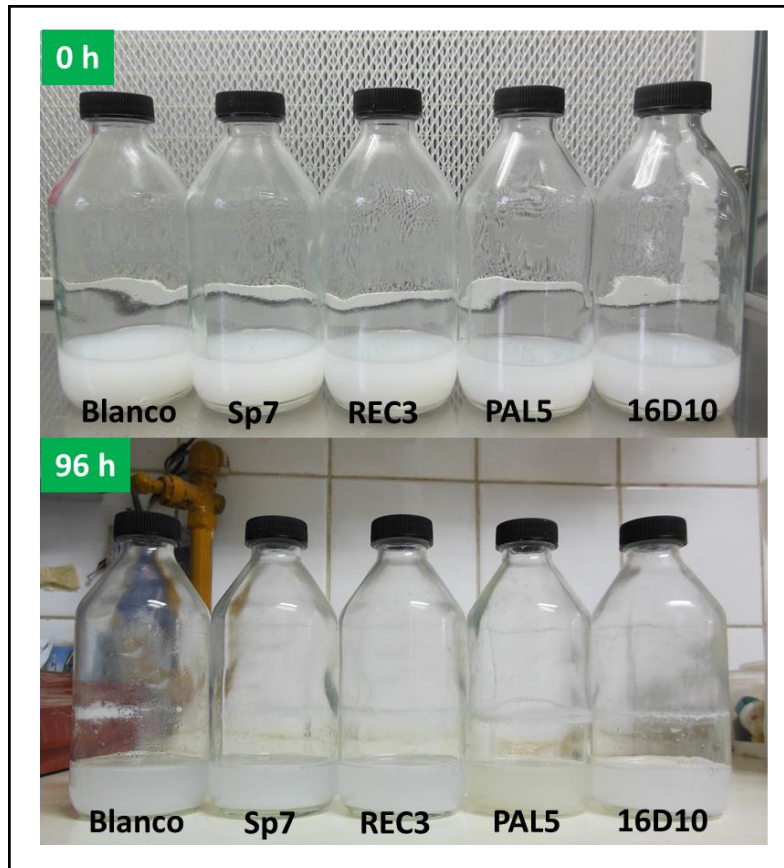


Figura 9. Solubilización del fosfato insoluble en medio líquido. Medio NBRIP líquido pH7 con fosfato tricálcico como fuente de fósforo insoluble, al momento de inocular y luego de 96 h de incubación a 30 °C con agitación. Blanco sin inocular y cepas: *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y mutante *G. diazotrophicus* 16D10.

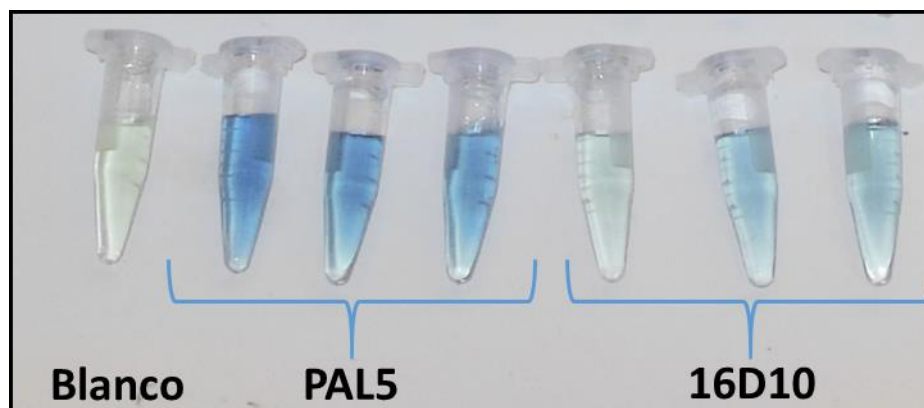


Figura 10. Obtención del fósforo soluble liberado. Muestras del sobrenadante de las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante 16D10 con 96 h de crecimiento contrastadas con el blanco (sobrenadante del medio NBRIP líquido sin inocular), luego de realizar la técnica de Ames e incubar 20 min a 45 °C. La coloración azul intensa pone en evidencia la presencia de P libre.

4. Acumulación de polifosfato intracelular en bacterias

Se observó que la cepa *G. diazotrophicus* PAL5 tiene un alto contenido de polifosfato luego de 5 h de crecimiento, el cual disminuye con el paso del tiempo (Figura 11-A). La cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10 tiene menor contenido de polifosfato que PAL5 luego de 5 h de crecimiento, pero mantiene ese nivel durante las siguientes horas muestreadas. La cepa *A. brasilense* REC3 acumula mayor contenido de polifosfato intracelular que la cepa Sp7, pero en ambas cepas decrece hasta las 120 h (Figura 11-B).

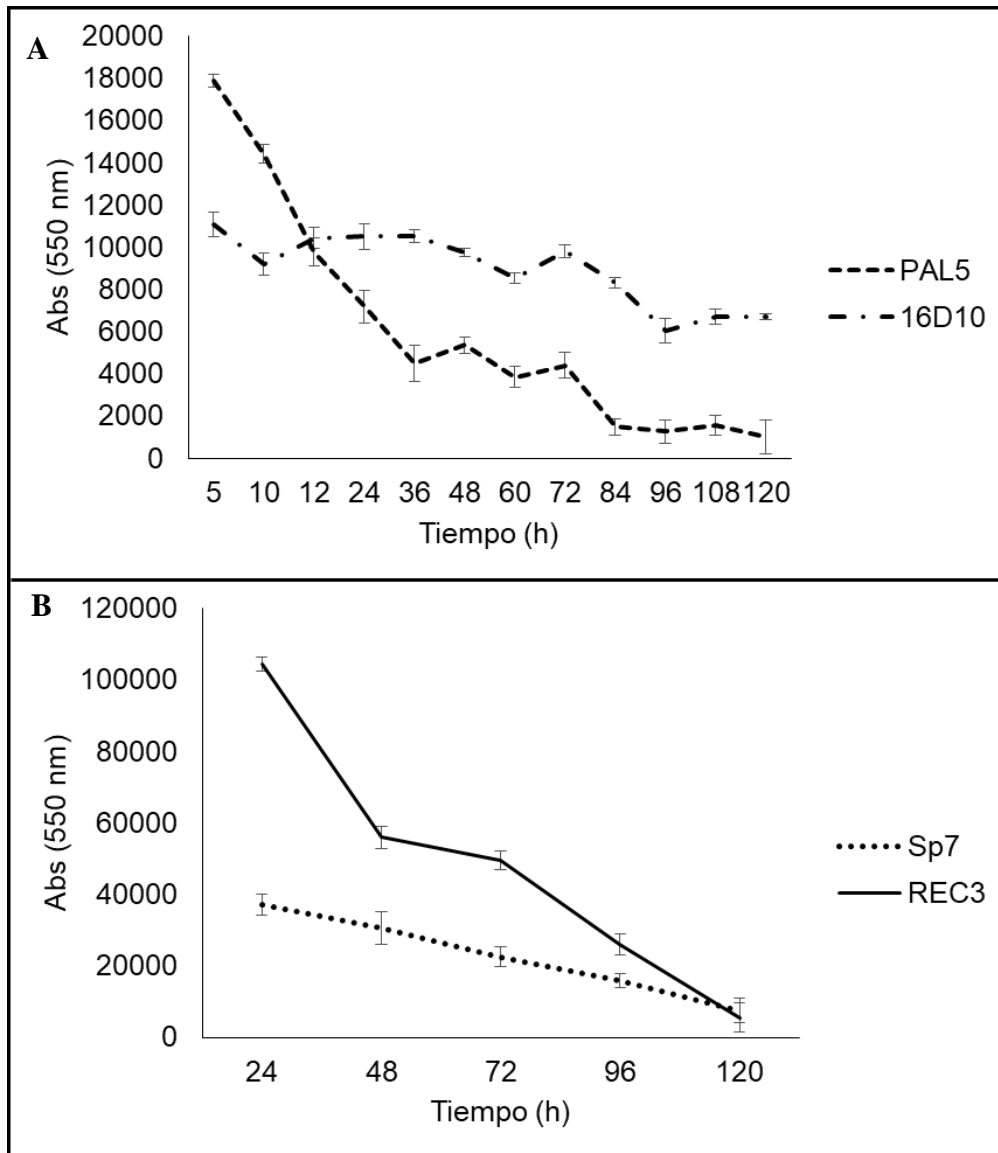


Figura 11. Niveles de polifosfato intracelular. **A.** Cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante *G. diazotrophicus* 16D10. **B.** Cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3.

5. Relación del polifosfato en la formación de biopelícula y en la adhesión a raíces de plantas de frutilla de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Debido a la elevada acumulación de polifosfato intracelular observada en la cepa *G. diazotrophicus* PAL5, y a que su mutante 16D10 no presentó variación en el nivel del mismo a lo largo del tiempo, se optó por no utilizar las cepas de *A. brasilense* en el presente estudio.

Se observó que, al aumentar el contenido de fósforo soluble en el medio de cultivo, la tasa de crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 aumenta (Figura 12-A y B). A partir de estos resultados se seleccionaron las concentraciones 1, 10 y 30 mM para continuar con los experimentos.

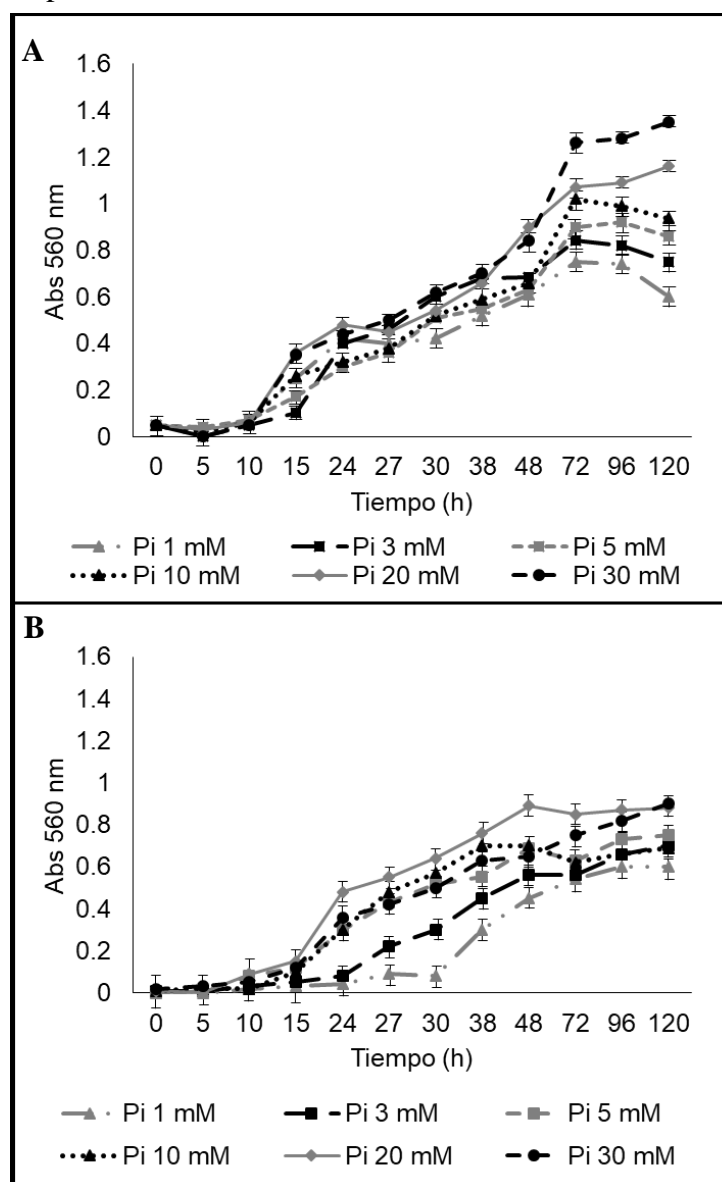


Figura 12. Curvas de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante *G. diazotrophicus* 16D10 en medio de cultivo LGI-P con distintas concentraciones de fosfato soluble, hasta las 120 h. **A.** Curvas de crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL5 con 1, 3, 5, 10, 20 y 30 mM de fosfato. **B.** Curvas de crecimiento de *G. diazotrophicus* 16D10 con 1, 3, 5, 10, 20 y 30 mM de fosfato.

Los resultados muestran en PAL5 que con concentraciones de 1mM de fósforo soluble el contenido de polifosfato se mantiene constante, mientras que con concentraciones de 10 y 30 mM de fósforo soluble el polifosfato se sintetiza hasta las 72-96 h y posteriormente se degrada (Figura 13-A). En 16D10 no se observó disminución en el contenido de polifosfato a lo largo del tiempo evaluado (Figura 13-B).

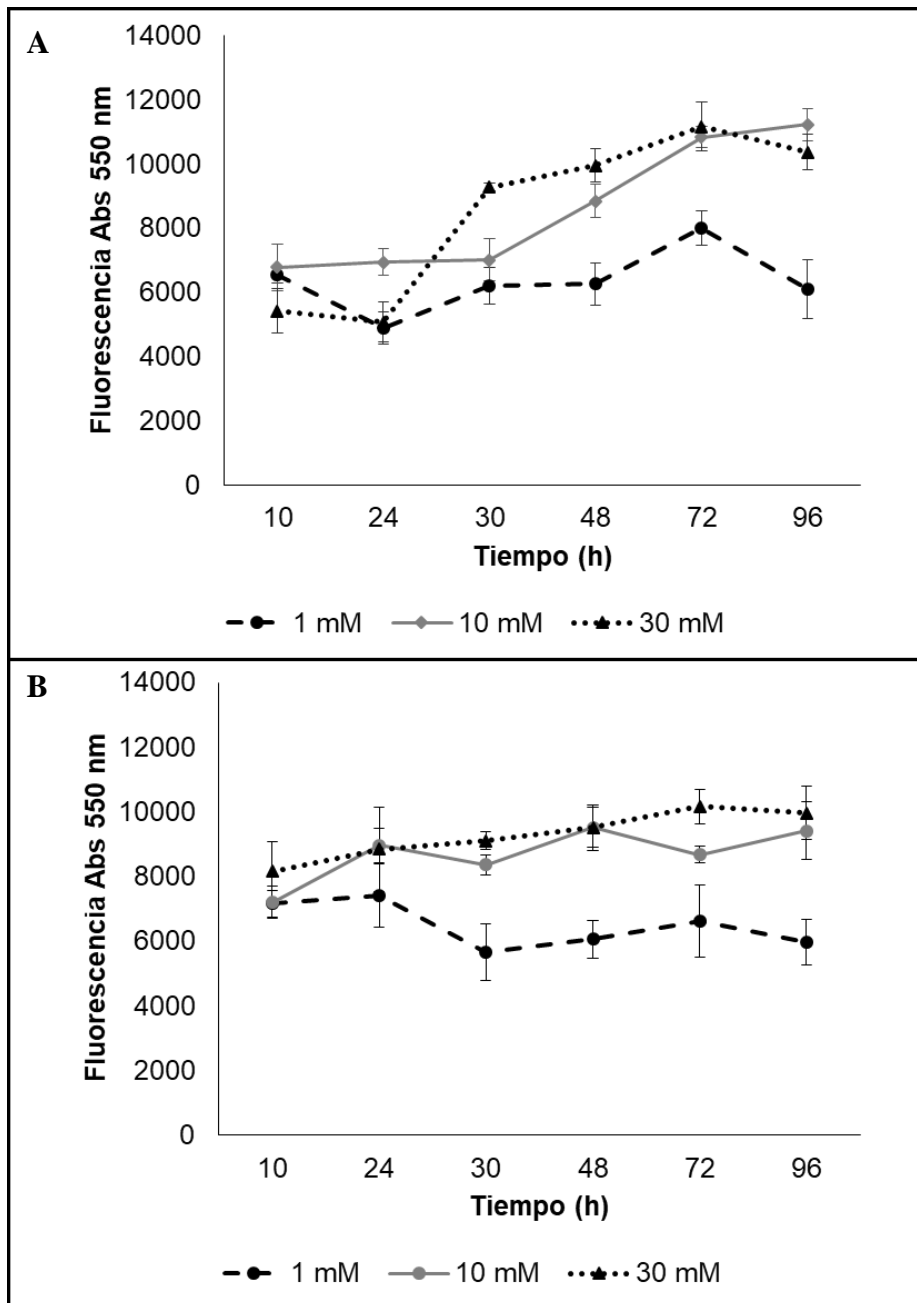


Figura 13. Niveles de polifosfato intracelular de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante *G. diazotrophicus* 16D10 en medio de cultivo LGI-P con distintas concentraciones de fosfato soluble. **A.** *G. diazotrophicus* PAL5 con 1, 10 y 30 mM de fosfato. **B.** *G. diazotrophicus* 16D10 con 1, 10 y 30 mM de fosfato.

