

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE RIZOBIOS COMO PROMOTORES
DEL CRECIMIENTO EN ARROZ

por

Andrea AMARILLO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO

URUGUAY

2022

Tesis aprobada por:

Directora:

Dra. Andrea Alejandra Rodriguez Blanco

Ing. Agr. (Dra.) Elena Beyhaut

Lic. (Dr.) Gastón Azziz

Fecha: 19 de abril de 2022

Autor: -----

Andrea AMARILLO

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco y dedico este trabajo a mis padres por su apoyo incondicional durante toda la carrera y por alentarme en los momentos difíciles.

También quiero agradecerle a mi familia y a mi novio por estar siempre presente.

A mis amigos les agradezco las palabras justas en los momentos necesarios y por su ayuda en distintas etapas de la carrera y de la vida.

Le agradezco a mi tutora Andrea Rodríguez por ser mi guía en la elaboración de este trabajo, al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía y a INIA por proporcionar las cepas con las que trabajé como también por permitirme realizar pruebas experimentales.

Por último y no menos importante le agradezco especialmente a mi amiga Sora, por acompañarme y ayudarme en la instalación del ensayo de invernáculo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1. INTERACCIONES BENÉFICAS PLANTAS – MICROORGANISMOS	2
2.2. MECANISMOS BACTERIANOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO	3
2.2.1. <u>Fijación de Nitrógeno</u>	4
2.2.2. <u>Solubilización de Fosfatos</u>	5
2.2.3. <u>Producción de Fitohormonas</u>	6
2.3. RIZOBIOS	9
2.3.1. <u>Simbiosis rizobios – Leguminosas</u>	9
2.3.2. <u>Rizobios como endófitos de plantas no leguminosas</u>	12
2.4. EL CULTIVO DE ARROZ EN EL URUGUAY.....	13
2.4.1. <u>Fase Agrícola</u>	13
2.4.2. <u>Fase Industrial</u>	16
2.4.3. <u>Fase Comercial</u>	16
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	18
3.1. CEPAS DE RIZOBIOS	18
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS	20
3.2.1. <u>Eficiencia simbiótica</u>	20
3.2.2. <u>Características relacionadas a la colonización</u>	21
3.2.3. <u>Características promotoras del crecimiento vegetal</u>	22

3.3. CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO EN <i>ORIZA SATIVA</i>	23
3.3.1. <u>Germinadores</u>	23
3.3.2. <u>Ensayo en invernáculo</u>	23
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	27
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS	27
4.1.1. <u>Eficiencia simbiótica</u>	27
4.1.2. <u>Características relacionadas a la colonización</u>	29
4.1.3. <u>Características promotoras del crecimiento vegetal</u>	36
4.2. CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO INICIAL DE <i>O. sativa</i> CON CEPAS SELECCIONADAS	40
4.2.1. <u>Capacidad de promover la germinación</u>	40
4.2.2. <u>Ensayo en invernáculo</u>	46
5. <u>CONCLUSIONES</u>	52
6. <u>RESUMEN</u>	53
7. <u>SUMMARY</u>	54
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	55

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Cepas de rizobios que nodulan <i>Lotus corniculatus</i> (LRT) o <i>Trifolium repens</i> (TRT) aisladas de raíces de arroz de distintas rotaciones.	18
Cuadro 2. Composición del medio EMA.	19
Cuadro 3. Composición del medio TY.	19
Cuadro 4. Composición del medio Farhaeus.	20
Cuadro 5. Composición de la solución Hoagland.	24
Cuadro 6. Diámetro de los halos de degradación de pectina formados por aislamientos de rizobios que nodulan <i>L. corniculatus</i>	30
Cuadro 7. Crecimiento y relación biofilm / crecimiento para las cepas que nodulan <i>L. corniculatus</i> (LRT).	35
Cuadro 8. Crecimiento y relación biofilm / crecimiento para las cepas que nodulan <i>T. repens</i> (TRT).	35
Cuadro 9. Halos de solubilización y eficiencia de solubilización de fósforo (ES) en cepas de rizobios que nodulan <i>L. corniculatus</i> (LRT).	37
Cuadro 10. Halos de solubilización y eficiencia de solubilización de fósforo (ES) en cepas de rizobios que nodulan <i>T. repens</i> (TRT).	37
Cuadro 11. Síntesis de ácido indol acético por aislamientos que nodulan <i>T. repens</i> (TRT).	39
Cuadro 12. Germinación y largo de raíz en semillas de <i>O. sativa</i> inoculadas con cepas que nodulan <i>L. corniculatus</i> (LRT).	41
Cuadro 13. Germinación y largo de raíz en semillas de <i>O. sativa</i> inoculadas con cepas que nodulan <i>T. repens</i> (TRT).	42
Cuadro 14. Resumen de la caracterización de las cepas aisladas de arroz que nodulan <i>L. corniculatus</i>	44
Cuadro 15. Resumen de la caracterización de las cepas aisladas de arroz que nodulan <i>T. repens</i>	45
Cuadro 16. Número de rizobios en las semillas y raíces de plantas de <i>O. sativa</i> cultivar INIA Olimar inoculadas con cepas de rizobios.	49

Figura No.

Figura 1. Zonas de interacción –microorganismos-planta-.....	3
Figura 2. Vía de biosíntesis de ácido Indol Acético (AIA) en bacterias.....	8
Figura 3. Mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas.....	9
Figura 4. Interacción rizobios - Leguminosa.....	11
Figura 5. Etapas en la formación de nódulos entre rizobios y Leguminosas. ...	12
Figura 6. Distribución de las zonas productoras de arroz en Uruguay.....	14
Figura 7. Cultivares utilizados en la última zafra 2020/2021.....	15
Figura 8. Biomasa generada por plantas de <i>L. corniculatus</i> inoculadas con cepas de rizobios aisladas de arroz (LRT).....	28
Figura 9. Biomasa generada por plantas de <i>T. repens</i> inoculadas con cepas de rizobios aisladas de arroz (TRT).....	29
Figura 10. Halos formados por rizobios que nodulan <i>L. corniculatus</i> en medio TY con agregado de pectina cítrica al 0,5 %.	31
Figura 11. Diámetros de movilidad de aislamientos que nodulan <i>L. corniculatus</i> crecidas en medio agar - agua 0,3 %.	32
Figura 12. Diámetros de movilidad en cepas de <i>T. repens</i> crecidas en medio agar - agua 0,3 %.	33
Figura 13. Disposición de semillas de <i>O. sativa</i> sobre papel tela para evaluación de germinación y cuantificación del largo de raíz.	40
Figura 14. Biomasa (peso seco) generada por raíz y parte aérea de las plantas de <i>O. sativa</i> cultivar INIA Olimar.....	47
Figura 15. Planta de <i>O. sativa</i> inoculada con el aislamiento U204.....	48

1. INTRODUCCIÓN

Diversos microorganismos del suelo pueden establecer relaciones con las plantas. Una de las interacciones de mayor impacto en la sostenibilidad de los recursos e importancia agronómica es la denominada simbiosis que ocurre entre la familia de las Leguminosas y bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico denominadas rizobios.

El nitrógeno proveniente de la fijación simbiótica cumple un rol fundamental en ecosistemas y agroecosistemas, aumentando la fertilidad y la productividad del suelo además de participar en la nutrición de las plantas, este proceso es particularmente importante en la producción agropecuaria de nuestro país donde se realizan rotaciones de cultivos con praderas.

Distintos estudios recientes determinan que además de leguminosas los rizobios pueden colonizar las raíces de ciertas plantas como son los cereales. Las respuestas beneficiosas de esta interacción incluyen mayor germinación, crecimiento de las plántulas, actividad fotosintética, síntesis de nutrientes y finalmente un aumento en el rendimiento de grano. Entre los cereales que se ha comprobado que establecen relaciones con los rizobios se encuentran los de mayor importancia económica a nivel mundial como son trigo, maíz y arroz (Chi et al., 2005).

El cultivo de arroz en Uruguay tiene una importancia destacada en la economía del país; además de ser un sector reconocido mundialmente por producir y exportar arroz de calidad basado en la aplicación de tecnologías como también en el desarrollo de líneas de investigación sobre las distintas etapas del proceso productivo (FAO, 2011).

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar cepas de rizobios comerciales y nativas que nodulan *Trifolium repens* o *Lotus corniculatus* aisladas de raíces de arroz y evaluar su efecto sobre la promoción del crecimiento en las plantas de *O. Sativa*. Para cumplir este propósito en primera instancia se realizó una caracterización *in vitro* de las cepas en base a características relacionadas con la colonización y promoción del crecimiento. Por último, se seleccionaron las cepas que presentaron mayor potencial y se evaluó el impacto de la inoculación de plantas de *O. sativa* en condiciones controladas con las cepas seleccionadas evaluando su efecto en estado de desarrollo temprano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

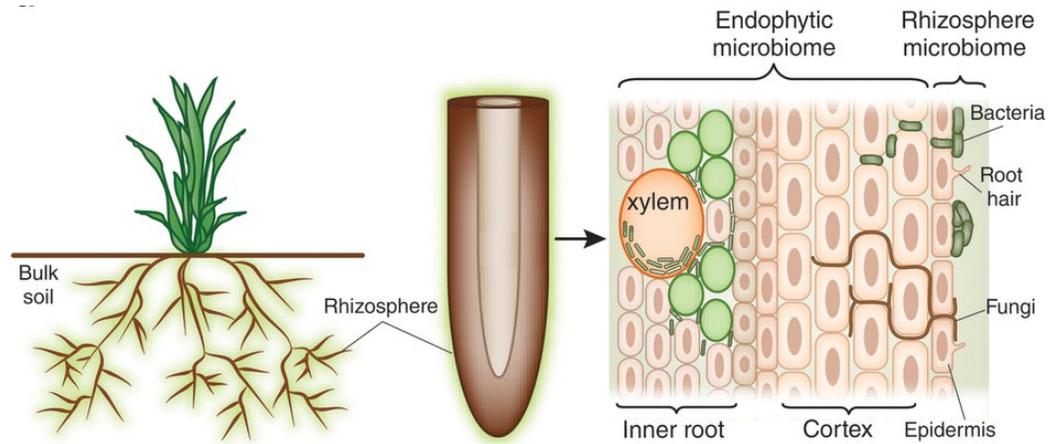
2.1. INTERACCIONES BENÉFICAS PLANTAS – MICROORGANISMOS

Las plantas constituyen excelentes hábitats para los microorganismos (Rives et al., 2007); pueden interactuar y obtener beneficios inclusive de aquellos microorganismos que habitan dentro de sus tejidos denominados endófitos, estas interacciones tienen un impacto positivo sobre el crecimiento de las plantas hospedantes (Santoyo et al., 2016).

Los microorganismos interactúan con las plantas en diferentes niveles, uno de ellos es la rizósfera donde los microorganismos rizosféricos colonizan la superficie de la raíz o se encuentran hasta 1 mm de ella, encontrando un ambiente favorable para sobrevivir y a su vez las plantas obtienen metabolitos de esta población edáfica (Frioni, 2006). La rizósfera se define como el volumen del suelo que recibe influencia de la raíz. Esta capa delgada que circunda la raíz de la planta (cerca de 1 a 2 mm de espesor) ha sido estudiada intensamente en los últimos años (Kuiper et al., 2004). Es la zona donde predominan las interacciones entre plantas y microorganismos (Atlas y Bartha, 2002); esto ocurre porque las raíces se desarrollan en un medio con condiciones poco variables y en donde las concentraciones de nutrientes son altas por lo que constituyen un ambiente ideal para los microorganismos (Rives et al., 2007). Entre las sustancias que exudan las raíces se encuentran aminoácidos, vitaminas, azúcares, secreciones, y restos de tejidos que actúan como fuentes de energía (Atlas y Bartha, 2002, Frioni, 2006).

Otros microorganismos, los endófitos se definen como aquellos que pueden ser aislados de tejidos desinfectados y se caracterizan por penetrar la superficie de las raíces y atravesar distintas capas del tejido vegetal incluso trasladarse por el sistema vascular, por este motivo logran permanecer en diferentes órganos (tallos, hojas), sin generar daños a las plantas (Rives et al., 2007, Santoyo et al., 2016). Los microorganismos endófitos desarrollan actividades dentro de las plantas relacionadas a la promoción del crecimiento o de protección vegetal, viviendo como tales hasta que son liberados al suelo cuando la raíz senesce. En la figura 1 se observa un esquema de las interacciones rizosféricas y por otro lado las comunidades microbianas endófitas de raíz.

Figura 1. Zonas de interacción – microorganismos-planta.



Representación de las interacciones endófitas y rizosféricas. A la derecha se observan microorganismos (hongos y bacterias) en la zona de la rizósfera colonizando la epidermis del sistema radicular de las plantas. A la izquierda microorganismos endófitos que penetran la superficie de la raíz y viven en el interior de ella (corteza y haces vasculares) hasta su senescencia.

Fuente: tomado de Hirsch y Mauchline (2012).

Por otro lado, entre los microorganismos endófitos se encuentran los simbióticos que establecen relaciones de mutualismo con las plantas y entre los más importantes se destaca la simbiosis rizobios–leguminosas (Barea et al., 2005). En esta simbiosis ocurre la invasión de las raíces de las plantas leguminosas por bacterias que toman el nitrógeno atmosférico y lo entregan a las plantas las cuales proporcionan compuestos necesarios para las bacterias (Atlas y Bartha, 2002; Fernández-Canigia, 2020).

2.2. MECANISMOS BACTERIANOS DE PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO

De acuerdo con distintos estudios todas aquellas bacterias que influyen sobre el crecimiento de las plantas de manera positiva indirecta o directamente por cualquier mecanismo, se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Rojas-Contreras et al., 2010). Los efectos benéficos se pueden clasificar como directos que implican la adquisición de nutrientes, alteraciones en los

niveles de sustancias estimuladoras del crecimiento como fitohormonas, o indirectos que están relacionados a la supresión de patógenos como respuesta de control frente a potenciales limitantes que genera el ambiente (Glick, 2014).