Al evaluar la formación de biopelícula en vidrio y en poliestireno, los valores obtenidos para PAL5 en ambas superficies aumentaron al incrementar el contenido de fósforo soluble (Figura 14). Por el contrario la cepa 16D10 no varió la cantidad de biopelícula formada al incrementar el contenido de fósforo. Debido a estos resultados, en el siguiente experimento solo se utilizó la cepa PAL5.

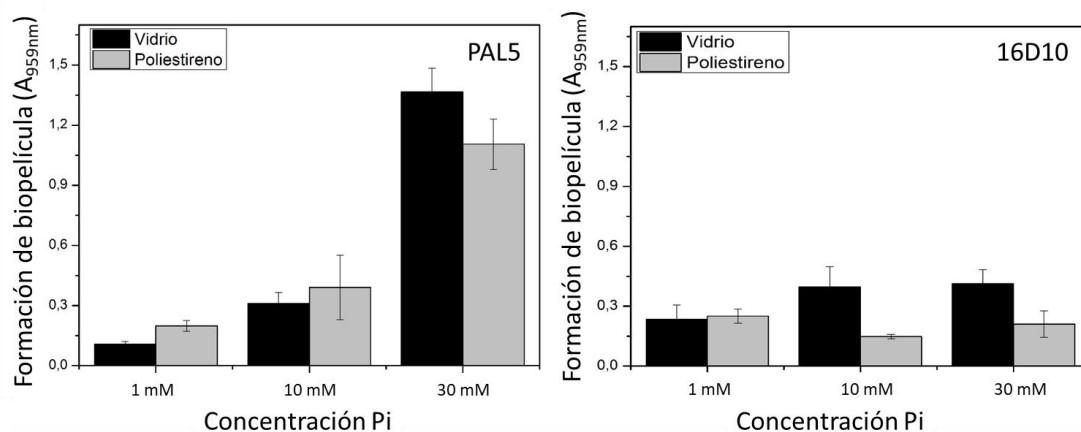


Figura 14. Formación de biopelícula en superficies inertes (vidrio y poliestireno) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y la mutante *G. diazotrophicus* 16D10; y fotos representativas de los viales de vidrio, luego de la tinción para poner en evidencia la formación de biopelícula; de izquierda a derecha: PAL5 crecida en medio suplementado con 1 mM P, PAL5 crecida en medio suplementado con 10 mM P, PAL5 crecida en medio suplementado con 30 mM P, 16D10 crecida en medio suplementado con 1 mM P, 16D10 crecida en medio suplementado con 10 mM P y 16D10 crecida en medio suplementado con 30 mM P.

Por medio de microscopía de barrido electrónico se observó que en las raíces crecidas con fosfato 1 mM, las bacterias se adhirieron formando pequeños grupos aislados (Figura 15-c y d). En las raíces crecidas con fosfato 30 mM, las bacterias formaron una abundante biopelícula (Figuras 15-e, f y g). En el control sin inocular solo se observaron exudados radiculares (Figuras 15-a y b).

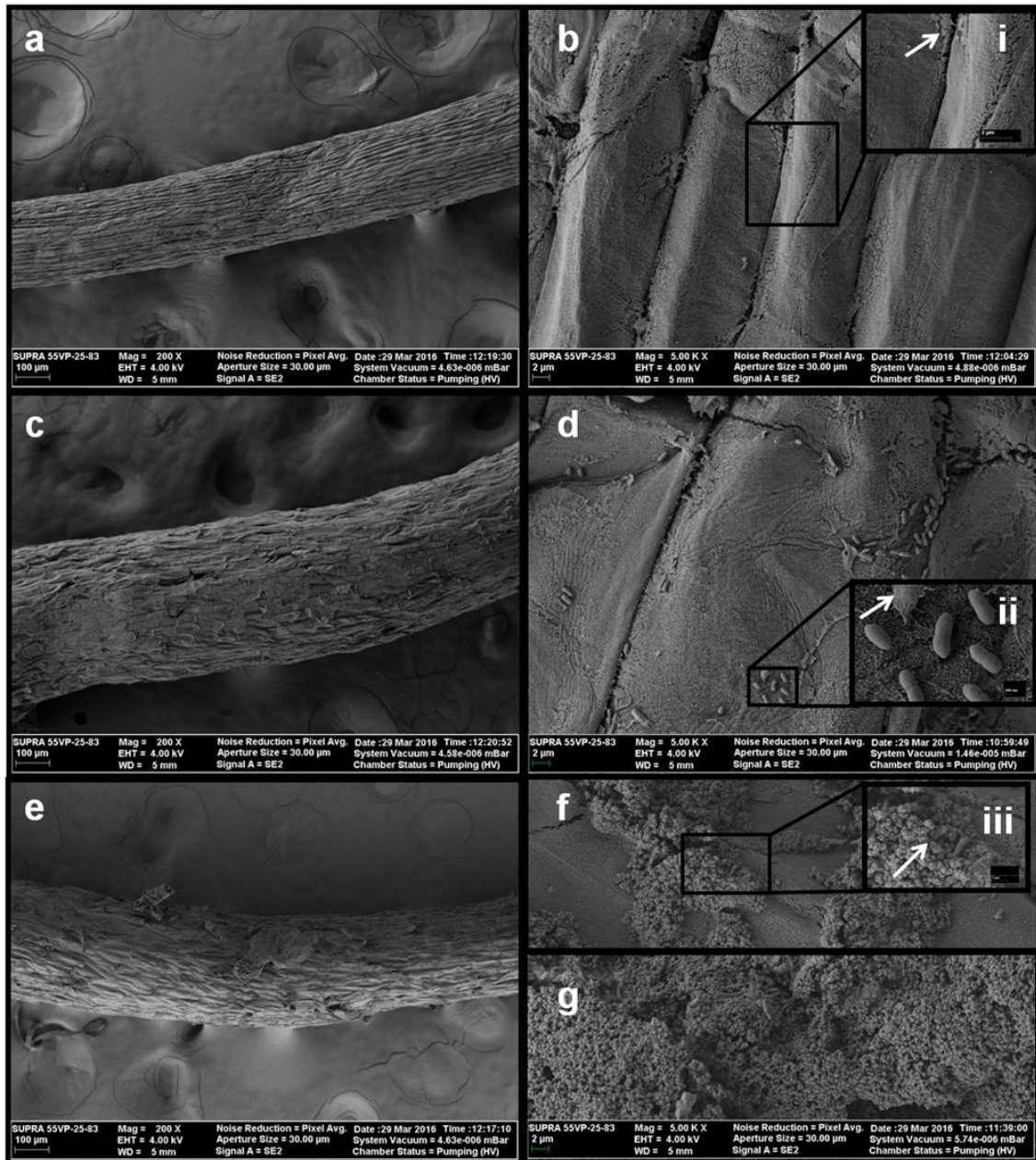


Figura 15. Adhesión de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 a raíces de frutilla bajo distintas concentraciones de fosfato soluble. **a y b.** raíz sin inocular, con fosfato 1 mM. **c y d.** raíz inoculadas con PAL5, con fosfato soluble 1 mM. **e, f y g.** raíz inoculada con PAL5, con fosfato soluble 30 mM.

6. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva de fósforo en plantas de frutilla, mediado por la solubilización de fosfatos

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos aplicados en el ensayo con plantas de frutilla, se determinó el índice de crecimiento considerando el peso seco total de biomasa al inicio y al final del experimento en cada tratamiento (Figura 16-A). El valor del índice de crecimiento más alto se observó cuando el P estuvo fácilmente disponible para las plantas ($5,44 \pm 0,08$; $p \leq 0,05$), y el más bajo, cuando no se incluyó P en la solución nutritiva (P0) ($1,16 \pm 0,04$, $p \leq 0,05$). Este mínimo crecimiento de las plantas observado en la ausencia de P se debió al P acumulado en los tejidos de la planta durante el período de crecimiento *in vitro*. Por otra parte, cuando se aplicó P insoluble (Pi), el valor fue bajo ($3,20 \pm 0,08$, $p \leq 0,05$), mientras que cuando se inoculó la cepa solubilizante PAL5 (Pi + PAL5), el índice de crecimiento ($4,16 \pm 0,06$, $p \leq 0,05$) fue significativamente mayor que el observado en Pi. Sin embargo, el valor del índice de crecimiento en la condición Pi fue cercano al observado con la adición de P insoluble más la cepa mutante 16D10 (Pi + 16D10) ($3,32 \pm 0,01$; $p \leq 0,05$). La figura 16-B muestra las plántulas en las placas de Petri con el indicador de pH azul de bromotimol. Se observan zonas claras de acidificación alrededor de las raíces debido a un cambio de color de verde-azulado (~ pH 7.0) a amarillo (~ pH 5.0). Teniendo en cuenta que la extrusión de protones raíz puede ser influenciada negativamente por la fuente de N aplicada a las plantas de frutilla (Paszt y Zurawicz, 2005), el ensayo también se realizó con KNO_3 1 mM (suplementado en la solución nutritiva Fähræus) (Figura 16-C). En este caso, también se observó acidificación de la raíz en todos los tratamientos.

Respecto a la presencia de diazótrofos, se determinó que el NMP de ellos asociados a las raíces al final del ensayo correspondió a $\log 4,97$ / g de raíz fresca en plantas inoculadas con *G. diazotrophicus* PAL5 y $\log 4,39$ / g de raíz fresca en plantas inoculadas con *G. diazotrophicus* 16D10, mientras que no se encontraron diazótrofos en plantas sin inoculación bacteriana.

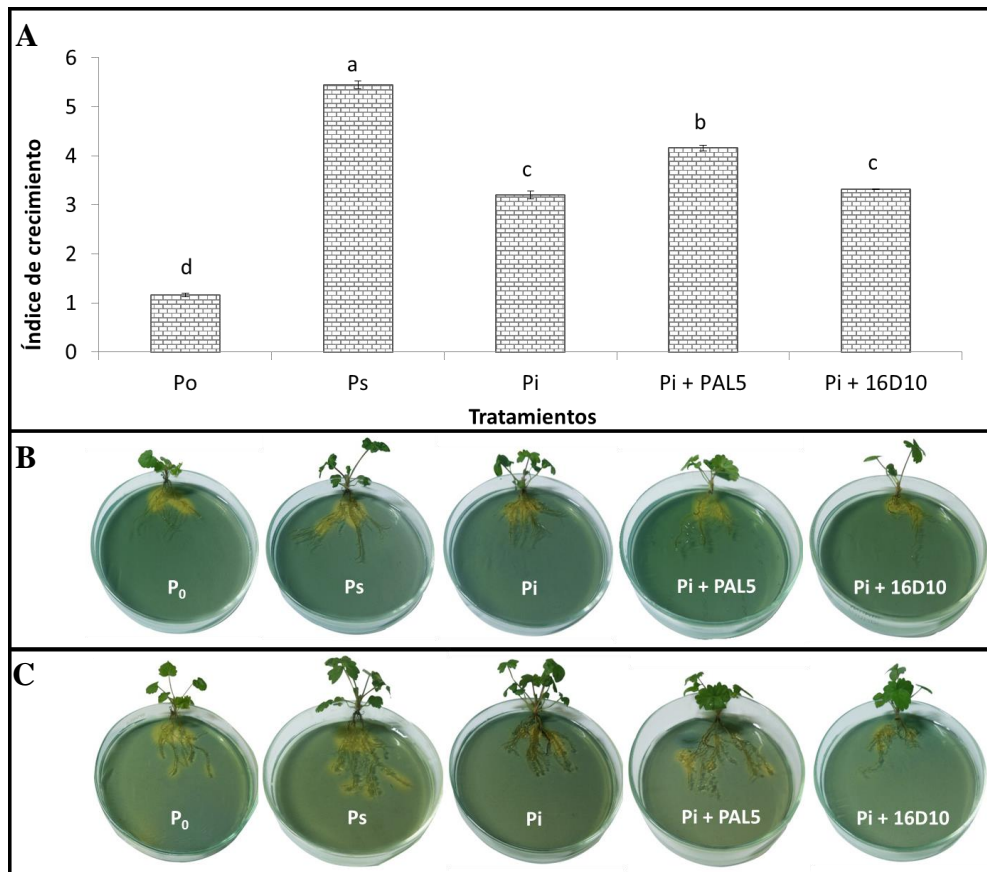


Figura 16. Índice de crecimiento y acidificación radicular en plantas de frutilla. **A.** Índice de crecimiento. Tratamientos: P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhræus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble 2 mM; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa salvaje *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa mutante defectiva en producción de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10. Los datos representan valores medios de 10 repeticiones. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor $p = 0,05$. **B.** Raíces de plántulas de frutilla en medio agarizado con azul de bromotimol, mostrando zonas claras de acidificación. **C.** Raíces de plántulas de frutilla en medio agarizado con azul de bromotimol y suplementado con 1 mM KNO₃, mostrando zonas claras de acidificación. Las plántulas del panel B y C fueron primero crecidas durante 10 días recibiendo los mismos tratamientos descritos en panel A.

Al final del ensayo también se determinó el área de la raíz. El valor más bajo se observó cuando las plantas no recibieron P en la solución nutritiva ($0,38 \pm 0,08$, $p \leq 0,05$), mientras que el valor más alto correspondió a plantas que recibieron P soluble ($1,04 \pm 0,20$; $p \leq 0,05$) (Fig. 17-A). Se observaron valores intermedios sin diferencias significativas en el resto de los tratamientos, aunque con un valor mayor cuando se aplicó la cepa PAL5 ($0,88 \pm 0,08$, $p \leq 0,05$). Se observó que cuando P está fácilmente disponible para las plantas, se favorece el desarrollo del área de la raíz, pero no la proliferación pelos radiculares, como si ocurre cuando las bacterias están involucradas en presencia de P insoluble (Figura 17-B).

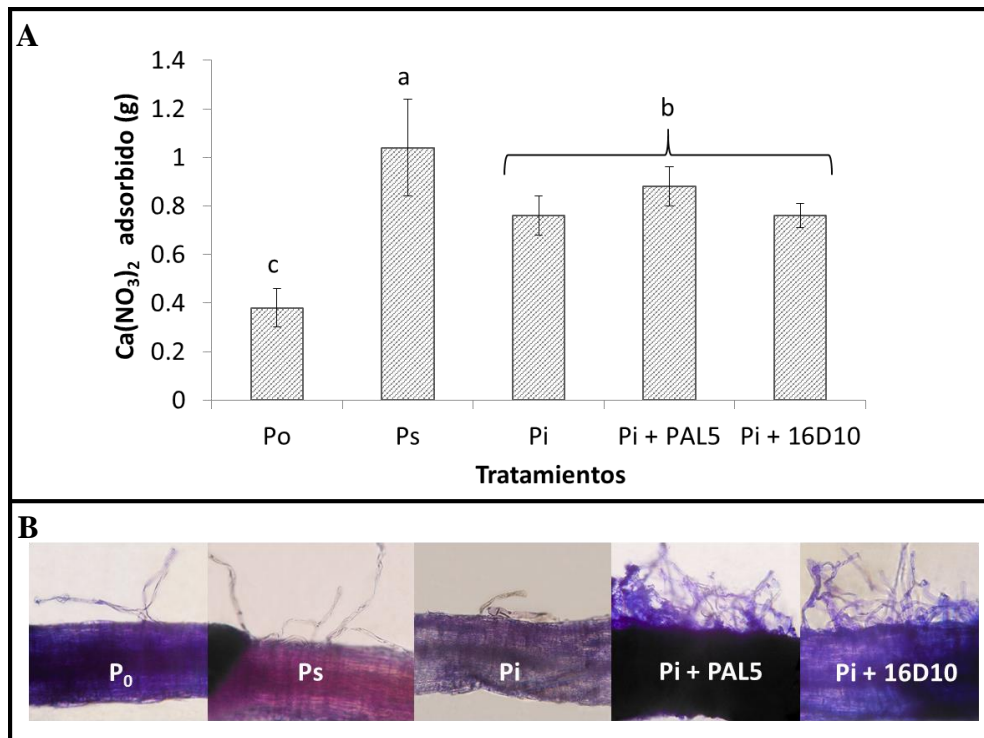


Figura 17. Superficie radicular y proliferación de pelos radicales. **A.** Área radicular determinado al final del ensayo. Tratamientos: P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhraeus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble 2 mM; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa salvaje *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa mutante defectiva en producción de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10. Los datos representan valores medios de 10 repeticiones. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor $p = 0,05$. **B.** Fotos representativas de proliferación de pelos radicales de acuerdo con los tratamientos indicados (400 x).

Para evaluar los síntomas de deficiencia de P en plantas de frutilla, también se registró el índice de verdor después de 40, 50, 60 y 70 días desde el inicio del ensayo expresado como valores SPAD. La figura 18-A muestra que, en los 40 y 70 días evaluados, los valores más altos se obtuvieron en las hojas de las plantas donde no se agregó P. Esto corresponde a un color verde oscuro, que representa síntoma de deficiencia de P. Entre los 50 y 60 días de ensayo (datos no mostrados), los valores del índice de verdor fueron similares a los obtenidos el día 70. Por otro lado, los valores más bajos se observaron en plantas que recibieron solución nutritiva suplementada con P soluble. Cuando se aplicó P insoluble (P_i), los valores SPAD fueron significativamente más bajos que los observados en las plantas sin recibir P (P₀) ($47,64 \pm 3,06$ y $51,68 \pm 2,49$, respectivamente, $p \leq 0,05$), pero significativamente mayor que cuando recibieron P (P_s) soluble ($38,56 \pm 4,64$; $p \leq 0,05$). Cuando la aplicación de P insoluble y la inoculación de *G. diazotrophicus* PAL5 se llevaron a cabo conjuntamente (P_i + PAL5), los valores SPAD fueron similares a los obtenidos cuando las plantas recibieron P soluble ($40,36 \pm 0,95$; $p \leq 0,05$). Esto demuestra la contribución de *G.*

diazotrophicus PAL5 en la solubilización del P y la nutrición de las plantas con este macro-nutriente. Se observó una situación opuesta cuando la aplicación de P insoluble y la inoculación de la cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10 se llevaron a cabo conjuntamente (Pi + 16D10). Esta cepa mutante es deficiente en la producción de ácidos orgánicos y en la solubilización de P, por lo que los valores SPAD son similares a los observados cuando las plantas solo recibieron P insoluble, indicando deficiencia de P en las mismas ($45,32 \pm 2,92$; 0,05).

Después de 50 días desde el inicio del ensayo, un conjunto adicional de 10 plantas de frutilla, que crecieron sin la adición de P en la solución nutritiva, recibió P soluble (P0 + Ps *) y otro conjunto extra de 10 plantas creciendo con la adición de P insoluble se inocularon con *G. diazotrophicus* PAL5 (Pi + PAL5 *). Continuaron creciendo bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas anteriormente y cada 10 días se evaluó el índice de verdor (Figura 18-B). Después de 20 días (70 d en total), los valores SPAD disminuyen 14,40% en las plantas que recibieron P soluble (Fig. 18-B). Sin embargo, cuando se inoculó la cepa bacteriana PAL5, no se observó una reversión de la deficiencia de P a través de la evaluación del índice de verdor. Para contrastar los resultados de la deficiencia de P en hojas de frutilla observada por el índice de verdor, se determinó el contenido de P. Al final del ensayo se evaluó el contenido total de P, incluyendo raíces y parte aérea (Fig. 19-A). En todos los tratamientos que recibieron P soluble o insoluble, se acumularon preferentemente en la parte aérea en lugar de raíces. El valor más alto se observó cuando se aplicaron P soluble y P insoluble inoculado con la cepa PAL5 (Ps y Pi + PAL5) ($0,64 \pm 0,04$ y $0,34 \pm 0,01$ b, respectivamente; $P \leq 0,05$). Los valores de las plantas tratadas con P (Pi) insoluble ($0,21 \pm 0,03$, $p \leq 0,05$) fueron similares a las plantas tratadas con la cepa 16D10 ($0,23 \pm 0,03$, $p \leq 0,05$). Probablemente, la acidificación de la rizósfera también contribuyó a la disponibilidad de P para las plantas, aunque en una cantidad menor en comparación con el efecto ejercido por la cepa solubilizadora PAL5 que mostró 61,90% de P sobre el tratamiento que recibió P insoluble y 47,82% de P Sobre el P insoluble y la cepa mutante. Además, en el conjunto extra de plantas de frutilla, donde se evaluó el índice de verdor, también se evaluó el contenido de P (Fig. 19-B). Se observó un incremento significativo de P total, incluyendo raíces y parte aérea, después de agregar P soluble a las plantas sin recibir P en la solución nutritiva (P0 + Ps *) (de $0,04 \pm 0,01$ a $0,29 \pm 0,03$, $p \leq 0,05$) y al inocular las plantas que crecen en P insoluble con PAL5 (Pi + PAL5 *) (de $0,15 \pm 0,01$ a $0,27 \pm 0,01$, $p \leq 0,05$). Estos resultados mostraron que *G. diazotrophicus* PAL5 puede contribuir a la nutrición de P en plantas de frutilla a través de sus mecanismos directos de solubilización de P.

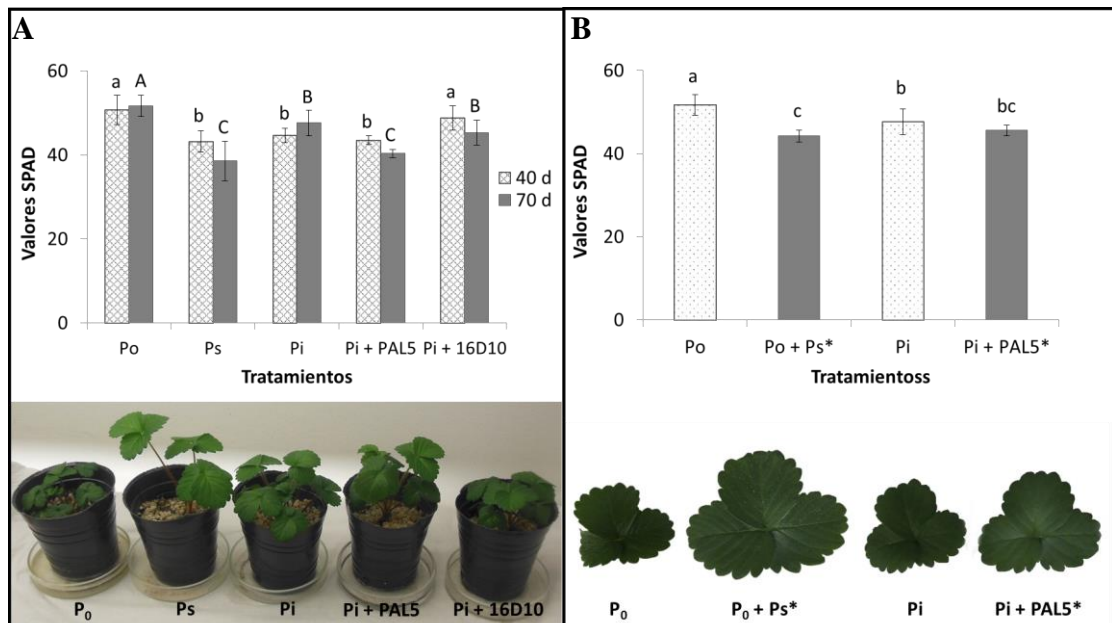


Figura 18. Índice de verdor, desarrollo de plantas y hojas. **A.** Índice de verdor en plantas de frutilla luego de 40 y 70 días desde el comienzo del ensayo y fotografías representativas de las plantas luego de 70 días de crecimiento. Tratamientos: P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhraeus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble 2 mM; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa salvaje *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa mutante defectiva en producción de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10. **B.** Luego de 50 días desde el inicio del ensayo, un set extra de 10 plantas creciendo sin fósforo en la solución nutritiva, recibieron P_s (P₀ + P_s*), y otro set de 10 plantas creciendo con la adición de fósforo insoluble, fueron inoculadas con *G. diazotrophicus* PAL5 (P_i + PAL5*). Los tratamientos con asterisco corresponden a valores de índice de verdor determinados luego de 70 días de crecimiento, los otros corresponden al día 50. Fotos representativas de hojas con diferentes tamaños y colores, de acuerdo con el tratamiento aplicado al final del ensayo. Los datos representan valores medios de 10 repeticiones. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

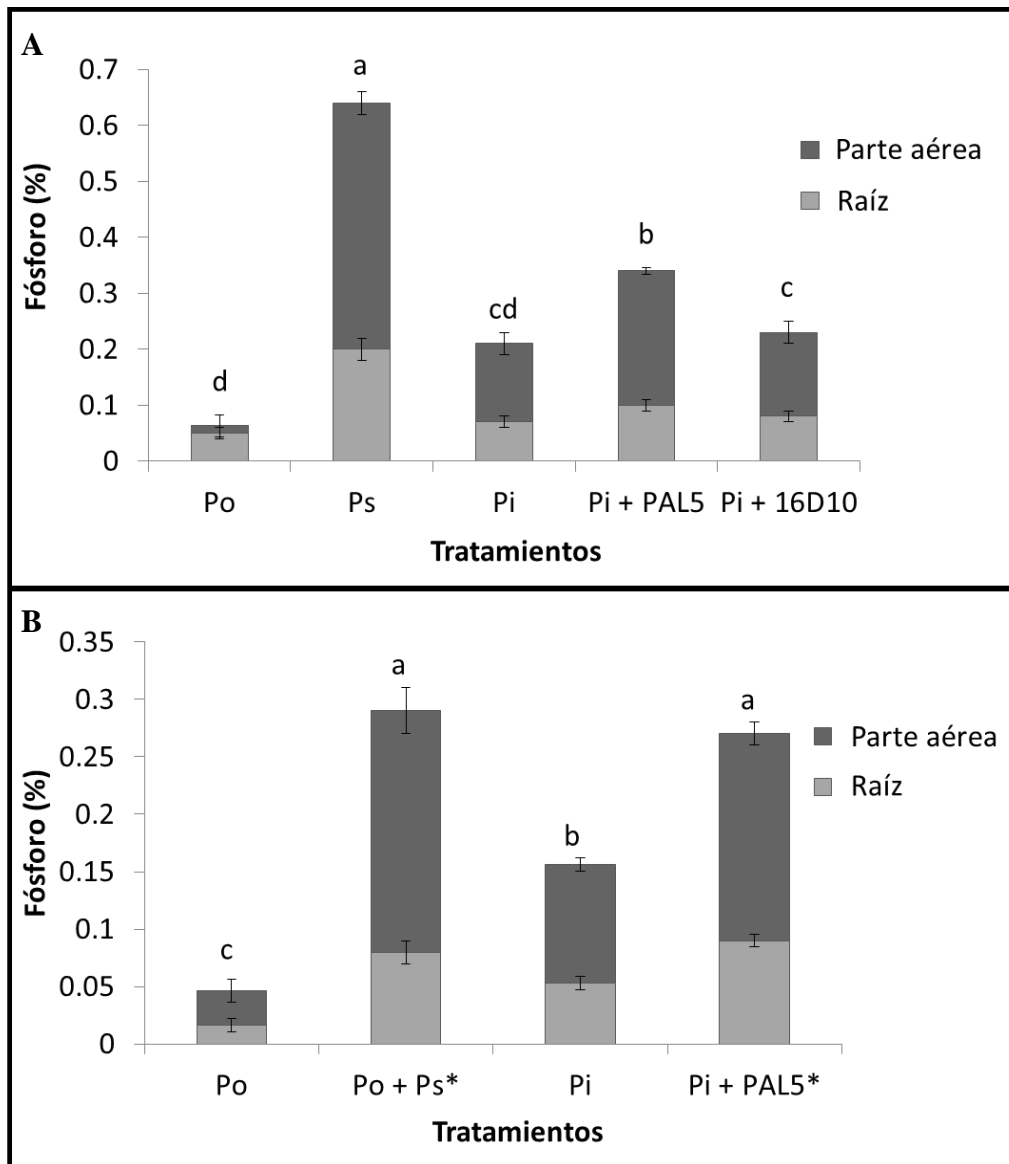


Figura 19. Contenido de fósforo en plantas de frutilla. **A.** Contenido de P en raíces y parte aérea, determinado al final del ensayo. Tratamientos: P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhraeus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble 2 mM; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa salvaje *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa mutante defectiva en producción de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10. **B.** Luego de 50 días desde el inicio del ensayo, un set extra de 10 plantas creciendo sin fósforo en la solución nutritiva, recibieron P_s (P₀ + P_s*), y otro set de 10 plantas creciendo con la adición de fósforo insoluble, fueron inoculadas con *G. diazotrophicus* PAL5 (P_i + PAL5*). Luego de 20 días más de crecimiento, el contenido de P fue determinado. Los tratamientos con asterisco corresponden a valores de índice de verdor determinados luego de 70 días de crecimiento, los otros corresponden al día 50. Los datos representan valores medios de 10 repeticiones. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

El análisis de componentes principales (ACP) mostró que, según la regla de Kaiser y el test de Scree, el primer componente principal (CP1) representa el 94,43% de la variabilidad total y el segundo componente principal (CP2) explica el 4,45%. El modelo de barra quebrada aplica variables consideradas con valores iguales o mayores que 2/3 del valor de la variable más alta dentro de cada componente principal. Por lo tanto, CP1 incluyó el índice de crecimiento, el área de raíz, el contenido de P (total, raíz, brote) y el índice de verdor, mostrados en las variables del mapa de factores (Fig. 20-A). En este análisis, el contenido de P de la planta, el índice de crecimiento y la superficie radicular, aumentaron hacia los valores positivos de CP1 (eje X), según lo indicado por sus vectores (líneas), mientras que el índice de verdor aumentó con los valores negativos del mismo principal componente. Al comparar simultáneamente a través de ACP el efecto de los diferentes tratamientos sobre la nutrición de las plantas con P, se observaron cuatro grupos en el mapa de factor de individuos (Fig. 20-B). Esto se representó a partir de ACP de acuerdo con las coordenadas de las variables mediante el uso del paquete FactoMiner en el software de estadística R, y los 4 grupos se formaron por la proximidad entre individuos (tratamientos) de la siguiente manera: valores de componente bajos, para las plantas sin P; valores de componentes altos para plantas que reciben P soluble; valores de componente medio-bajo, para plantas que recibieron P insoluble y plantas que recibieron P insoluble y se inocularon con la cepa mutante 16D10; y valores de componente medio-alto, para plantas que recibieron P insoluble y se inocularon con PAL5.