2.2.1. Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno (N) es considerado después del agua como el macronutriente más importante para las plantas. Es indispensable por ser constituyente de las principales biomoléculas condicionando los procesos en los que interviene. Forma parte de los aminoácidos constituyentes de las proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN), está presente en las moléculas de almacenaje de energía (ATP y ADP), fosfolípidos y clorofila. Se considera como uno de los factores más importantes que limitan el crecimiento de las plantas en los ecosistemas naturales y en la mayoría de los suelos agrícolas por lo que cumple una función importante en la agricultura incrementando los rendimientos, modificando la composición química y calidad de los cultivos (Márquez et al., 2005; Frioni, 2006; Azcón- Bieto, 2013; Fernández-Canigia, 2020).

El N puede ingresar a los sistemas biológicos por dos vías, una de ellas es la fijación biológica (FBN) que consiste en la transformación del N_2 atmosférico en amonio (NH_4). Distintos microorganismos procariontes pueden llevar a cabo este proceso. Según la fuente de energía que estos utilicen y la interacción con la planta se establecen tres sistemas de fijación biológica compuestos por: organismos de vida libre (no presentan interacción con las plantas y fijan nitrógeno para su propio uso), asociados (usan exudados de la raíz, contribuyen al crecimiento de las plantas sin formar estructuras diferenciadas y no interactúan con una clase taxonómica de plantas específica), o simbióticos (establecen una estrecha relación). Dentro de los organismos simbióticos fijadores de nitrógeno se encuentran un grupo de bacterias aerobias, móviles en el suelo, denominadas rizobios que interactúan con la familia de las Leguminosas y utilizan como fuente de energía compuestos carbonados generados a través del proceso de fotosíntesis por la planta huésped (Marin et al., 1999, Mengel y Kirkby, 2000, Fernández-Canigia, 2020).

La fijación simbiótica del nitrógeno (FSN) es un proceso relevante por su contribución en la economía y sustentabilidad ambiental. La FSN aporta a la conservación del suelo y a la sostenibilidad de los sistemas de producción reduciendo el impacto negativo del uso de fertilizantes (Beyhaut et al., 2015). Otro beneficio ambiental es la reducción de la contaminación de cursos de aguas, y emisiones de gases de efecto invernadero, disminuyendo los efectos negativos sobre la biodiversidad (Beyhaut y Lattanzi, 2019). En términos económicos a nivel

nacional anualmente las leguminosas inoculadas aportan nitrógeno proveniente de la atmósfera en cantidades equivalentes a 500 millones de dólares (Terra y Altier, 2015).

2.2.2. Solubilización de Fosfatos

El fósforo (P) es uno de los principales macronutrientes esenciales requeridos por todos los organismos vivos, después del nitrógeno es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas (Casbis y Torres, 2016). En los suelos su disponibilidad es esencial para el crecimiento vegetal porque constituye más de 0,2% del peso seco de la planta (Banerjee et al., 2010).

Concretamente tiene diversas funciones en las plantas, forma enlaces ricos en energía como es el caso del ATP o ADP, por lo tanto, desempeña una función crítica porque tiene participación en la fotosíntesis, respiración y en todo el metabolismo energético. El fósforo también es un componente estructural de otros constituyentes biológicos como son el ARN y ADN. Debido a que estos componentes regulan el desarrollo y procesos hereditarios en las plantas, la falta de este nutriente tiene un importante efecto en el crecimiento y reproducción (Raghothama, 2000, Azcón- Bieto, 2013).

En el suelo existen diferentes fuentes de fósforo que pueden ser categorizadas como fósforo inorgánico y orgánico. La distribución de las diferentes formas de fósforo en el suelo depende de factores que incluyen tipo de suelo, pH, tipo de vegetación, actividad microbiana y entradas de fertilizantes (Rooney y Clipson, 2009). En este sentido, las plantas toman el fósforo desde la solución del suelo de forma inorgánica como H_2PO_4 ; y/o HPO_4 (Morón, 1996). Este nutriente además de ser imprescindible, es uno de los menos disponibles en la rizósfera, en nuestro país se encuentra en deficiencia en la mayoría de los suelos (Morón, 1996, Casbis y Torres, 2016).

Las plantas han logrado una respuesta evolutiva para afrontar las deficiencias de fósforo en los suelos; para ello han desarrollado estrategias simbióticas, en su morfología y bioquímicas para lograr captar e incorporar este nutriente. Uno de los mecanismos más importantes es la asociación con los microorganismos de la rizósfera capaces de solubilizar las fuentes inorgánicas de fósforo y en consecuencia aumentar su disponibilidad como fosfatos en la solución del suelo (Patiño-Torres y Sanclemente-Reyes, 2014).

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos constituyen un grupo importante dentro de los organismos que promueven el crecimiento vegetal que

incluye hongos y bacterias, están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, siendo componentes integrales del ciclo de este nutriente (Kucey, 1983, Fankem et al., 2006). Dentro de las bacterias se destacan algunos géneros en los que varios estudios han encontrado evidencia de su capacidad solubilizadora de fosfatos como son *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* entre otros (Patiño-Torres, 2010).

Los mecanismos de solubilización pueden generarse por reducción de metales a partir de actividad redox por parte de los microorganismos o producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular que ocurre a partir de un descenso de pH extracelular (Fernández et al., 2005, Lara et al., 2011, Beltrán-Pineda, 2014a). La producción de ácidos orgánicos (glucónico, oxálico, láctico, etc) se origina durante el metabolismo de compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, péptidos y lípidos que se encuentran presentes en la materia orgánica o son exudados por las raíces (Scattareggia, 2016). Los H⁺ generados por el descenso del pH se intercambian con el P ligado a la superficie de los cristales de Al (OH)₃ o Fe (OH)₃ reduciéndolos y liberando al P (Paredes y Espinosa, 2010). También se pueden solubilizar fosfatos sin producir ácidos orgánicos en ese caso el mecanismo principal responsable de la solubilización es la producción de protones durante la asimilación del NH₄⁺ o a través de las actividades respiratorias (Restrepo-Franco, 2015).

2.2.3. Producción de Fitohormonas

Otro de los mecanismos microbianos que mejora el crecimiento de las plantas y la tolerancia al estrés es la capacidad de síntesis de fitohormonas en la rizósfera o el tejido radicular. Las fitohormonas son reguladores de crecimiento, se conocen por tener un rol importante sobre el metabolismo de las plantas y, además, estimulan mecanismo de defensa frente a situaciones estresantes para las plantas (Etesami et al., 2015, Egamberdieva et al., 2017).