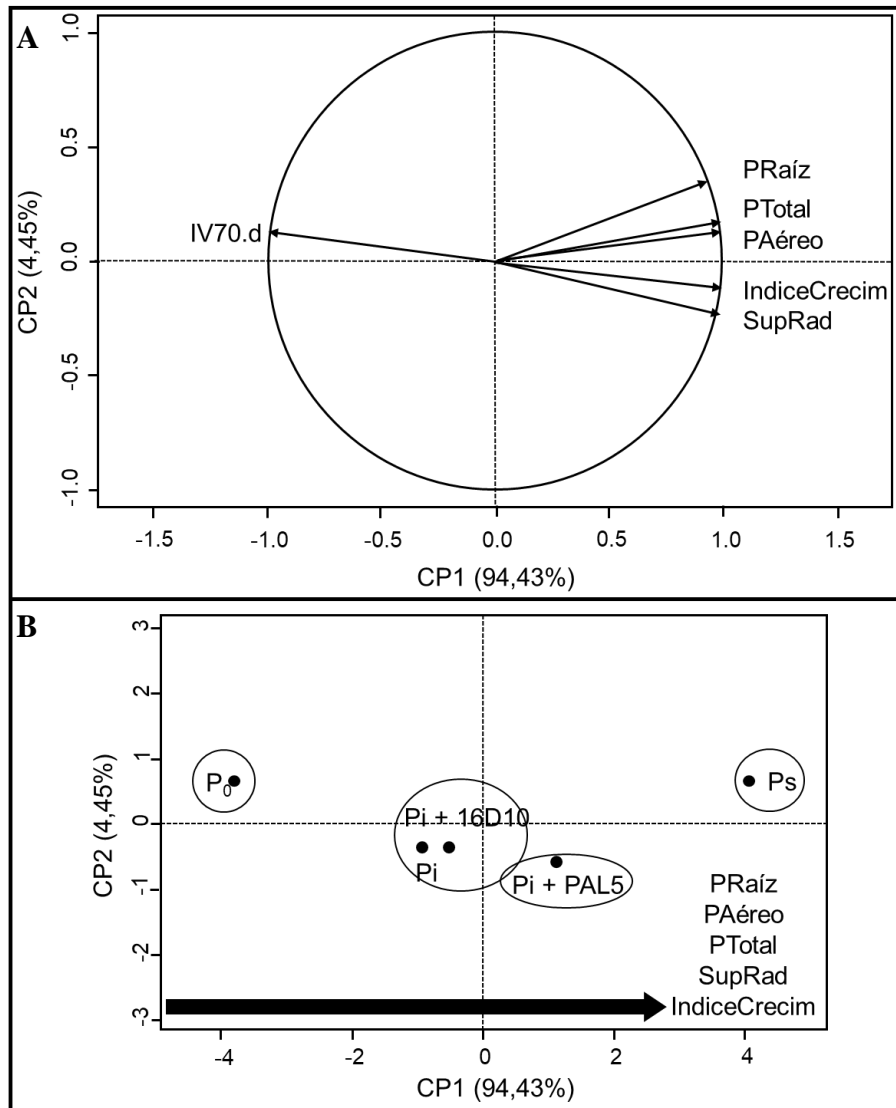


Figura 20. Análisis de Componentes Principales (ACP). **A.** ACP de acuerdo al mapa de factor de variables de índice de crecimiento, área radicular, índice de verdor, y contenido de P en raíces, parte aérea y total, determinado en plantas de frutilla recibiendo los tratamientos que se detallan a continuación: P₀, plantas recibiendo solución nutritiva Fåhraeus sin P; P_s, solución nutritiva con P soluble 2 mM; P_i, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM; P_i + PAL5, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa salvaje *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; P_i + 16D10, solución nutritiva conteniendo fosfato tricálcico 2 mM e inoculadas con 15 ml de la cepa mutante defectiva en producción de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10. **B.** ACP simultáneo de los diferentes tratamientos, indicados arriba, de acuerdo con el mapa de factor de individuos. La flecha negra indica la dirección del incremento de parámetros mostrados en la esquina derecha.

7. Producción de sideróforos totales

Se observó que las cepas *A. brasilense* Sp7 y REC3 produjeron sideróforos. Esto se evidenció por el cambio de color del medio de cultivo NFb (con agregado de CAS) alrededor de las colonias, de azul a amarillo. La cepa *G. diazotrophicus* PAL5 también evidenció la producción de sideróforos por un cambio de color del medio de cultivo LGI-P (con agregado de CAS), de azul a violeta. En cambio, la cepa *G. diazotrophicus* 16D10 no mostró cambio de color alrededor de la colonia (Figura 21).

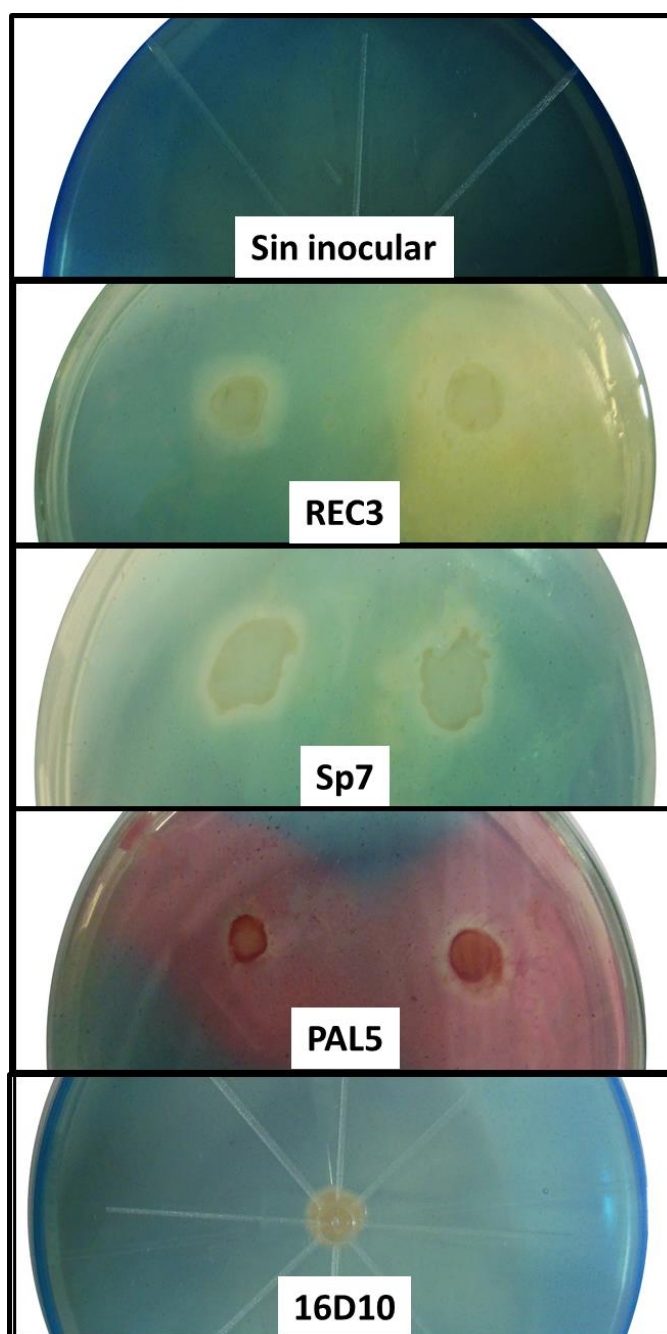


Figura 21. Producción de sideróforos. En medio sólido luego de 72 h de incubación. Sin inocular e inoculado con las distintas cepas: *Azospirillum brasilense* REC3, *A. brasilense* Sp7, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y *G. diazotrophicus* 16D10.

8. Producción de sideróforos de tipo catecol en medio líquido

La determinación cualitativa de sideróforos de tipo catecol utilizando la técnica de Arnow (1937), mostró que el sobrenadante de la cepa *A. brasilense* REC3 al reaccionar con los reactivos adquiere un color rosa (positivo para sideróforos de tipo catecol), mientras que el resto de las cepas estudiadas no mostraron ningún cambio de color (Figura 22).

En la determinación cuantitativa se observó que REC3 tiene un alto contenido de catecoles (3,91 μM), mientras que *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 mostraron valores muy por debajo de REC3 (0,74 μM y 0,69 μM , respectivamente). La cepa *A. brasilense* Sp7 mostró un valor despreciable respecto a la producción de catecoles (0,03 μM) (Figura 23).



Figura 22. Presencia de sideróforos de tipo catecol. De izquierda a derecha: R, *Azospirillum brasilense* REC3; S, *A. brasilense* Sp7; P, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y M, *G. diazotrophicus* 16D10. El color rosa es indicativo de presencia de catecoles.

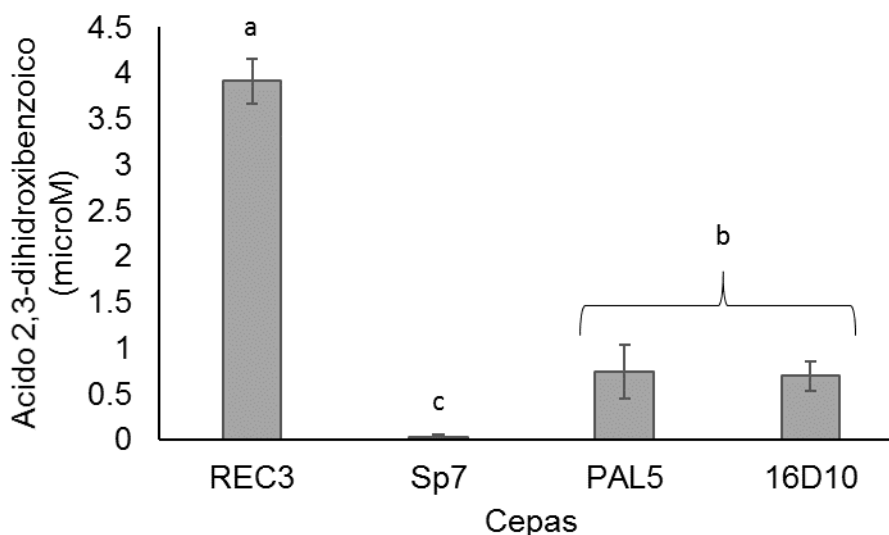


Figura 23. Producción de sideróforos de tipo catecol. Cepas: *Azospirillum brasilense* REC3, *A. brasilense* Sp7, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y *G. diazotrophicus* 16D10. Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor $p = 0,05$.

9. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva en plantas de frutilla, mediado por la producción de sideróforos

Al cuantificar la biomasa producida por los distintos tratamientos, se observó que los menores valores corresponden a las plantas del tratamiento sin el agregado de hierro en la solución nutritiva (Fe0). Los valores mayores de biomasa total se observaron en las plantas de los tratamientos inoculados con *A. brasilense* REC3 ($0,58 \pm 0,08$ g; $p \leq 0,05$) y *G. diazotrophicus* PAL5 ($0,48 \pm 0,09$ g; $p \leq 0,05$), en presencia de hierro no disponible para la planta (FeND + REC3 y FeND + PAL5), y los menores valores en las plantas del tratamiento sin hierro (Fe0) ($0,02 \pm 0,05$ g; $p \leq 0,05$). Resultados similares fueron observados para biomasa de raíz y biomasa aéreo. Estos resultados se muestran en la Figura 24.

El crecimiento de la planta observado en el tratamiento sin hierro (Fe0) se debió al hierro acumulado en los tejidos de la planta durante el período de crecimiento *in vitro*. Sin embargo, el tratamiento con hierro no disponible (FeND) obtuvo mayores valores que el tratamiento sin hierro (Fe0), lo que se debe a la acidificación propia de la raíz, que permite a las plantas transformar el hierro no disponible en disponible.

Al evaluar el índice de crecimiento los valores obtenidos fueron similares a los de biomasa total (Figura 25).

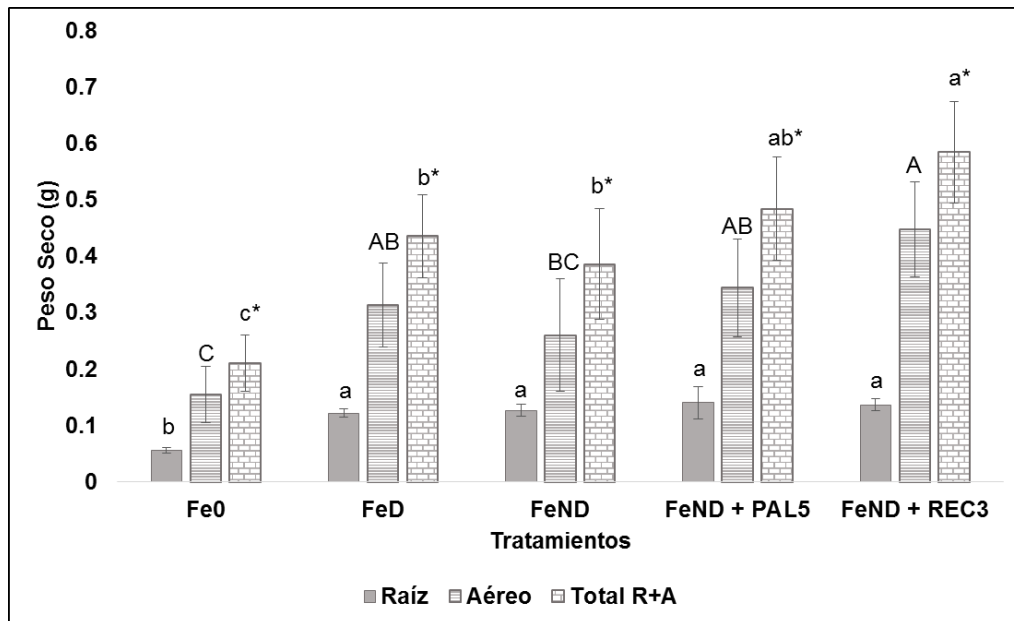


Figura 24. Biomasa aérea, radicular y total. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml). Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

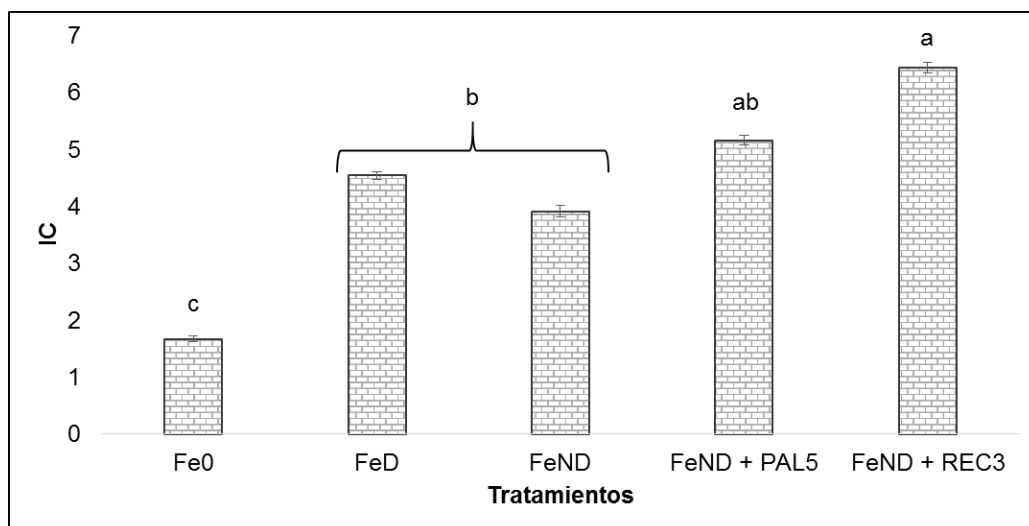


Figura 25. Índice de crecimiento. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml). Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

A pesar que los valores de biomasa radicular e índice de crecimiento muestran un marcado aumento al inocular las plantas de frutilla con REC3 y PAL5, respecto al tratamiento sin hierro, el análisis de la superficie radicular por el método gravimétrico de Carley y Watson (1966), no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, lo que puede atribuirse a que las raíces se encuentran en medio líquido con todos los nutrientes en solución no requieren de la expansión radicular para buscar nutrientes (Figura 26). Sin embargo, la observación microscópica de la proliferación de pelos radicales mostró que los tratamientos inoculados con *A. brasilense* REC3 y *G. diazotrophicus* PAL5 tuvieron mayor proliferación de los mismos, probablemente debido a la producción de auxinas bacterianas (Figura 27-B).

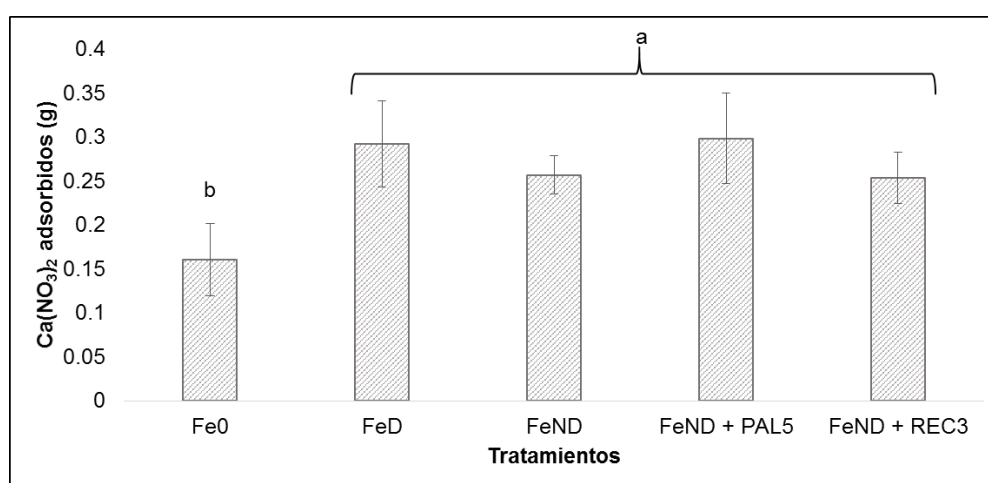


Figura 26. Superficie radicular. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml). Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

Las plantas del tratamiento sin hierro (Fe0) fueron las únicas en las que se observaron síntomas de deficiencia foliares de hierro, apareciendo la clorosis internerval a los 40 días de iniciado el ensayo (Figuras 27-A y 28).

Al sembrar un macerado de raíces de los tratamientos en medio semisólido LGI-P y NFb, e incubar los mismos a 30 °C durante 72 h, se observó el crecimiento típico de las cepas (Figura 27-C). Al finalizar el ensayo el NMP de diazótrofos en medio NFb fue de log 5,07 / g de raíz fresca, y en medio LGI-P de log 5,12 / g de raíz fresca.

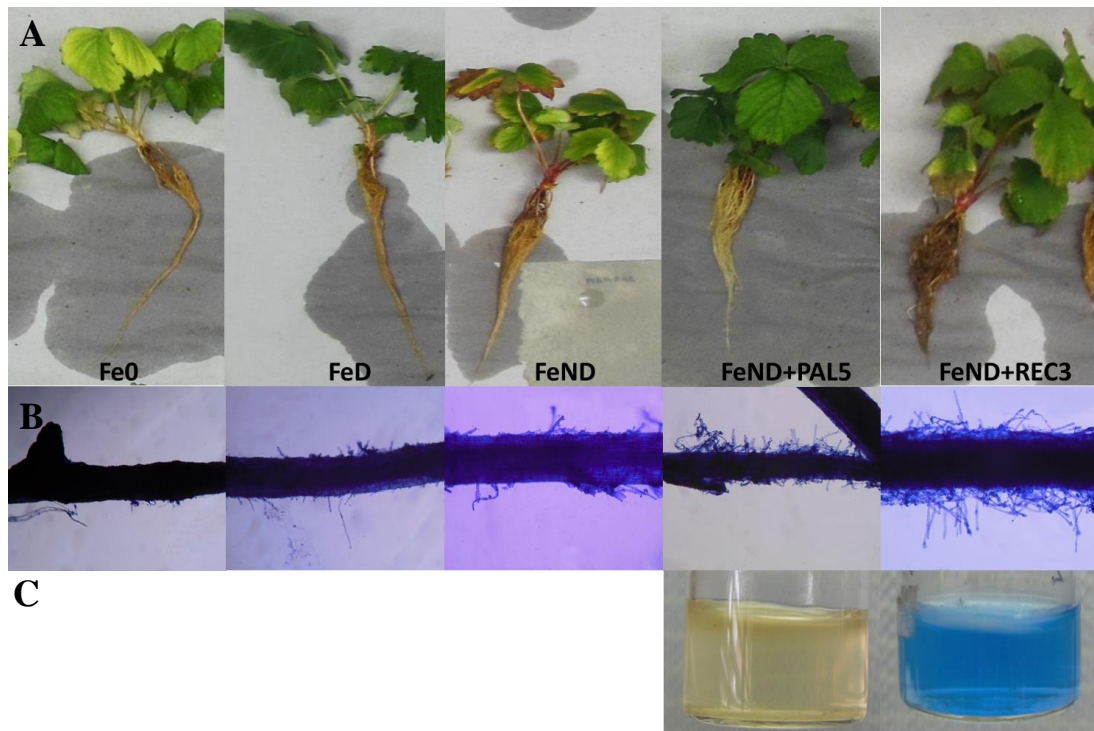


Figura 27. **A.** Plantas de cada tratamiento, descalzadas y con las raíces lavadas con agua destilada. **B.** Fotos representativas de pelos radiculares observados en microscopio óptico (100X). **C.** Medios LGI-P y NFb semisólidos mostrando el crecimiento típico de las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y *Azospirillum brasilense* REC3, luego de sembrar una muestra de macerado de raíces e incubar a 30 °C durante 72 h. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml). Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

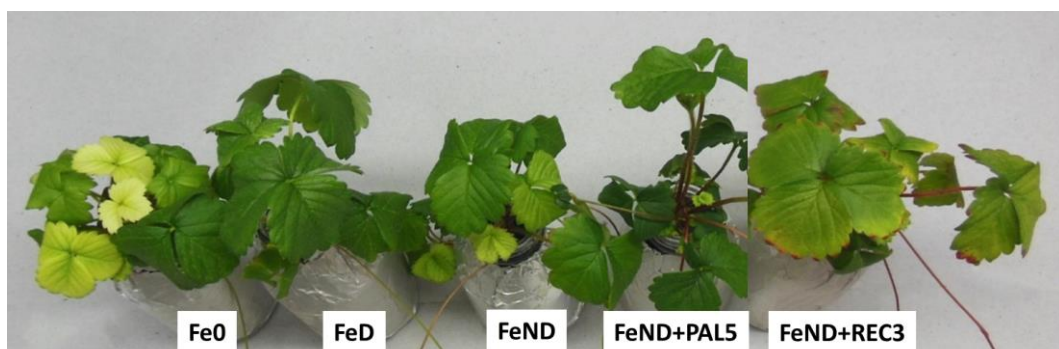


Figura 28. Fotos representativas de los distintos tratamientos a los 80 días del ensayo. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml).

Los valores del índice de verdor mostraron que el tratamiento sin hierro (Fe0) disminuyó los valores SPAD luego de 40 días de iniciado el ensayo, mientras que en los restantes tratamientos no variaron significativamente los valores entre sí a lo largo del ensayo (Figura 29).

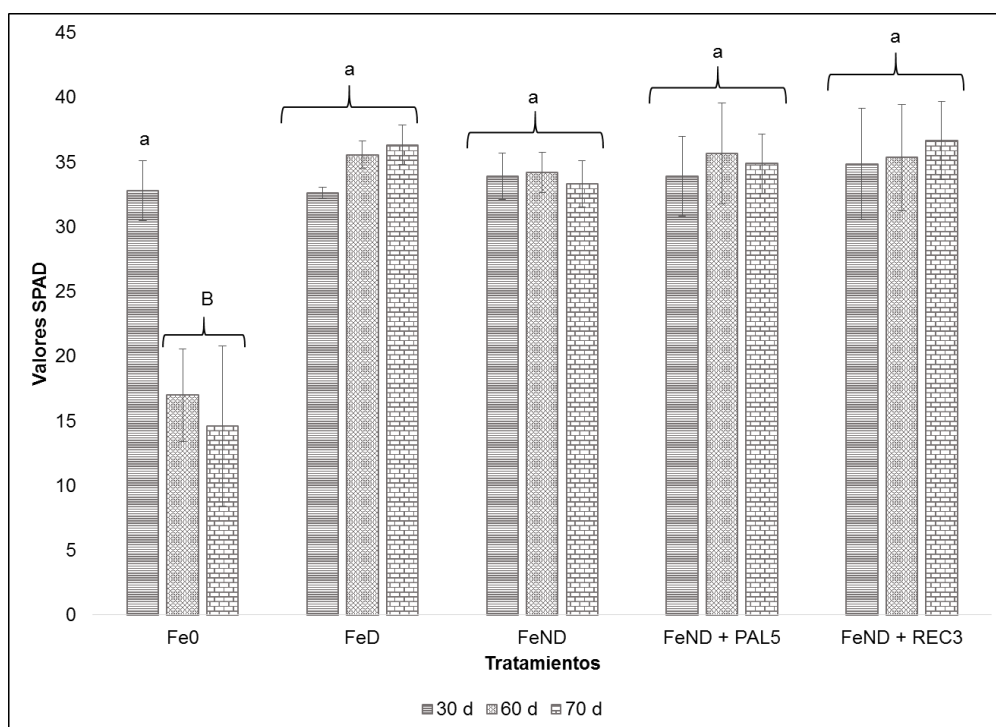


Figura 29. Índice de verdor en plantas de frutilla luego de 30, 60 y 70 días desde el comienzo del ensayo. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml). Letras similares no muestran diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey con un valor p = 0,05.

Para complementar los resultados obtenidos, se obtuvieron los valores del contenido de hierro total en la planta de frutilla al finalizar el ensayo. Se observó un aumento del 2,61 % en el tratamiento de FeND + PAL5 y del 8,33 % en el tratamiento de FeND + REC3, respecto del tratamiento con hierro disponible (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de hierro total en plantas de frutilla al final del ensayo. Tratamientos: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (10⁸ UFC/ml) y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3 (10⁶ UFC/ml).

Tratamientos	Contenido de hierro total (ppm)	Índice de verdor a los 70 días (valores SPAD)
Fe0	33,00	14
FeD	84,85	36
FeND	77,78	33
FeND + PAL5	80,14	34
FeND + REC3	84,85	36

Al enfrentar todas las variables estudiadas mediante el análisis de componentes principales (ACP) se observó que, según la regla de Kaiser y el test de Scree, el primer componente principal (CP1) explicó el 90,67% de la variabilidad total y el segundo componente principal (CP2) explicó el 7,82%. El modelo de barra quebrada aplicó variables consideradas con valores iguales o mayores que 2/3 del valor de la variable más alta dentro de cada componente principal. Por lo tanto, CP1 incluyó el peso seco de raíces, el peso seco aéreo, el peso seco total, el índice de crecimiento, el área radicular, el contenido de hierro total y el índice de verdor, mostrados en las variables del mapa de factores (Fig. 30-A). Todas estas variables aumentan hacia los valores positivos de CP1 (eje X), según lo indicado por sus vectores (líneas).

Al comparar simultáneamente a través de ACP el efecto de los diferentes tratamientos sobre la nutrición de las plantas con hierro, se observaron tres grupos en el mapa de factor de individuos (Fig. 30-B). Esto se representó a partir de ACP de acuerdo con las coordenadas de las variables mediante el uso del paquete FactoMiner en el software de estadística R, y los 3 grupos se formaron por la proximidad entre individuos (tratamientos) de la siguiente manera: valores de componentes bajos, para las plantas sin hierro; valores de componentes altos, para plantas que recibieron hierro disponible, hierro no disponible, hierro no disponible inoculadas con PAL5; valores de componentes altos, para las plantas que recibieron hierro no disponible y fueron inoculadas con REC3, aunque con valores bajos respecto al CP2.

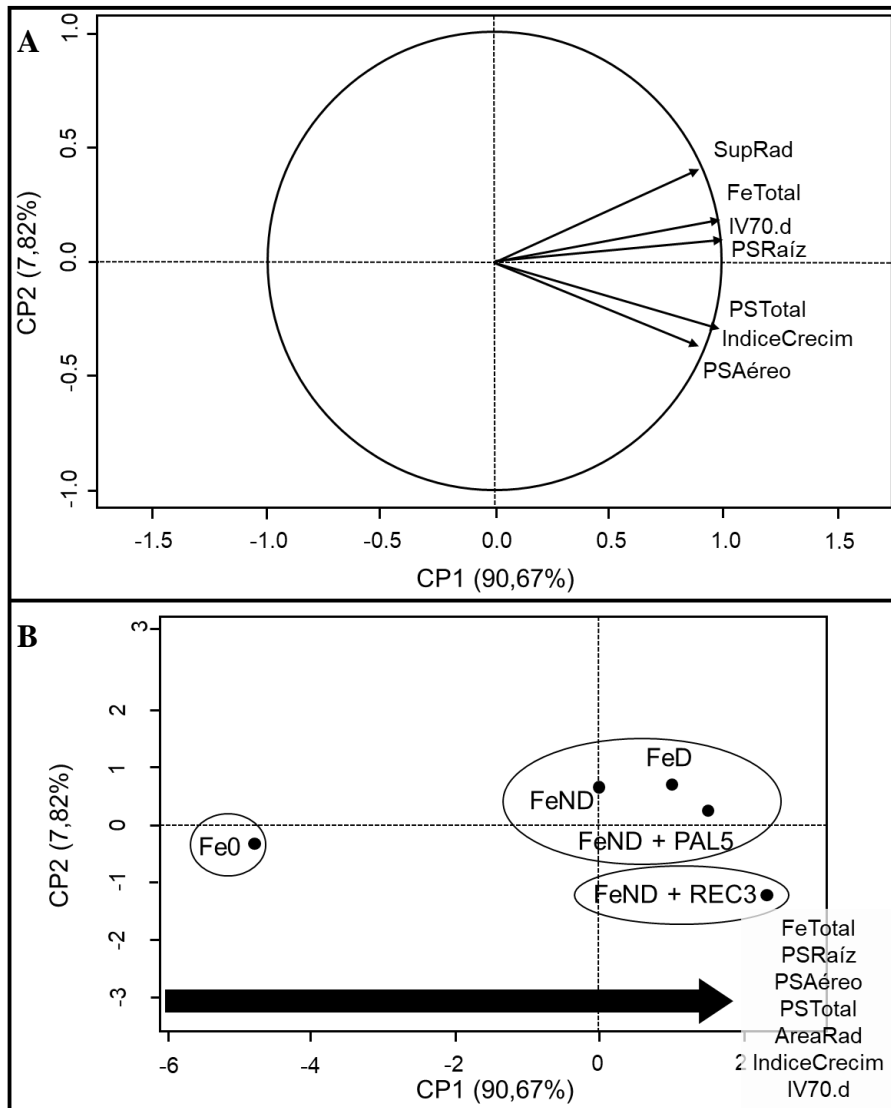


Figura 30. Análisis de Componentes Principales (ACP). **A.** ACP de acuerdo al mapa de factor de variables de peso seco de raíz, peso seco aéreo, peso seco total, índice de crecimiento, área radicular, índice de verdor, y contenido de hierro total, determinado en plantas de frutilla recibiendo los tratamientos que se detallan a continuación: Fe0, solución nutritiva sin agregado de hierro; FeD, solución nutritiva con agregado de hierro disponible Fe-EDTA Na₂; FeND, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄; FeND + PAL5, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 y FeND + REC3, solución nutritiva con agregado de hierro insoluble FeSO₄ e inoculadas con la cepa *Azospirillum brasilense* REC3. **B.** ACP simultáneo de los diferentes tratamientos, indicados arriba, de acuerdo con el mapa de factor de individuos. La flecha negra indica la dirección del incremento de parámetros de acuerdo con el componente principal 1 (CP1) mostrados en la esquina derecha.

V-DISCUSIÓN

1. Solubilización de fosfatos

Se sabe que *G. diazotrophicus* puede sintetizar ácido glucónico a través de la oxidación extracelular de la glucosa por la acción de la enzima pirroloquinolin quinona-glucosa deshidrogenasa dependiente (PQQ-GDH), localizada en el espacio periplásmico (Stephan y col., 1991; Galar y Boiardi, 1995). Este ácido suave no corrosivo puede promover reacciones de quelación e intercambio, además de disminuir el pH, y se lo ha asociado con la solubilización / quelación de P y zinc en *G. diazotrophicus* (Maheshkumar y col., 1999; Natheer y Muthukkaruppan, 2012).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la cepa *G. diazotrophicus* PAL5 solubilizó todas las fuentes fosfatadas utilizadas, aunque lo hizo en distintos grados. Esto confirma el estatus de *G. diazotrophicus* PAL5 como PGPB solubilizadora de fosfatos, demostrado no solo con fuentes menos insolubles, tales como los fosfatos dicálcico y tricálcico, sino además con fuentes más insolubles como hidroxiapatita, Escorias Thomas y fosfato férrico. Respecto a la cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10 (deficiente en la síntesis de ácidos orgánicos), ésta fue incapaz de solubilizar todas las fuentes de fósforo utilizadas. En un trabajo previo, el análisis por HPLC mostró que la PAL5 y cepas mutantes de ésta, entre las cuales se encuentra la cepa 16D10, producen ácido glucónico en diferentes cantidades (da Silva y col., 2009), siendo mayor la producción de PAL5 en el tercer día de muestreo y el valor más bajo el de la cepa mutante 16D10. Estos resultados se correlacionan con la formación de halos de solubilización en el medio NBRIP e índice de solubilización, excepto para la cepa 16D10 que, aún con baja cantidad de ácido glucónico producido, no se observó la formación de halo.

Al evaluar a las cepas PAL5 y 16D10 en cuanto a la solubilización de fosfato tricálcico en medio NBRIP líquido, la primera solubilizó el fosfato mediante la protonización del medio, haciendo descender el pH desde 7 (inicial) hasta casi 4 (a las 96 horas). Por el contrario, la cepa 16D10, y en concordancia con lo expresado anteriormente, no liberó cantidades significativas de fosforo al medio y su pH disminuyó menos de un punto.

En el caso de las cepas *A. brasilense* REC3 y Sp7, al ser evaluadas con distintas fuentes de fosfato, ambas fueron incapaces de solubilizarlas. El mismo resultado negativo se obtuvo al sembrar REC3 y Sp7 en medio NBRIP líquido con fosfato tricálcico, correlacionándose con el pH del sobrenadante el cual no varió a lo largo de la evaluación.