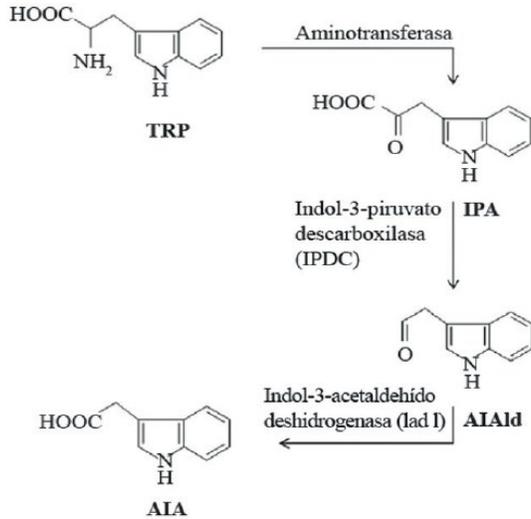
Algunas bacterias que habitan la rizósfera pueden influir en el crecimiento de las plantas al contribuir a la síntesis endógena de fitohormonas, tales como las auxinas (Rojas-Contreras et al., 2010). Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas (Jordán y Casaretto, 2006). El ácido indol acético (AIA) fue uno de los primeros compuestos auxínicos en ser descubierto, es la forma predominante de las auxinas en las plantas, y participa en diversos procesos fisiológicos como la elongación, división celular y la diferenciación de tejidos (Jordán y Casaretto 2006, Vega-Celedón et al., 2016, Borjas-Ventura et al., 2020). Varios estudios destacan que la biosíntesis de este compuesto no sólo

ocurre por parte de las plantas superiores, sino que también en algas y hongos, y entre las bacterias asociadas a las plantas (Rojas-Contreras et al., 2010, Vega-Celedón et al., 2016).

Los AIA bacterianos aumentan el área de la superficie y la longitud de las raíces y, por lo tanto, proporcionan a la planta un mayor acceso a los nutrientes del suelo y la absorción de agua. Es posible que las bacterias productoras de AIA puedan colonizar las raíces de las plantas mejor que otras bacterias debido a que los niveles de AIA debilitan los mecanismos de defensa de las plantas lo que facilita la colonización. El éxito de la invasión y la supervivencia dentro del huésped también requiere que las bacterias superen las respuestas de defensa de las plantas desencadenadas después del reconocimiento microbiano (Soto et al., 2006, Etesami et al., 2015).

Las bacterias benéficas sintetizan predominantemente AIA por una vía alterna (ácido indolpirúvico) dependiente de triptófano (Figura 2). Esta vía de biosíntesis también llamada indol-3-piruvato (IPA) ha sido descrita por ejemplo en algunas bacterias de los géneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* (Spaepen et al., 2007; Rojas-Contreras et al., 2010). El triptófano es un aminoácido que se encuentra entre los principales exudados de las raíces y es el precursor principal en la vía de biosíntesis de AIA por bacterias (Spaepen et al., 2007, Vega-Celedón et al., 2016).

Figura 2. Vía de biosíntesis de ácido Indol Acético (AIA) en bacterias.

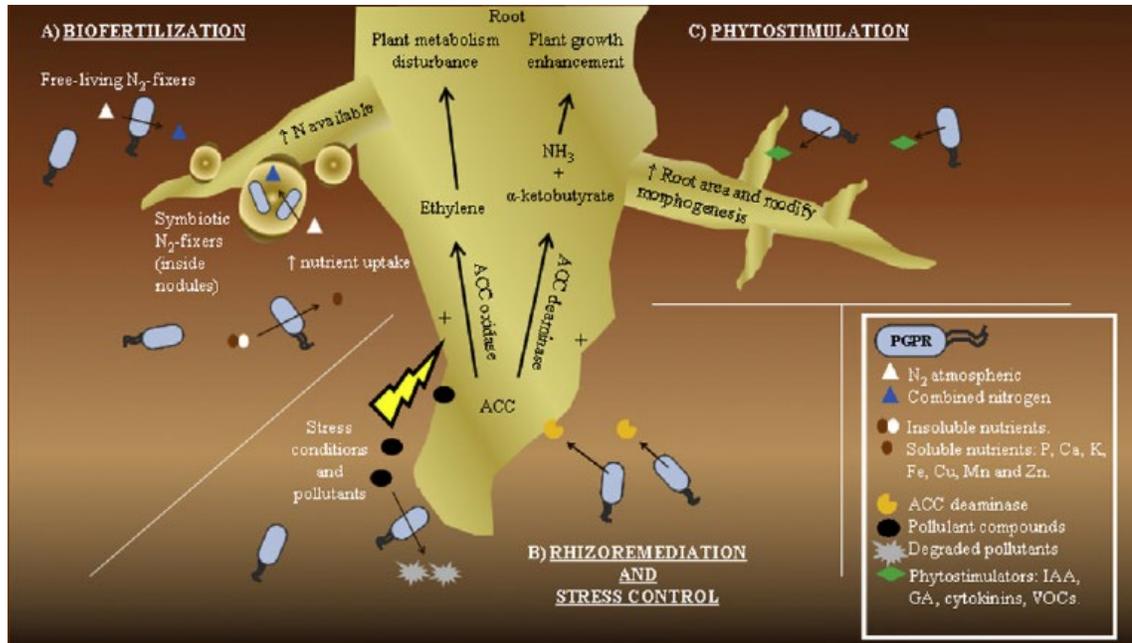


Representación de la vía ácido indolpirúvico de síntesis de AIA. En la primera etapa ocurre la conversión del triptófano (TRP) a ácido indol piruvato (IPA) catalizado por una enzima aminotransferasa. En segundo lugar, por acción de la enzima indol piruvato descarboxilasa el IPA se carboxila a ácido indol acetaldehído (AIAid). En la etapa final el AIAid es oxidado a AIA.

Fuente: Tomado y adaptado de Vega-Celedón et al. (2016).

La figura 3 muestra una representación de algunos de los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas anteriormente descritos. Las bacterias tienen la capacidad de promover el crecimiento mediante la biofertilización que mejora la absorción de nutrientes, como por ejemplo la FBN o la solubilización de P. Por otro lado, la fitoestimulación que refiere la liberación de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas que genera efectos sobre la morfología de las raíces, tasa de germinación de las semillas, crecimiento de área foliar. Otros mecanismos implicados son la rizorremediación y control del estrés, que no se amplían en esta tesis.

Figura 3. Mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas.



Principales mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas: Biofertilización asociado a la capacidad de mejorar la absorción de nutrientes como nitrógeno y fósforo, fitoestimulación a través de la síntesis de fitohormonas, por último, se describe el mecanismo relacionado con el control de estrés y agentes patógenos.

Fuente: tomado de Pérez-Montaño et al. (2014).