De acuerdo con estos resultados, solamente las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y su mutante deficiente en la síntesis de ácidos orgánicos *G. diazotrophicus* 16D10 fueron consideradas para los ensayos de inoculación en plantas de frutilla relacionados con la nutrición con fósforo y la acumulación de polifosfato y formación de biopelícula.

2. Relación del polifosfato intracelular de *G. diazotrophicus* en la formación de biopelícula en superficies abióticas y en la adhesión en raíces de plantas de frutilla

Las células de *G. diazotrophicus* cultivadas en medios con alta concentración de fósforo (30 mM) han mostrado una mejora en la supervivencia y una alta capacidad para formar biopelícula sobre superficies abióticas y bióticas. En esta condición de alto contenido de fósforo en el medio, las células fueron capaces de acumular altos niveles de polifosfato, que posteriormente se degrada en fase estacionaria tardía.

La formación de biopelícula en superficies abióticas se ha logrado en una condición en la que la bacteria fue capaz de acumular y posteriormente degradar polifosfato, coincidiendo este comportamiento con informes anteriores relacionados con la formación de biopelícula en *E. coli* (Grillo-Puertas y col., 2012 y 2015).

En este trabajo de Tesis se obtuvo una significativa formación de biopelícula en la raíz de plantas de frutilla en un medio con elevada concentración de fósforo (30 mM). Esto resulta importante, considerando que se requiere la colonización de al menos parte del sistema radicular para obtener efectos beneficiosos de las PGPB inoculadas (Chin-A-Woeng y col., 2003), tales como el biocontrol de enfermedades transmitidas por el suelo (Bull y col., 1991), la biofertilización, la fitoestimulación (Okon y col., 1998) y la fitorremediación (Kuiper y col., 2004), y otros procesos relacionados con la promoción del crecimiento (Lugtenberg y col., 1991; Schippers y col., 1987; Suslow y Schroth, 1981).

Se sabe que los exopolisacáridos bacterianos participan en la adherencia y colonización de superficies inertes (Danese y col., 2000), la formación de biopelícula (Laue y col., 2006, Russo y col., 2006) y la producción de virulencia (Dunne, 2002). Idogawa y col. (2014) demostraron que la producción del exopolisacárido levano por *G. diazotrophicus* PAL5 aumenta en medios de cultivo con alta concentración de fósforo, lo cual se puso en evidencia por un fuerte fenotipo mucoide. Además, se ha demostrado la participación de levano en la formación de biopelícula de *G. diazotrophicus* y la tolerancia a la desecación, la presión osmótica y el estrés por NaCl (Velázquez-Hernández y col., 2011). Durante los experimentos realizados en esta Tesis, las colonias cultivadas en presencia de 30 mM de fósforo mostraron un aspecto mucoide, lo que sugiere que la producción de levano se mejoró en esta condición y condujo a la formación de biopelícula.

Los hallazgos sobre la relación entre la concentración de fósforo inorgánico exógeno, la formación de biopelícula y los niveles de poliP constituyen una contribución significativa para dilucidar la importancia del fósforo y/o sus metabolitos como señales ambientales que mejoran la supervivencia y la capacidad de colonización de *G. diazotrophicus*. Esto es importante debido a que no hay información sobre la dinámica del poliP en PGPB en condiciones de campo con suficiente o restringida disponibilidad de fósforo, incluyendo las respuestas contra el estrés ambiental en la asociación planta-PGPB. En consecuencia, son necesarios estudios adicionales para examinar esta situación en contacto con la planta en condiciones de laboratorio y de campo que pueden proporcionar la base para estudios funcionales para determinar la relación entre

la adquisición y almacenamiento de fósforo y la función del poliP entre los mecanismos moleculares y cómo sobreviven los microorganismos en ambientes agroecológicos.

3. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva de fósforo en plantas de frutilla inoculadas con *G. diazotrophicus*

En esta Tesis hemos demostrado que *G. diazotrophicus* PAL5 puede aumentar el contenido de P de las plantas de frutilla y mejorar el crecimiento total de las mismas, observado a través del índice de crecimiento, la superficie radicular y la proliferación de pelos radiculares. Esto es importante teniendo en cuenta que la mayoría de los reportes sobre la nutrición de las plantas mediada por esta bacteria está relacionada sólo con la adquisición de nitrógeno (Reis y Teixeira, 2015; Pedraza, 2016). Por lo tanto, este constituye el primer informe de la participación de *G. diazotrophicus* en la nutrición con P mediante su capacidad solubilizadora de fosfatos.

En este trabajo se observó mediante el cálculo del índice de crecimiento, el efecto promotor del crecimiento de las dos cepas bacterianas asociadas a las plantas de frutilla, *G. diazotrophicus* PAL5 y su mutante 16D10, defectiva en la producción de ácidos orgánicos. En términos de disponibilidad de P, los parámetros para evaluar el crecimiento vegetal se expresaron mejor en plantas que recibieron P fácilmente asimilable en el bioensayo, en comparación con los otros tratamientos. Sin embargo, la cepa salvaje PAL5 tuvo un mejor rendimiento comparado con la cepa mutante, que no fue capaz de cambiar el fenotipo de la planta relacionado con la deficiencia de P cuando recibió sólo fosfato insoluble. Estos resultados indican que *G. diazotrophicus* PAL5 contribuyó a la producción de biomasa a través del mecanismo de solubilización de P. Sin embargo, el hecho de que los valores de biomasa seca y el índice de crecimiento de la cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10 superaron los valores de las plantas control, sin fosfato añadido, también podría ser debido a la acidificación de la rizósfera como un mecanismo para la solubilización en P ejercida por las plantas de frutilla. Se sabe que, para asimilar ciertos nutrientes no disponibles para las plantas, éstas desarrollaron distintas estrategias. Están las plantas con Estrategia I (dicotiledóneas y monocotiledóneas no poáceas), donde se incluye a la frutilla, cuyo principal mecanismo es la excreción de protones y compuestos fenólicos a través de las raíces hacia la rizósfera; y las plantas con Estrategia II (poáceas) que excretan fitosideróforos los cuales secuestran los nutrientes no disponibles sin necesidad de convertirlos a formas asimilables (Römheld y Marschner, 1986).

En general, la acidificación de la rizósfera se podría originar por la liberación de protones, la exudación de ácidos orgánicos y aminoácidos, o la liberación de CO₂ de la raíz (Marschner y col., 1987, Laurent y Eric, 1994) que tienen importantes consecuencias para la nutrición de las plantas. Además, se observó que la acidificación inducida por la luz en las plántulas de caupí es regulada por la actividad fotosintética (Rao y col., 2002). La frutilla pertenece a las plantas de Estrategia I, utilizadas por todas las plantas superiores excepto las poáceas (Marschner y Römheld, 1994) que, junto con los carboxilatos liberados, acidifican la rizósfera mediante extrusión de protones (Alcántara y col., 1991, Tomasi y col., 2009), solubilizando los minerales del suelo. Sin

embargo, la extrusión de protones de la raíz puede verse influida por la fuente de nitrógeno aplicada en plantas de frutilla (Paszt y Zurawicz, 2005). De acuerdo con esto, observamos una acidificación de la rizósfera por el cultivo de plántulas de frutilla en placas de Petri mediante el cambio de color del indicador de pH azul de bromotimol azul, de verde (neutro) a amarillento (ácido) en ausencia o presencia de KNO_3 . Se sabe que las leguminosas (Plantas de la Estrategia I) acidifican su rizósfera incluso cuando son fertilizadas con nitrato (Rao y col., 2002). Como ejemplo, la extrusión de protones total y específica ocurrió cuando el lupino (*Lupinus albus*) fue alimentado con KNO_3 en condiciones deficientes de P (Sas y col., 2002). Esto está en concordancia con la acidificación de la rizósfera observada en esta tesis con plantas de frutilla. También se informó de una fuerte liberación de citrato y una acidificación del medio de crecimiento en plantas de frutilla con deficiencia de P (Valentinuzzi y col., 2015).

Cuando se evaluó el área de la raíz, se observó que sólo aquellas plantas que recibieron fosfato soluble tuvieron valores elevados significativos no sólo en comparación con las plantas control sin fosfato, sino también con fosfato insoluble e inoculación bacteriana. Un valor ligeramente superior fue observado en presencia de PAL5, probablemente debido a su capacidad de producción de auxinas, previamente reportada (Fuentes-Ramírez y col., 1993; Pedraza y col., 2004). Además se observó una gran proliferación de pelos radiculares cuando las bacterias fueron involucradas. Esta es una característica particular observada aquí en plantas de frutilla asociadas a *G. diazotrophicus*, considerando que ambas cepas utilizadas no son defectivas en la producción de auxinas, lo que estimula la proliferación de las raíces, como también fue observado con *Azospirillum brasilense* en asociación con plantas de frutilla (Pedraza y col., 2010). El NMP de diazótrofos determinado al final del bioensayo (sólo positivo en las plantas inoculadas) permitió inferir que las cepas de *G. diazotrophicus* se asociaron a las raíces. El primer signo de deficiencia de P en las plantas de frutilla es un color verde oscuro de las plantas y una reducción en el tamaño de la hoja (Ullio, 2010). A medida que la deficiencia se vuelve más severa, la superficie superior de las hojas desarrolla un brillo metálico oscuro, mientras que la parte inferior se convierte en púrpura rojiza (Ullio, 2010). Para evaluar los síntomas de deficiencia de P y de suficiencia de P en plantas de frutilla, se registró el índice de verdor después de 40, 50, 60 y 70 días desde el comienzo del ensayo. Los valores más altos se observaron en plantas donde no se aplicó P. Mostraron un color verde oscuro en las hojas, lo que indica un síntoma de deficiencia de P. Esto también fue observado por Valentinuzzi y col. (2015) en hojas de frutilla. Por otro lado, los valores más bajos fueron observados en plantas en los tratamientos P_s y $P_i + \text{PAL5}$, lo que significa que no había deficiencia de P en estas condiciones. Valores intermedios se observaron en plantas recibiendo P_i o $P_i + 16D10$ indicando, como se ha mencionado anteriormente, un posible efecto de acidificación de la rizósfera. Los síntomas de deficiencia fueron revertidos en plantas que crecen sin fosfato o en fosfato insoluble por la adición de P soluble o la inoculación de PAL5 ($P + P_s^*$ y $P_i + \text{PAL5}^*$), demostrando la participación del P en la nutrición de las plantas y la contribución de *G. diazotrophicus* en ese proceso. Aunque el índice de verdor fue utilizado en diferentes trabajos como medida indirecta de la fotosíntesis (Valentinuzzi y col., 2015) de acuerdo con el PCA realizado en este trabajo, no fue una valiosa

herramienta para evaluar la deficiencia de P en frutilla, aunque se observaron diferencias fenotípicas en las hojas (color verde). Para contrastar los resultados de la deficiencia de P o suficiencia de P en las hojas de la planta de frutilla evaluadas por el índice de verdor, se determinó el contenido de P de los tejidos vegetales. Se pudo observar al final del bioensayo la contribución de *G. diazotrophicus* PAL5 en la nutrición con P en plantas de frutilla, aunque no en la misma cantidad en comparación con el fosfato soluble disponible. Sin embargo, esta contribución se observó a los 50 días desde el inicio del ensayo, después de añadir P soluble a las plantas sin P en la solución nutritiva y al inocular con PAL5 las plantas que crecen con P insoluble. Se ha informado que bajo fijación de N₂ *G. diazotrophicus* es capaz de expresar una producción mejorada de energía ligada a una PQQ-GDH completamente activa (Luna y col., 2000). Además, los cultivos continuos de esta bacteria mostraron actividades significativas de PQQ-GDH ya sea bajo limitación de carbono o de P (Crespo y col., 2011). Por lo tanto, considerando que durante el ensayo, *G. diazotrophicus* ha crecido bajo condiciones de fijación de nitrógeno y limitación de P en el tratamiento correspondiente, es probable una buena actividad PQQ-GDH y la producción de ácidos orgánicos, vinculada a la solubilización de fosfatos que finalmente aportó a la nutrición con P de plantas de frutilla. Además, el efecto promotor del crecimiento de las plantas ejercido por *G. diazotrophicus* PAL5 se observó no sólo en la cantidad de P en la raíz y parte aérea, sino en la producción de biomasa, superficie radicular y el índice de crecimiento después del Análisis de Componentes Principales.

4. Producción de sideróforos

Al analizar la producción de sideróforos en medio sólido, se observó que las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3 producen sideróforos, lo cual se pone en evidencia por un cambio color del CAS de azul a amarillo-anaranjado, tal como lo informa Pedraza y col. (2007) y Tortora y col. (2011). La cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 también mostró un cambio de coloración, sin embargo, este cambio fue de azul a violeta. La diferencia de color entre la producción de sideróforos de *A. brasilense* y *G. diazotrophicus*, es debido a que producen dos tipos de sideróforos con distinta estructura química. Las cepas Sp7 y REC3 producen sideróforos de tipo catecol (Tortora y col., 2011), mientras que la cepa PAL5 produce sideróforos de tipo hidroxamato (Logeshwaran y col., 2009). En esta tesis fue posible confirmar la producción de catecoles por parte de la cepa REC3 utilizando la técnica de Arnow (1937), también se observa que los valores obtenidos por las cepas Sp7, PAL5 y 16D10 son casi nulos.

Otro resultado importante fue la no producción de sideróforos por parte de la cepa mutante *G. diazotrophicus* 16D10 al hacerla crecer en medio de cultivo sólido sin hierro y agregar el CAS para poner en evidencia los sideróforos. Todos estos análisis se realizaron sin el agregado de hierro disponible ya que la síntesis de sideróforos está estrictamente regulada por la respuesta a la disponibilidad de hierro externa (Bachhawaat y Ghogh, 1989; Dave y Dube, 2000).

5. Efecto promotor del crecimiento y composición nutritiva de hierro en plantas de frutilla inoculadas con *G. diazotrophicus* y *A. brasilense*

Los microorganismos de la rizósfera, especialmente las PGPB, desempeñan un papel fundamental al proporcionar a las plantas cantidades apropiadas de micronutrientes, como el hierro (de-Santiago y col., 2013; Pii y col., 2015).

Durante el bioensayo de hierro se observó que *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilense* REC3 aumentan el contenido de hierro de las plantas de frutilla y mejoran el crecimiento total de la planta, observado a través del peso seco, el índice de crecimiento, la proliferación de pelos radiculares y valores SPAD. Esto es importante debido a la sensibilidad, expresada por la planta de frutilla, a la deficiencia de este elemento.

El efecto promotor del crecimiento de las dos cepas bacterianas asociadas a las plantas de frutilla, *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilense* REC3, se debe a que ambas son productoras de sideróforos (hidroxamatos y catecoles respectivamente) (Logeshwaran y col., 2009; Tortora y col., 2011). Sin embargo, el efecto promotor obtenido en las plantas inoculadas con REC3 fue ligeramente mayor que el obtenido al inocular con PAL5, esto se debe a que los sideróforos de tipo catecol que produce tienen mayor afinidad por el Fe^{3+} (Dertz y Raymond, 2004), permitiendo una mejor contribución a la nutrición con ese elemento.

Tomando en cuenta la disponibilidad de hierro, los parámetros analizados se expresaron mejor en plantas que recibieron hierro en forma oxidada (hierro no disponible) e inoculadas con las cepas en estudio. Las plantas tratadas con hierro disponible (quelado con EDTA) y con hierro no disponible sin inocular obtuvieron valores menores que el tratamiento antes mencionado, aunque no hay diferencias significativas entre sí en el peso seco, índice de crecimiento y los valores SPAD. Este hecho podría ser debido a la acidificación de la rizósfera como un mecanismo que libera protones y ayuda a reducir el hierro presente en la solución. La reducción del pH de la rizósfera es un mecanismo de adaptación importante adoptado por las dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas (plantas de estrategia I) para solubilizar las fuentes de hierro apenas disponibles (Colombo y col., 2014). Teniendo en cuenta que la frutilla pertenece a este grupo, cabe mencionar que plantas como el trébol rojo, también responden a la deficiencia de hierro mediante la inducción de la reductasa de quelato férrico anclado en la membrana plasmática de la célula epidérmica y también a través de la estimulación de la bomba de protones de esta membrana, aumentando así la exudación de protones (Robinson y col., 1999). Aun así, los valores del tratamiento con hierro no disponible sin inocular fueron ligeramente menores que los del tratamiento con hierro disponible. En el caso de las plantas que no recibieron hierro en la solución de nutrientes, se observó una marcada clorosis internerval en las hojas jóvenes (Kirschbaum y Borquez, 2006) debido a que la escasez de este elemento provoca una disminución de los pigmentos fotosintéticos (clorofila y algunos carotenoides) en las hojas (Abadía y Abadía, 1993); y la deficiencia de este elemento se vio reflejada en todos los parámetros evaluados. Síntomas de deficiencia de hierro en plantas de frutilla

similares a los observados en esta tesis también fueron reportados por Pestana y col. (2012) y Valentinuzzi y col. (2015).