2.3. RIZOBIOS

2.3.1. Simbiosis rizobios – Leguminosas

Los rizobios son bacterias heterótrofas, aerobias, gramnegativas, de forma normalmente bacilar o cilíndrica, y generalmente móviles gracias a que poseen flagelos polares o peritricos, según como se inserten en la superficie de las células, en sus extremos o en muchos sitios respectivamente. En medios sólidos forman colonias planas a convexas y el color puede variar desde blanco opaco, a blanco lechoso, o traslúcidas; tienen aspecto mucilaginoso debido a que

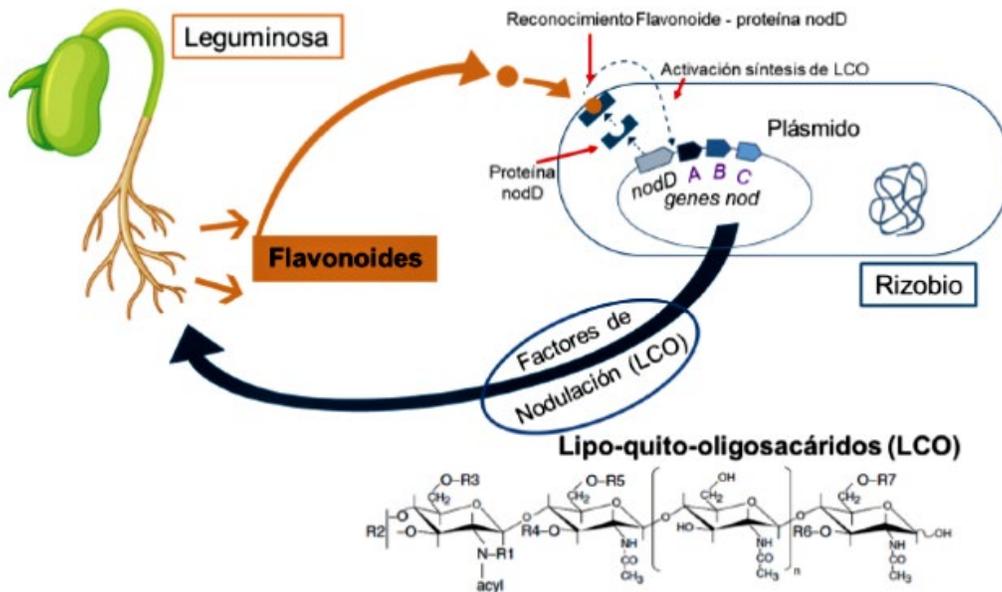
la mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos extracelulares (Frioni, 1990, Madigan et al., 2015, Azcón-Bieto y Talón, 2013).

En función de sus características se pueden categorizar en dos grupos; rizobios de crecimiento rápido con tiempo de generación entre 3 y 4,5 horas y de crecimiento lento con tiempo de generación entre 6 y 8 horas, los primeros acidifican el medio y liberan abundante cantidad de polisacáridos mientras que los rizobios de crecimiento lento alcalinizan el medio y generan menor cantidad de polisacáridos (Frioni, 1990).

Los rizobios tienen la capacidad de interactuar con plantas pertenecientes a la familia de las Leguminosas, como respuesta a esta interacción se induce la formación de estructuras denominadas nódulos en las raíces de las plantas. En los nódulos estas bacterias mediante una reacción catalizada por el complejo nitrogenasa, reducen el nitrógeno en su forma gaseosa a un compuesto utilizable (NH_4) que es asimilado por las células (Marin et al., 1999; Mayz-Figueroa, 2004).

Para que ocurra un reconocimiento mutuo entre las plantas y los rizobios se genera un proceso mediado por señales bioquímicas, en el que las leguminosas secretan flavonoides a través de la raíz, estas sustancias son quimioattractantes y provocan el desplazamiento de los rizobios hacia la superficie radical. También inducen la expresión de genes nod requeridos para producir factores de nodulación (Nod); estos forman un grupo de lipo- quitooligosacáridos que son reconocidos por células que se encuentran en la epidermis de la raíz de la planta huésped (Oldroyd et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4. Interacción rizobios - Leguminosa.

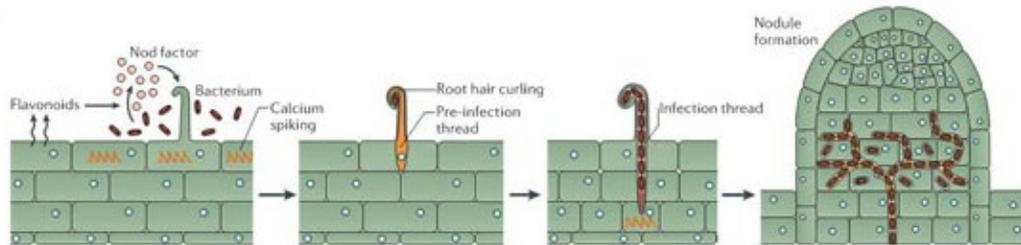


Mecanismo de reconocimiento entre rizobios y plantas mediado por señales bioquímicas. Las leguminosas secretan sustancias (flavonoides), el reconocimiento de ellos por los rizobios da lugar a la síntesis de proteína nodD. A continuación, se expresan genes implicados en el proceso de nodulación.

Fuente: tomado de Fernández-Canigia (2020).

Las bacterias pueden ingresar a las plantas por distintos mecanismos, aunque la forma de infección más común es la adhesión de los rizobios a los pelos radicales, para ello los rizobios se desplazan hacia puntos localizados de las raíces y luego se produce la curvatura o ramificación de los pelos radicales que envuelven las células bacterianas a continuación se forma un tubo denominado filamento o hilo de infección que se extiende por el pelo de la raíz, dentro de los tejidos infectados los rizobios se multiplican dando lugar a la morfogénesis del nódulo. Los rizobios se liberan hacia el citoplasma de la célula huésped y rodeados por una membrana vegetal forman simbiosomas donde se diferencian en bacteroides dando lugar al proceso de fijación de nitrógeno (Ferguson et al, 2010, Kouchi et al., 2010). La figura 5 representa los procesos involucrados en la formación de los nódulos.

Figura 5. Etapas en la formación de nódulos entre rizobios y Leguminosas.



Esquema del establecimiento de la simbiosis rizobio – leguminosa. 1- las raíces liberan flavonoides que son reconocidos por los rizobios presentes en la rizósfera que como respuesta secretan factores de nodulación 2- ingreso de rizobios a través de la curvatura de pelos radiculares 3- formación del hilo de infección 4- ramificación del hilo de infección que permite la colonización del tejido y formación del nódulo a partir de divisiones celulares constantes.

Fuente: tomado de Oldroyd et al. (2013).

Cuando la planta muere, el nódulo se deteriora, liberando bacteroides en el suelo. Aunque estos son incapaces de dividirse, un pequeño número de células de rizobios durmientes está siempre presente en el nódulo. Estas células pueden proliferar, empleando como nutrientes algunos de los productos del nódulo deteriorado. Las bacterias pueden entonces iniciar la infección en la siguiente estación de crecimiento, o bien mantener una existencia libre en el suelo.

2.3.2. Rizobios como endófitos de plantas no leguminosas

Las distintas cepas de rizobios pueden establecer relaciones endofíticas con plantas de otras familias como las gramíneas. En Egipto hace más de 700 años se realizan rotaciones trébol - arroz asegurando una población de rizobios en el suelo, estos que comúnmente son simbioses de leguminosas se han encontrado dentro de las raíces de las plantas de arroz (Yanni et al., 1997). Los rizobios colonizan en grupos las zonas laterales o los extremos de las raíces, a su vez pueden multiplicarse y sobrevivir dentro de los tejidos vegetales de las plantas de arroz (Prayitno et al., 1999).