Al evaluar el área de la raíz, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en el tratamiento sin hierro el cual fue significativamente menor. Es probable que este efecto sea debido al sistema hidropónico utilizado en el bioensayo, el cual permite a las raíces estar en contacto con todos los nutrientes ya que se encuentran en solución, sin ser necesario que la planta gaste recursos energéticos en la proliferación de pelos radiculares, y dejando sin efecto las ventajas proporcionadas por la producción de auxinas. A pesar de no existir diferencias significativas entre los tratamientos con hierro, la proliferación de pelos radiculares se vio incrementada en los tratamientos inoculados con ambas cepas, PAL5 y REC3, característica dada por la producción de auxinas (Fuentes-Ramírez y col., 1993; Pedraza y col., 2004; Pedraza y col., 2010). El número más probable de diazótrofos (NMP) determinado al final del bioensayo (sólo positivo en las plantas inoculadas) permitió inferir que las cepas de *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilense* REC3 se asociaron a las raíces de frutilla en hidroponía.

Para evaluar los síntomas de deficiencia de hierro y de suficiencia de hierro en plantas de frutilla, se registró el índice de verdor después de 30, 60 y 70 días desde el comienzo del ensayo. Los valores más bajos se observaron en plantas donde no se aplicó hierro. Mostraron un color amarillo pálido en las hojas, lo que indica un síntoma de deficiencia de hierro. Esto también fue observado por Jin y col. (2007) en hojas de frutilla. Los valores más altos fueron observados en plantas de los tratamientos con hierro disponible y hierro no disponible, inoculadas y sin inocular (HD, HND, HND + PAL5 y HND + REC3), lo que indica que no hubo deficiencia de hierro en estas condiciones.

Para contrastar los resultados de la deficiencia de hierro o suficiencia de hierro en las hojas de la planta de frutilla evaluadas por el índice de verdor, se determinó el contenido de hierro de los tejidos vegetales, el cual se correlacionó de manera directa con los valores SPAD obtenidos al momento de levantar el ensayo. Valores por debajo de 50 ppm se obtuvieron en el tratamiento sin hierro, y valores comprendidos entre 77 y 85 ppm se obtuvieron en los restantes tratamientos. Sin embargo se pudo observar las contribuciones de *G. diazotrophicus* PAL5 y de *Azospirillum brasilense* REC3 en la nutrición con hierro en plantas de frutilla debido a que sus valores de contenido de hierro fueron superiores a los restantes, aunque dentro de los óptimos para las plantas de frutilla (Zuang, 1982). Los valores tomados como referencia de Ulrich y col. (1980) indican que existe deficiencia de este elemento cuando hay 5-40 ppm de hierro, y por el contrario 50-3000 ppm indican suficiencia de hierro.

Debido a que la aplicación de fertilizantes para aumentar los rendimientos y la calidad de los frutos es una práctica estandarizada en las regiones productoras (Álvarez-Fernández y col., 2006), la inoculación con PGPB es una opción tendiente a reducir los costos de fertilización (que incluyen la compra de productos a aplicar, materiales necesarios y mano de obra), a optimizar los sistemas y tiempos de producción, y no menos importante, a disminuir la contaminación de los suelos y napas de agua.

Los resultados de los bioensayos en plantas de frutilla en relación con la nutrición con fósforo y hierro se obtuvieron bajo condiciones ambientales controladas, sin embargo, en la agricultura, la solubilización de fosfato y adquisición de hierro mediante sideróforos por las PGPB estará influenciada por la presencia de suelo, que se espera la afecte. Por lo tanto, es importante poner atención en los estudios de la actividad de solubilización de fosfato y producción de sideróforos como un mecanismo para la promoción de crecimiento de la planta por las PGPB, ya que las propiedades del suelo (por ejemplo, contenido de materia orgánica, pH, textura, capacidad de fijación P, y contenido de calcio) mediarán los resultados. Se sabe que el P tiene una movilidad muy baja en el suelo debido a su precipitación como complejos inorgánicos con calcio, óxidos libres, o hidróxidos de aluminio y hierro, y a su adsorción a las superficies de arcillas y materia orgánica (Fox, 1981; Raghothama y Karthikeyan, 2005). Por su parte el contenido de hierro de muchos suelos es mucho mayor que la cantidad que necesitan los cultivos, sin embargo, el problema radica en la escasa solubilidad de las formas iónicas de hierro presentes (Chen y Barak, 1982; Olsen y col., 1981). Así, se deben realizar estudios adicionales en condiciones de campo para evaluar si *G. diazotrophicus* contribuye, no sólo a la disponibilidad de P y hierro, pero también a un mayor desarrollo de raíces de frutilla para mejorar la captación de agua, P, y otros nutrientes del suelo.

VI-CONCLUSIONES

- *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 fue capaz de solubilizar diferentes formas de fosfato insolubles tanto en medio sólido como líquido, debido a la producción de ácidos orgánicos.
- Las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 y REC3; y la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* 16D10 no fueron capaces de solubilizar ninguna fuente de fosfato insoluble, debido a la deficiencia en la producción de ácidos orgánicos.
- Al aumentar las concentraciones de fósforo soluble en el medio de cultivo, las cepas *G. diazotrophicus* PAL5 y la mutante 16D10 aumentaron sus tasas de crecimiento y la acumulación de polifosfato intracelulares.
- La formación de biopelícula en superficies abióticas de *G. diazotrophicus* PAL5 y 16D10 aumentó al incrementar el contenido de fósforo soluble.
- *G. diazotrophicus* PAL5 se adhirió exitosamente a las raíces de frutilla produciéndose la formación de biopelícula cuando la concentración de fosfatos solubles es mayor.
- La acumulación de polifosfato intracelular en *G. diazotrophicus* PAL5 y su degradación en fase estacionaria es necesaria para la producción de biopelícula tanto en superficies abióticas como bióticas.
- La inoculación con *G. diazotrophicus* PAL5 utilizando una fuente de fósforo insoluble promovió el crecimiento y desarrollo de plantas de frutilla.
- *A. brasilense* Sp7 y REC3; y *G. diazotrophicus* PAL5 fueron capaces de producir sideróforos. Por el contrario *G. diazotrophicus* 16D10 no fue capaz de producirlos.
- *A. brasilense* REC3 mostró la mayor producción de sideróforos de tipo catecol.
- La inoculación con *G. diazotrophicus* PAL5 y *A. brasilense* REC3 utilizando una fuente de hierro no disponible, promovió el crecimiento y desarrollo de plantas de frutilla.

VII-PROYECCIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, a la importancia agronómica que representan las características PGPB de *G. diazotrophicus* PAL5, tales como la fijación de nitrógeno atmosférico la solubilización de fosfatos insolubles, la producción de auxinas y la producción de sideróforos entre otras; y que a la fecha se encuentra poco estudiada la relación del metabolismo del polifosfato asociado a diversos mecanismos PGPB, se plantean las siguientes proyecciones:

- Obtener mutantes de la cepa salvaje *G. diazotrophicus* PAL5 en genes relacionados al metabolismo del polifosfato, a fin de evaluar comparativamente las características PGPB.
- Determinar la capacidad de solubilización de fosfatos de la cepa PAL5 y de las mutantes obtenidas, utilizando fuentes de fosfato con diferentes grados de solubilidad.
- Evaluar la actividad nitrogenasa de la cepa PAL5 y de las mutantes obtenidas, en medio libre de nitrógeno.
- Medir la producción de indoles totales por la cepa PAL5 y las mutantes obtenidas.
- Medir la producción de sideróforos totales por la cepa PAL5 y las mutantes obtenidas.
- Determinar el efecto promotor del crecimiento en plantas de frutilla por las diferentes cepas en condiciones controladas.

VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadia, J., Abadia, A. (1993). Iron and plant pigments.
- Adriano-Anaya, M. L., Salvador-Figueroa, M., Ocampo, J. A., García-Romera, I. (2006). Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5): 879-886.
- Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31): 22556-22561.
- Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1): 633-639.
- Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A. Z., y Abdallah, M. A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic chemistry*, 33(26): 6391-6402.
- Alcántara, E., Manuel, D., Romera, F. J. (1991). Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiology*, 96(4): 1034-1037.
- Álvarez-Fernández, A., Abadía, J., Abadía, A. (2006). Evolución química y agronómica de quelatos de hierro sintéticos. *Vida rural*, 13(227): 20-22.
- Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In *Methods in enzymology*. Academic Press, 8: 115-118.
- Antoun, H., Prevost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, 1–38.
- Arnou, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry*, 118(2): 531-537.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Hofte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15: 1147-1156.
- Ault-Riché, D., Fraley, C.D., Tzeng, C.M., Kornberg, A. (1998). A Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 180: 1841-1847.
- Bachhawaat, A.K., Ghogh, S. (1989). Temperature inhibition of siderophore production by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 171(7): 4092–4094.

Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Baldani, V.L.D. (2014b). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil* 384: 413–431.

Baldani, J.I., Videira, S.S., Teixeira, K.R.D.S. y col. (2014a). The family *Rhodospirillaceae*. Rosenberg E, DeLong EF, Lory S y col. (eds) *The prokaryotes: alphaproteobacteria and betaproteobacteria*. Springer, Berlin, 533–618. doi: 10.1007/978-3-642-30197-1_300.

Bao, Z., Sasaki, K., Okubo, T., Ikeda, S., Anda, M., Hanzawa, E., Minamisawa, K. (2013). Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice-associated bacterial communities in a paddy field. *Microbes and environments*, 28(4): 487-490.

Bar, T., Okon, Y. (1992). Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasiliense* Sp7. *Symbiosis*, 13(1-3): 191-198.

Bashan, Y. (1999). Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29(3): 246-256.

Bashan, Y., De-Bashan, L. E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in agronomy*. Academic Press, 108: 77-136.

Bashan, Y., Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*. 36: 591-608.

Bashan, Y.; de-Bashan, L.E. (2005). Bacteria Plant Growth Promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*. In: Hillel D. (ed). Elsevier, Oxford, UK, 103-115.

Bashan, Y.; Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 103–121.

Bashan, Y.; Holguin, G.; de-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521–577.

Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Passaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63: 94-104.

Bienfait, H.F. (1988). Mechanisms in Fe-Efficiency Reactions of Higher Plants. *Journal of Plant Nutrition*. 11: 605-629.

Boone, L. V., Downs, J. P., Graffis, D. W., Hoeft, R. G., Knake, E. L., McGlamery, M. D., Scott, W. O. (1978). 1979-80 Illinois agronomy handbook [Includes varieties,

yields, weed control, tillage, fertilizers]. Circular-Illinois University, Agricultural Extension Service (USA).

Boukhalfa, H., Lack, J. G., Reilly, S. D., Hersman, L. E., Neu, M. P. (2003). Siderophore production and facilitated uptake of iron plutonium in *p. putida* (No. LA-UR-03-0913). Los Alamos National Laboratory.

Bowen, H. J. M. (1979). Environmental chemistry of the elements. Academic Press.

Boyer, R.F., H.M. Clark and A.P. LaRoche. (1988). Reduction and release of ferritin iron by plant phenolics. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 32: 171-181.

Brandán, E.Z. (2009). Frutilla o fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) Tratado de Horticultura. Eds. UNT. Cap 11.

Budzikiewicz, H. (2010). Microbial siderophores. In *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 92 (pp. 1-75). Springer Vienna.

Bull, C.T., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas* strain 2-79. *Phytopathology* 81: 954-959.

Bussler, W. Epstein, E. (1972). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sydney, Toronto. 412 Seiten, 23× 16 cm, zahlreiche Abbildungen. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 132 (2): 158-159.

Caris, C., Baret, P., Beguin, C., Serratrice, G., Pierre, J.L., Laulhère, J.P. (1995). Metabolization of iron by plant cells using O-Trensox, a high-affinity abiotic iron-chelating agent. *Biochemical Journal*, 312: 879-885.

Carley, H. E., Watson, R. D. (1966). A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science*, 102(5): 289-291.

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45: 28-35.

Cavalcante, V. A., Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil*, 108(1): 23-31.

Chaiharn, M., Chunchaleuchanon, S., Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1919-1928.

Chen, Y., y Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in agronomy*, 35: 217-240.

Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*. 157: 503-23.

Chu, B.C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., Peacock, R.S., y col. (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601–611.

Ciampitti, I. A. (2009). Dinámica del fósforo del suelo en rotaciones agrícolas en ensayos de nutrición a largo plazo (Doctoral dissertation, MS thesis. Univ. of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).

Clarkson, D. T., Hanson, J. B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annual review of plant physiology*, 31(1): 239-298.

Colombo, C., Palumbo, G., He, J. Z., Pinton, R., Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, 14(3): 538-548.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9): 4951-4959.

Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6): 1637-1645.

Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 243(4): 463-472.

Crespo, J.M., Boiardi, J.L., Luna, M.F. (2011). Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agricultural Sciences*, 2(1): 16.

da Silva, R.J., De Oliveira Godoy, R.L., Santos da Rosa, J., Tavares da Silva Souza, V., Stephan, M.P., Dos Santos Teixeira, K.R. (2009). Produção de ácidos orgânicos associada à fixação de nitrogênio em mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Seropédica, RJ, Brasil. Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 53.

Danese, P. N., Pratt, L. A., Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology*, 182(12): 3593-3596.

Dave, B.P., Dube, H.C. (2000). Regulation of siderophore production by iron Fe(III) in certain fungi and fluorescent *Pseudomonas*. Indian journal of experimental biology 38: 297–299.

de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—a comprehensive evaluation. Applied Soil Ecology, 61:171–89.

de-Santiago, A., García-López, A. M., Quintero, J. M., Avilés, M., Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. Soil Biology and Biochemistry, 57: 598-605.

Rangel de Souza, A.L.S., De Souza, S.A., De Oliveira, M.V.V., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M.A., Da Silva, N.D., Rangel P.L., Panisset C.R.S., Olivares F.L., Campostrini E., De Souza Filho, G. A. (2016). Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. Plant and soil, 399(1-2): 257-270.

Dertz, E.A., Raymond, K.N. (2004). Siderophores and transferrins. ChemInform, 35(49).

Dey, R.K.K.P., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological research, 159(4): 371-394.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2015.) InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

Díaz-Zorita, M., Fernández-Canigia, M.V. (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. European journal of soil biology, 45(1): 3-11.

Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Büchel, G., Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. Journal of Applied Microbiology. 107: 1687–1696.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Brener, S. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Functional Plant Biology, 28(9): 871-879.

Dobereiner, J., Day, J. M. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. Nitrogen Fixation by Free-living Micro-organisms (Ed. by WDP Stewart). Cambridge University Press, London.

- Döbereiner, J., Pedrosa, F. O. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers.
- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*, 15(2): 155-166.
- Edi-Premono, M., Moawad, A. M., Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere (No. REP-12113. CIMMYT.).
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11): 5624-5628.
- Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M., Sahin, F. (2006). Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 110(4): 324-327.
- Estefan, G., Sommer, R., Ryan, J. (2013) Plant analysis. In: *Methods of Soil, Plant, and Water Analysis: A manual for the West Asia and North Africa region*. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Beirut, Lebanon, 151-153.
- Fages, J. (1994). *Azospirillum* inoculants and field experiments. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 87-109.
- FÄHRAEUS, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Microbiology*, 16(2): 374-381.
- FAOSTAT (<http://faostat.fao.org>) (2017).
- Ferreira, A. S., Pires, R. R., Rabelo, P. G., Oliveira, R. C., Luz, J. M. Q., Brito, C. H. (2013). Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. *Applied soil ecology*, 72: 103-108.
- Fox, R.L. (1981) External phosphorus requirements of crops. In: Dowdy RH (ed) *Chemistry in the soil environment*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, 223-239.
- Fuentes-Ramírez, L.E., Jiménez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I.R., Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Fulchieri, M., Frioni, L. (1994). *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(7): 921-923.

Galar, M.L., Boiardi, J.L. (1995) Evidence for a membrane bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Applied Microbiology and Biotechnology 43:713-716.

Gardner, F. P., Pearce, R. B., Mitchell, R. L. (1985). Mineral nutrition. Physiology of Crop Plants. Iowa State Univ. Press, Ames, USA.

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Romandini, S., Bompadre, S., Diamanti, J. y Tulipani, S. (2013). The potential impact of strawberry on human health. Natural product research, 27(4-5): 448-455.

Gilbert, G. A., Knight, J. D., Vance, C. P., Allan, D. L. (2000). Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. Annals of Botany, 85(6): 921-928.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P. De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 39(3): 361-364.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 2012.

Govindarajan, M., Balandreau, J., Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Lakshminarasimhan, C. (2006) Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. Plant and Soil 280:239-252.

Grillo-Puertas, M., Martínez-Zamora, M.G., Rintoul, M.R., Soto, S.M., Rapisarda, V.A. (2015). Environmental phosphate differentially affects virulence phenotypes of uropathogenic *Escherichia coli* isolates causative of prostatitis. Virulence. ISSN: 2150-5608.

Grillo-Puertas, M., Schurig-Briccio, L. A., Rodríguez-Montelongo, L., Rintoul, M. R., Rapisarda, V. A. (2014). Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. BMC microbiology, 14(1): 72.

Grillo-Puertas, M., Villegas, J. M., Rintoul, M. R., Rapisarda, V. A. (2012). Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*. PloS one, 7(11): e50368.

Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5): 1231-1240.

Gupta A., Felder M., Verma V., Cullum J., Qazi G.N. (1999). A mutant of

Gluconobacter oxydans deficient in gluconic acid dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* 179: 501-506.

Hernández, C. F., Sosa, F. A., Sanzano, G. A., Morandini, M., Rojas Quinteros, H., Devani, M. R. (2009). Efecto de distintas alternativas de fertilización fosfatada en la secuencia trigo-soja sobre el fósforo asimilable y los rendimientos en la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 86(2): 31-36.

Hider, R.C., Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27: 637–657

Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2): 173-195.

Huergo, L. F., Filipaki, A., Chubatsu, L. S., Yates, M. G., Steffens, M. B., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. (2005). Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters*, 253(1): 47-54.

Hungria, M., Nogueira, M.A., Araujo, R.S. (2013) Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils* 49: 791-801.

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331(1-2): 413-425.

Idogawa, N., Amamoto, R., Murata, K., Kawai, S. (2014). Phosphate enhances levan production in the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *Bioengineered*, 5(3): 173-179.

Isawa, T., Yasuda, M., Awazaki, H., Minamisawa, K., Shinozaki, S., Nakashita, H. (2010). *Azospirillum sp.* strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes and environments*, 25(1): 58-61.

Jin, W. C., He, X. X., Zheng, S. J. (2007). The iron-deficiency induced phenolics accumulation may involve in regulation of Fe (III) chelate reductase in red clover. *Plant signaling and behavior*, 2(5): 327-332.

Bullied, W. J., Buss, T. J., Vessey, J. K. (2002). *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: Field studies. *Canadian journal of plant science*. 82: 291–298.

Johnson, J. F., Vance, C. P., Allan, D. L. (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiology*, 112(1): 31-41.

- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006). The family acetobacteraceae: the genera *acetobacter*, *acidomonas*, *asaia*, *gluconacetobacter*, *gluconobacter*, and *kozakia*. In *The prokaryotes*. Springer New York. 163-200.
- Kirschbaum, D.S. (2014) Frutilla: Condiciones del cultivo en el inicio de la cosecha en Tucumán. (<http://inta.gob.ar/noticias/frutilla-condiciones-del-cultivo-en-el-inicio-de-lacosecha-en-tucuman/>).
- Kirschbaum, D.S., Borquez A.M. (2006). Nutrición mineral de la frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.). <https://www.researchgate.net/publication/270105103>
- Kirschbaum, D.S.; Hancock, J.F. (2000). The strawberry industry in South America. *HortScience*, 35:807-811.
- Kloepper, J.W., Gutierrez-Estrada, A., McInroy, J.A. (2007) Photoperiod regulate elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 159–167.
- Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *Journal of Bacteriology*. 177: 491-496.
- Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. En: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Schröder HC y Müller WEG. (Eds.). Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 23: 1-17.
- Kraemer, S.M. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic sciences*, 66(1): 3-18.
- Kucey, R.M.N. (1988). Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus C-11-25* on two wheat cultivars. *Journal of Applied Bacteriology*, 64: 187-196.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(1): 6-15.
- Kulaev, I.S., Kulakovskaya, T.V., Andreeva, N.A., Lichko, L.P. (1999). Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. En: *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Schröder HC, Müller WEG (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 23: 27-43.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S., Ullrich, M. S. (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 152(10): 2909-2918.
- Laulhere, J.P., Briat, J.F.. (1993). Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochemistry. J.*, 290:693-699.

- Laurent, R., Eric, M. (1994). Factors of acidification of the rhizosphere of mycorrhizal plants: measurement of pCO₂ in the rhizosphere. *Acta Botánica Gall*, 141: 533-539.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A.; Den Ouden, F.M.; Heinsbroek, M.; Bakker, P.A.H.M.; Schippers, B. (1995) Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 85: 1021-1027.
- Li, R. P., MacRae, I. C. (1991). Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(10): 999-1002.
- Lindsay, W. L., Vlek, P. L., Chien, S. H. (1989). Phosphate minerals. *Minerals in soil environments, (minerals in soil)*, 1089-1130.
- Ling, H. Q., Pich, A., Scholz, G., Ganal, M. W. (1996). Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(1-2): 87-92.
- Loganathan, P., Nair, S. (2004) *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt tolerant, nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1185–1190.
- Logeshwaran, P., Thangaraju, M., Rajasundari, K. (2009). Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3: 3564-3567.
- Lugtenberg, B. J., de Weger, L. A., Bennett, J. W. (1991). Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(3): 457-464.
- Luna, M. F., C. F. Mignone, J. L. Boiardi. (2000). The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 564-569.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms* 9na Edición. New Jersey: Prentice Hall.
- Maheshkumar, K. S., Krishnaraj, P. U., Alagawadi, A. R. (1999). Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: A bacterium associated with sugarcane. *Current science*, 76(7): 874-875.
- Marschner, H., Römheld, V. (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165:261-274.
- Marschner, H., Römheld, V., Cakmak, I. (1987) Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition* 10:1175-1184.

- Matzanke, B. F. (1991). Structures, coordination chemistry and functions of microbial iron chelates. In *Handbook of Microbial Iron Chelates*. CRC Press, 23-72 .
- Matzanke, B. F., Muller-Matzanke, G., Raymond, K. N. (1989). Iron carriers and iron proteins. VCH, New York.
- Messenger, A.J.M., Ratledge, C. (1985). Siderophores. In *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, ed Young, M.M. pp. 275–295, Oxford: Pergamon Press.
- Meyer, A. (1904). Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie, und Chemie des Volutins. *Bot Z.* 62: 113-152.
- Miethke, M., Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 413-451.
- Miserendino, E. 2007. Frutilla: Implantación del cultivo bajo cubierta en Patagonia. *Agricultura*. Eds. INTA Esquel, Argentina, pp. 45-48.
- Natheer, S.E., Muthukkaruppan, S. (2012) Assessing the in vitro z 571 inc solubilization potential and improving sugarcane growth by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Annals of Microbiology* 62:435-441.
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265–270.
- Neilands, J. B. (1981). Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry*, 50(1): 715-731.
- Neilands, J. B., Konopa, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R. T., Paw, B. H., Bagg, A. (1987). Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In: Winkelman, G.; van der Helm, D.; Neilands, J.B. (ed). *Iron transport in microbes, plants and animals*. Weinheim, Germany, VCH Publishers, 3-33.
- O’Sullivan, D.J., O’Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews*, 56: 662-676.
- Okon, Y., Bloemberg, G. V., Lugtenberg, B. J. (1998). Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. *Agricultural Biotechnology*, 327-349.
- Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601.
- Olsen, R. A., Clark, R. B., Bennett, J. H. (1981). The enhancement of soil fertility by plant roots: Some plants, often with the help of microorganisms, can chemically modify the soil close to their roots in ways that increase or decrease the absorption of crucial ions. *American Scientist*, 69(4): 378-384.

Ong, S. A., Peterson, T., Neilands, J. B. (1979). Agrobactin, a siderophore from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biological Chemistry*, 254(6): 1860-1865.

O'toole, G. A., Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3): 449-461.

Parra, Y., Cuevas, F. (2001). Revisión bibliográfica Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 23: 31-41.

Paszt, L. S., Zurawicz, E. (2005). Studies of the rhizosphere of strawberry plants at the Research Institute of Pomology and Floriculture in Skierniewice, Poland. *International journal of fruit science*, 5(1): 115-126.

Paul, E.A., Clark, F.E. (1996). Transformation of nitrogen between the organic and inorganic phase and to nitrate. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, San Diego, 131-146.

Pedraza, R.O. (2016). Acetic acid bacteria as plant growth promoters. In: Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A (eds) *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. Springer Japan, Tokyo, 101-120

Pedraza, R. O., Motok, J., Salazar, S.M., Ragout, A.L., Mentel, M.I., Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2): 265-272.

Pedraza, R.O., Ramírez-Mata, A., Xiqui, M.L., Baca, B.E. (2004). Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. *FEMS microbiology letters*, 233(1): 15-21.

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 and soil*, 295:169-178.

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods*, 70(1): 127-131.

Pestana, M., Correia, P. J., Saavedra, T., Gama, F., Abadía, A., de Varennes, A. (2012). Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant physiology and biochemistry*, 53: 1-5.

Peterson, T., Neilands, J. B. (1979). Revised structure of a catecholamide spermidine siderophore: from *Paracoccus denitrificans*. *Tetrahedron Letters*, 20(50): 4805-4808.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting

rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4): 403-415.

Powell, P. E., Cline, G. R., Reid, C. P. P., Szaniszlo, P. J. (1980). Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature*, 287(5785): 833.

Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6: 609-609.

Pritts, M., Handley, D. (1999). Strawberry production guide for the Northeast, Midwest, and Eastern Canada. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service (NRAES), Ithaca, New York, 14853-5701.

Raghothama, K., Karthikeyan, A. (2005) Phosphate Acquisition. *Plant and Soil* 274:37-49.

Rao, N.N., Liu, S., Kornberg, A. (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *Journal of bacteriology*, 180(8): 2186-2193.

Rao, T.P., Yano, K., Iijima, M., Yamauchi, A., Tatsumi, J. (2002). Regulation of rhizosphere acidification by photosynthetic activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings. *Annals of Botany*, 89(2): 213-220.

Raymond, K.N., Dertz, E.A., Kim, S.S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3584-3588.

Reis, V.M., Teixeira, K.R.D.S. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. *Journal of basic microbiology*, 55(8): 931-949

Reis, V.M., Teixeira, K.R.S., Pedraza, R.O. (2011). What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria?. In: Maheshwari D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer, Berlin, Heidelberg

Reusch, R.N., Sadoff, H.L. (1988). Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12): 4176-4180.

Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697.

Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5): 319-339.

- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* *Naturwissenschaften*, 91:552–5
- Rojas, M. M., Rodríguez, A. J., Trujillo, I. D., Heydrich, M. (2009). Relationships between nitrogen fixation and auxins production in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains from different crops. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1): 84-93.
- Römheld, V. (1991). The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant and Soil* 130:127-134.
- Römheld, V., Marschner, H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80(1): 175-180.
- RStudio Team (2015). Integrated development for R. RStudio, Inc. Boston, MA. <http://www.rstudio.com>
- Rudnick, H., Hendrich, S., Pilatus, U., Blotevogel, K. H. (1990). Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphates and cyclic 2, 3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. *Archives of microbiology*, 154(6): 584-588.
- Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology*, 188(1:4474-4486.
- Salazar, S.M., Castagnaro, A.P., Arias, M.E., Chalfoun, N.R., Tonello, U., Díaz-Ricci, J.C. (2007). Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 109-122.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., Sa, T. M. (2008). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, 55(1): 130-140.
- Saravanan, V. S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007). Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn²⁺) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Letters in applied microbiology*, 44(3): 235-241.
- Sas, L., Rengel, Z. E. D., Tang, C. (2002). The effect of nitrogen nutrition on cluster root formation and proton extrusion by *Lupinus albus*. *Annals of botany*, 89(4): 435-442.

- Saxena, B., Modi, M., Modi, V. V. (1986). Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *Microbiology*, 132(8): 2219-2224.
- Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B. (2009). Siderophore-producing *Alcaligenes faecalis* exhibited more biocontrol potential chemical fungicide. *Current of Microbiology*, 58: 47-51.
- Scherer, P. A., Bochem, H. P. (1983). Ultrastructural investigation of 12 Methanosarcinae and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusions. *Canadian journal of microbiology*, 29(9): 1190-1199.
- Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual review of Phytopathology*, 25(1): 339-358.
- Schulte, E.E, Kelling, K.A. (1996). Soil and applied phosphorus. Undersatand plant nutrient. Research Service, University of Wisconsin Extention, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, 4.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- Seshadri S, Muthukumuramasamy R, Lakshiminarasami C, Ignacimuthu S (2000) Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science* 79:565–567.
- Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N., Kennedy, C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(3): 358-366.
- Shah, S., Karkhanis, V., Desai, A. (1992). Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiology*, 25(6): 347-351.
- Steenhoudt, O., Keijers, V., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2001). Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archives of Microbiology*, 175(5): 344-352.
- Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martinez-Drets, G., Döbereiner, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1): 67-72.
- Stumm, W., Morgan, J. J. (2012). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters, John Wiley and Sons, vol. 126.

- Suslow, T. V., Schroth, M. N. (1981). Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Applied and environmental microbiology*, 42(5): 872-877.
- Tait, G. H. (1975). The identification and biosynthesis of siderochromes formed by *Micrococcus denitrificans*. *Biochemical Journal*, 146(1): 191-204.
- Tapia-Hernández, A., Mascarua-Esparza, M. A., Caballero-Mellado, J. (1990). Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios*, 64(259), 73-83.
- Thuler, D. S., Floh, E. I. S., Handro, W., Barbosa, H. R. (2003). Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. *Letters in applied microbiology*, 37(2): 174-178.
- Tomasi N, Kretzschmar T, Espen L. (2009) Plasma membrane H⁺-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate deficient white lupin. *Plant, Cell and Environment* 32:465-475.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R.O. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193: 275-286.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R.O. (2012). Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 356: 279–290.
- Tsutsumi, K., Munekata, M., Shiba, T. (2000). Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1493: 73-81.
- Uhart, S.A., Echeverria, H.E. (1998). El rol del nitrógeno y del fósforo en la producción de maíz: diagnóstico de la fertilización nitrogenada y fosforada. *Boletín técnico Morgan-Mycogen*. Morgan-Mycogen (Ed.), 48.
- Ullio L (2010). Strawberry fertiliser guide. Available 638 at <http://www.dpi.nsw.gov.au>
- Ulrich, A., Mostafa, M. A. E., Allen, W. W., Davis, P. A. (1980). Strawberry deficiency symptoms: a visual and plant analysis guide to fertilization (No. 13665). Berkeley, CA 94720: University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Ureta, A., Nordlund, S. (2002). Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of bacteriology*, 184(20): 5805-5809.
- Valdebenito, M., Crumbliss, A. L., Winkelmann, G., Hantke, K. (2006). Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *International journal of medical microbiology*, 296(8): 513-520.

- Valentinuzzi, F., Pii, Y., Vigani, G., Lehmann, M., Cesco, S., Mimmo, T. (2015). Phosphorus and iron deficiencies induce a metabolic reprogramming and affect the exudation traits of the woody plant *Fragaria* × *ananassa*. *Journal of experimental botany*, 66(20): 6483-6495.
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M. J., Fuentes-Ramírez, L. E., Bravo-Patiño, A., Valdez-Alarcón, J. J. (2011). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Archives of microbiology*, 193(2): 137-149.
- Wächtershäuser, G. (1992). Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Progress in biophysics and molecular biology*, 58(2): 85-201.
- Whitelaw, M.A., Harden, T.J., Helyar, K.R. (1999). Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem* 31: 655-665.
- Wiame, J. M. (1947). Yeast metaphosphate. In *Federation proceedings*, 6(1):302.
- Wood, H. G., Clark, J. E. (1988). Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annual review of biochemistry*, 57(1): 235-260.
- Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H. N., Shaharoon, B., Arshad, M. (2008). Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *J Microbiol Biotechnol*, 18(5): 958-963.
- Zuang, H. (1982). *La fertilisation des cultures légumières*. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. Paris.