Algunas cepas de rizobios pueden promover significativamente el crecimiento de las plantas de arroz. El rendimiento del grano, la absorción de nutrientes como por ejemplo fósforo y la concentración de AIA en raíces de plantas de arroz puede aumentar como respuesta a la inoculación de las plantas con cepas de rizobios (Biswas et al., 2000). La inoculación de semillas de arroz con cepas de rizobios tiene efectos en el crecimiento y rendimiento de las plantas, este aumento en el rinde es producto de mecanismos que aumentan la tasa fotosintética y ello se observa en la producción total de biomasa del cultivo (Peng et al., 2008). Resultados similares se obtuvieron, en un estudio en el que se evaluó el efecto de la inoculación con distintas cepas de rizobios sobre el crecimiento de las plantas de arroz; se alcanzó un mejor crecimiento de las plantas en comparación al control no inoculado destacando la capacidad de los rizobios para influir en el crecimiento vegetativo, actividad fotosintética y reproductiva (Chi et al., 2005).

2.4. EL CULTIVO DE ARROZ EN EL URUGUAY

Por sus características climáticas y geográficas Uruguay puede desarrollar la producción de arroz como una de las principales actividades de su sistema productivo agroindustrial (INIA, 2006). La existencia de un clima sub-tropical húmedo, una distribución anual de las lluvias e importantes fuentes de agua dispersas por todo el territorio nacional han creado las condiciones para que el arroz en nuestro país se convierta en una de las principales fuentes productivas y de mano de obra (MINTUR, 2021).

En cuanto al área que ocupa el rubro la superficie sembrada total de arroz en la zafra 2020/21 fue estimada en poco más de 139 mil hectáreas. (MGAP. DIEA, 2021). La zafra 20/21 obtuvo un rendimiento récord promedio de 188 bolsas por hectárea -secas y limpias- que representan 9.400 kg/ha, 10% más que la zafra anterior y el más alto de la historia, después de los 8.800 kg/ha de la zafra 2008-09 (Récord en producción..., 2021).

2.4.1. Fase Agrícola

La categoría de semilla más utilizada es la certificada. La certificación de semillas implica que INASE verifique la conformidad de que la producción se realiza de acuerdo con los requisitos establecidos en los estándares de producción y comercialización de esta especie (Sotelo, 2011).

El cultivo de arroz alterna generalmente el uso del suelo con la ganadería rotando con pasturas sembradas o regeneradas y ocasionalmente con otros cultivos (Molina et al., 2019).

Como se observa en la figura 6 el cultivo de arroz se localiza en tres zonas: norte-litoral oeste, centro y este. La zona norte-litoral oeste está conformada por los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro y Soriano; la zona centro por Rivera, Tacuarembó y Durazno y la zona este por Cerro Largo, Treinta y Tres, Rocha y Lavalleja (MGAP. DIEA, 2019).

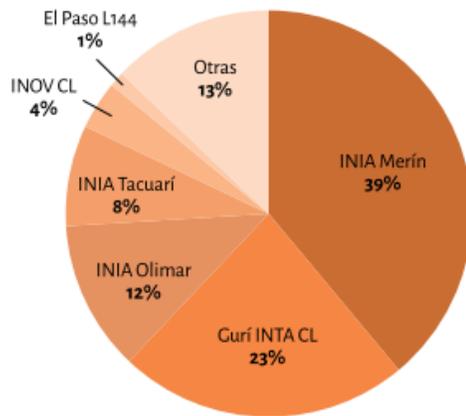
Figura 6. Distribución de las zonas productoras de arroz en Uruguay.



Fuente: tomado de Zorrilla (2015).

El número y proporción de cultivares sembrados ha cambiado sustancialmente en los últimos años. En 2005 3 cultivares, INIA Tacuarí, El Paso 144 e INIA Olimar ocupaban el 95% del área del país (Molina et al., 2020). En la zafra 2020/2021 las variedades INIA Merín, Gurí INTA CL e INIA Olimar fueron las más sembradas (Figura 7) (MGAP. DIEA, 2021).

Figura 7. Cultivares utilizados en la última zafra 2020/2021.



Tomado de Récord en producción... (2021).

INIA Merín, liberado en 2015, es un cultivar del subtipo Índica, de grano largo fino, con muy alto potencial de rendimiento. La calidad molinera es adecuada con destacados porcentajes de granos enteros y blanco total. Este cultivar expresa su potencial productivo en siembras tempranas en la región Este, Centro-Norte y Norte del país (INIA, 2018).

GURI INTA CL se caracteriza por un alto rendimiento agrícola, excelente calidad molinera y culinaria, además de ser resistente a herbicidas del grupo de las imidazolinonas (tecnología Clearfield). Es clara la tendencia de los productores de la región a plantar variedades de arroz con esta tecnología por ser, en principio, una herramienta eficaz al problema de malezas, especialmente el arroz rojo (Sanabria, 2018).

INIA Olimar proviene del cruzamiento entre una línea introducida en viveros internacionales (CIAT) y una línea local, hermana de INIA Cuaró, realizado en INIA Treinta y Tres en 1991. Se ha destacado a nivel experimental por su elevado potencial de rendimiento, estabilidad, y precocidad (Blanco et al., 2004).

El arroz es un cultivo que implementa sistema de riego y la técnica utilizada implica la siembra en condiciones de secano con inundación continua desde los 15 a 45 días posteriores a la emergencia hasta que el cultivo alcanza la madurez fisiológica (Balian et al., 2018).

El complejo arrocero requiere un elevado nivel de inversión por hectárea en lo referido a costos directos, y de un paquete tecnológico que tiene implícito el disponer de cierta escala de producción y de un nivel empresarial para el adecuado desarrollo de la actividad (García et al., 2011). Esto hace que el sector en nuestro país se caracterice por tener productores con un perfil más empresarial, donde los productores de tipo familiar prácticamente no existen (Tommasino y Hernández, 2003).

2.4.2. Fase Industrial

El sector arrocero del Uruguay se caracteriza por una sólida integración vertical de los agentes, donde sus actividades involucran todas las etapas de la cadena productiva, desde las etapas iniciales del cultivo hasta la exportación (Courdin y Hernández, 2013).

Es destacable la fuerte interacción que existe entre las distintas partes del complejo, desde el cultivo en la chacra, hasta la exportación del grano, pasando por los agentes de financiación, instituciones de investigación, la industria, y el Estado como integrante en la negociación de los precios y en la implementación de políticas (Courdin, 2014).

2.4.3. Fase Comercial

Uruguay ocupa el 7º lugar en el mundo en las exportaciones de arroz según el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria del Uruguay (INIA). De acuerdo a datos de la Asociación de Cultivadores de Arroz, Uruguay lo vende a más de 60 países, alimenta a más de 17 millones de personas y genera en el país, más de U\$S 500 millones en exportaciones y 30.000 puestos de trabajo directos e indirectos (MINTUR, 2021).

El 95% de la producción de arroz se exporta, y este rubro ocupa el quinto lugar entre las principales exportaciones del país (López Rodríguez et al., 2020). El restante 5% se asigna al mercado interno (consumo humano y semilla principalmente) (Salgado, 2019).

Los controles aplicados a la producción de la semilla, el uso de tecnología de última generación para los procesos de sembrado, cosecha, secado y de molinería, y los cuidados relativos al transporte y comercialización, han sido la causa principal para el actual posicionamiento en el mercado internacional.

Además, es importante destacar la no introducción de arroz transgénico al sistema arrocerero de nuestro país, lo que ha permitido que el arroz uruguayo sea reconocido como natural a nivel mundial (Courdin y Hernández, 2013, Courdin, 2014).

Teniendo en cuenta la importancia del sector arrocerero en nuestro país y considerando los antecedentes analizados que evidencian las interacciones benéficas entre plantas de arroz y rizobios que colonizan las raíces comportándose como endófitos; se formuló la hipótesis de este trabajo y en ella se plantea que cepas de rizobios nativas aisladas de arroz y comerciales que nodulan *Lotus corniculatus* o *Trifolium repens* promueven el crecimiento de raíces y parte aérea en plantas de arroz.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS DE RIZOBIOS

Para este trabajo se utilizó una colección de cepas de rizobios del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía que nodulan *Lotus corniculatus* o *Trifolium repens*. Las cepas habían sido aisladas de raíces desinfectadas de plantas de arroz obtenidas del ensayo de larga duración de la Estación Experimental Paso de la Laguna, INIA, Treinta y Tres (Terra et al., 2003). Se seleccionaron 14 aislamientos que nodulan *Trifolium repens* y 16 que nodulan *Lotus corniculatus* teniendo en cuenta el origen de los mismos ya que provenían de distintas rotaciones arroceras y el perfil de BOX-PCR que presentaban según caracterización genética realizada previamente (Cuadro 1). Además, se utilizaron cepas de referencia que se emplean para la elaboración de los inoculantes comerciales de Uruguay: U531 *Mesorhizobium loti*, U510 *Mesorhizobium huakuii* y U204 *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, cedidas por el Laboratorio de Microbiología de suelo de INIA, Las Brujas.

Cuadro 1. Cepas de rizobios que nodulan *Lotus corniculatus* (LRT) o *Trifolium repens* (TRT) aisladas de raíces de arroz de distintas rotaciones.

Cepas	Origen (rotación y bloque)	Perfil BOX-PCR	Cepas	Origen (rotación y bloque)	Perfil BOX-PCR
LRT4	R4 I	I	TRT 3	R4 III	II
LRT11	R4 I	II	TRT6	R4 III	nd
LRT13	R4 I	III	TRT7, 10	R4 III	I
LRT14	R4 I	V	TRT1, 8, 14, 17	R4 III	III
LRT28	R4 III	III	TRT21	R3 I	V
LRT30	R4 III	nd	TRT28, 33, 34, 35	R2 II	III
LRT35	R4 III	IV	TRT48k	R5	X
LRT36	R4 III	nd			
LRT47	R4 III	VI			
LRT56	R4 III	nd			
LRT60	R4 III	VII			
LRT64	R4 III	VIII			
LRT65	R4 III	V			
LRT70	R3 III	nd			
LRT72	R3 III	III			
LRT74	R3 III	V			

R2: rotación arroz-cultivo, R3: arroz-pradera corta, R4: arroz-pradera larga, R5: arroz-soja-pradera, nd: no determinado.

3.1.1. Condiciones de crecimiento de las cepas

La colección de cepas de rizobios se encontraba conservada en glicerol a -20°C en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía. Para el crecimiento de las cepas en medio sólido se utilizaron placas con medio EMA (Extracto de levadura-Manitol-Agar) (Cuadro 2). Se realizaron sucesivos repiques hasta obtener colonias aisladas y las placas se incubaron a 28°C .

Cuadro 2. Composición del medio EMA.

Componentes	Cantidad
K_2HPO_4	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
Manitol	10 g/L
Extracto de levadura	0,4 g/L
Agar	18 g/L
Solución rojo congo 1/400	10 ml/L

El crecimiento en líquido se realizó en tubos con medio TY (Tryptone-Yeast Extract) (Cuadro 3), incubados a 28°C con agitación a 150 rpm. Una vez crecidos se determinó la densidad óptica a 600 nm para ajustar el número de células requerido en cada ensayo.

Cuadro 3. Composición del medio TY.

Componentes	Cantidad
Triptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
$\text{Cl}_2\text{Ca}_2\text{H}_2\text{O}$	0,87 g/L

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

3.2.1 Eficiencia simbiótica

Se evaluó la eficiencia simbiótica de los aislamientos en condiciones controladas. Para el crecimiento de las plantas se emplearon tubos con 25 ml de medio Fahraeus (Cuadro 4) al que se le agregó 7 g/l de agar.

Cuadro 4. Composición del medio Fahraeus.

Solución	Solución stock	g/1000 solución stock	ml de	ml de solución stock/L de solución
1	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	15		10
2	FeCitrato	5		10
3	CaCl ₂	10		10
4	MgSO ₄ . 7H ₂ O	12		10
5	K ₂ HPO ₄	10		10
6	micronutrientes			1

Solución de micronutrientes del medio Fahraeus.

Solución	Solución stock	g/100 solución stock	ml de	ml de solución stock/L de solución
1	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.04		1
2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.012		1
3	H ₃ BO ₃	0.140		1
4	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.1		1
5	MnSO ₄ .H ₂ O	0.150		1

Se desinfectaron semillas de *Lotus corniculatus* y *Trifolium repens* sumergiéndose durante 1 minuto en alcohol 70% (v/v), 2 minutos en hipoclorito 2% y finalmente se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril. Para la germinación se utilizaron semillas desinfectadas que fueron colocadas en placas con agar- agua 3% y se incubaron en la cámara de crecimiento durante 2 días a 28 °C. Luego de germinadas se sembraron 2 semillas de cada especie por tubo. La inoculación se realizó 2 días después del trasplante con 1 ml del cultivo puro con 10⁹ ufc de cada cepa por tubo, con 4 repeticiones por cepa. Para el caso de *Lotus corniculatus* se incluyó un tratamiento inoculado con la cepa comercial U531 *Mesorhizobium loti*, y para *Trofolium repens* un tratamiento inoculado con la cepa comercial U204 *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. Se incluyó un tratamiento control que no fue inoculado y un tratamiento con aplicación

nitrogenada (1mL de solución de KNO₃). Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento a 25 °C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad como fotoperiodo. La cosecha se realizó a los 2 meses de realizada la siembra. Se analizó la capacidad de las cepas de nodular las plantas para lo que se determinó el número de plantas noduladas al momento de la cosecha y la eficiencia simbiótica que se determinó mediante el peso seco de la parte aérea y de la raíz secados en estufa a 60°C durante 48 horas.

La capacidad de nodulación y eficiencia simbiótica de las cepas aisladas de arroz que nodularon trébol fue determinada utilizando el mismo procedimiento que en *L. corniculatus*, pero con semillas de *T. repens*.

3.2.2. Características relacionadas a la colonización

3.2.2.1. Degradación de pectina

La capacidad de degradar pectina se evaluó utilizando medio TY sólido agregando pectina cítrica con una concentración de 0.5% (p/v). Las cepas crecieron en medio TY líquido a 28°C con agitación y se ajustó densidad óptica a 600 nm a 0,4 con medio TY. En cada placa se inocularon por triplicado gotas con 10 µl del cultivo puro de cada cepa. Debido a las diferencias en velocidad de crecimiento de las cepas las placas inoculadas con los aislamientos de *L. corniculatus* se incubaron a 28°C por 9 días mientras que los aislamientos que nodulan *T. repens* se incubaron por 5 días.

Para determinar la capacidad de cada cepa de hidrolizar pectina, luego de la incubación las placas se cubrieron con lugol durante 2 minutos, se eliminó el excedente y se midió el diámetro del halo y de la colonia formada (Pariona-Llanos et al., 2010).

3.2.2.2. Movilidad-swimming

La movilidad se evaluó utilizando placas con agar al 0,3% (p/v) y agua. Las cepas crecieron en medio TY líquido a 28°C con agitación, se ajustó densidad óptica a 600 nm a 0,4 con medio TY y luego se diluyeron 1/10. Cada placa se inoculó por triplicado con 1 µl del cultivo crecido. Para realizar la inoculación se introdujo la pipeta 1 mm por debajo de la superficie del agar. Los aislamientos que nodulan *L. corniculatus* y *T. repens* se incubaron en estufa a 28°C durante 28 y 31 días respectivamente. Posteriormente se midió el halo blanco formado en cada punto en que se realizó la inoculación como indicador de la capacidad de movilidad de las cepas (Vicario et al., 2015).

3.2.2.3. Formación de Biofilm

Para evaluar la formación de biofilm se siguió el método de cristal violeta (Mareque et al., 2015). Para llevar a cabo este procedimiento las cepas crecieron en medio TY líquido a 28°C con agitación y se ajustó la densidad óptica a 600 nm a 0,1 con NaCl 0,85%. Se inocularon microplacas de 96 pocillos con 100 µl de los cultivos crecidos (5 repeticiones por cepa), más un control que consistió en medio TY estéril. Las microplacas se incubaron tapadas sin agitación durante 48 horas a 28°C. Luego de la incubación se midió el crecimiento a 590 nm.

Para analizar la formación de biofilm se descartó el cultivo, se lavaron las placas tres veces con NaCl 0.85% (p/v) y se secaron invertidas a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cristal violeta 0.1% (v/v) y se incubaron durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se eliminó el colorante invirtiendo las placas, se enjuagaron con agua destilada y secaron con papel absorbente. Por último, se agregaron 200 µl de alcohol 95% (v/v) y se incubaron durante 10 minutos hasta realizar la lectura de la placa a 570 nm.

3.2.3. Características promotoras del crecimiento vegetal

3.2.3.1. Solubilización de fosfatos

Se utilizó medio sólido NB-RIP con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo compuesto por: Glucosa 10g/L; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g/L; KCl 0,2g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1g/L; agar 1,5% (p/v) (Nautiyal, 1999). Las cepas crecieron en medio TY líquido a 28°C con agitación, se ajustó densidad óptica a 600 nm a 0,4 con medio TY. En cada placa se inocularon por triplicado gotas con 10 µl del cultivo puro de cada cepa. Se realizaron 3 repeticiones por cepa. Las placas fueron incubadas durante 30 días a 28°C. Por último, para estimar la capacidad solubilizadora de las distintas cepas se midió el halo de solubilización y se calculó el índice de solubilización determinado como la relación entre el halo de solubilización (colonia + halo zona) / diámetro de la colonia (Kumar y Narula, 1999).

3.2.3.2. Producción de ácido Indol acético

Se utilizó la técnica de Salkowsky (Gordon y Weber, 1951). Inicialmente cada una de las cepas se cultivó durante 48 horas con agitación en tubos de 3 ml de medio TY líquido suplementado con 2 mg. mL^{-1} de triptófano. Se midió la densidad óptica a 600 nm como medida del crecimiento alcanzado por cada cepa. Cada cultivo se centrifugó a 12000 RPM durante 15 minutos, y luego se mezclaron 750 µl del sobrenadante del cultivo con 750 µl del reactivo Salkowsky (50 mL 35 % HClO_4 + 1mL FeCl_3). Se incubó a temperatura ambiente en la

oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 530 nm. La concentración de AIA se calculó utilizando un curva patrón con concentraciones de AIA desde 2.5 a 40 µg/ml. El crecimiento de los aislamientos a 600 nm presentó variabilidad por lo que la variable AIA (µg/ml) se normalizó en base a los valores de DO a 600 nm y se expresó como AIA/ crec.

3.3. CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO EN *ORIZA SATIVA*

La capacidad de las cepas de rizobios de promover el crecimiento de *O. sativa* cultivar INIA Olimar se evaluó en dos ensayos: germinadores y un ensayo en invernáculo.

3.3.1. Germinadores

Para realizar este ensayo las cepas que nodulan de *L. corniculatus* o *T. repens* se incubaron en medio líquido TY a 28°C durante 36 horas. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se ajustó a 0,3 con medio TY.

Para esterilizar las semillas de *O. Sativa* se las sumergió en hipoclorito 2% y alcohol 70% por 1 y 2 minutos respectivamente, luego se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Se pesaron 2 gramos de semillas, se colocaron en frascos con los cultivos de las cepas crecidas con agitación durante 30 minutos y, luego se sembraron. Para realizar la germinación se utilizaron servilletas de papel absorbente en el que se distribuyeron las semillas de forma horizontal conformando tres líneas (bloques) de 15 semillas cada uno. Se incluyó un tratamiento control sin inocular en el que se sumergieron las semillas en NaCl 0.85%.

Las servilletas se enrollaron y se mantuvieron en bolsas de nylon a 28 °C con riego con agua estéril cada dos días hasta la cosecha 15 días post inoculación. Al momento de la cosecha se contabilizó el total de semillas germinadas, y se midió la extensión de la raíz de cada semilla.

3.3.2. Ensayo en invernáculo

Para realizar este ensayo se seleccionaron 3 cepas de rizobios que nodulan *L. corniculatus* y 3 cepas que nodulan *T. repens* teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos mencionados anteriormente, además se incluyeron las cepas comerciales U510 *Mesorhizobium huakuii* y U204

Rhizobium leguminosarum *bv. trifolii*. Las cepas se cultivaron en frascos con 100 mL de medio líquido TY a 28°C con agitación. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se realizaron las diluciones necesarias en NaCl para llevar los cultivos a una densidad óptica de 0.6.

Las semillas de *O. sativa* cultivar INIA Olimar fueron desinfectadas con el mismo procedimiento que se utilizó en la prueba de germinación e inoculadas colocándolas en los frascos con los cultivos diluidos durante 30 minutos con agitación. Posteriormente se realizó la siembra de dos semillas por maceta con 500 g de arena y vermiculita estéril en proporción 1:1. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento.

Las plantas fueron mantenidas durante 30 días en invernáculo con riego diario con 200 ml de solución Hoagland (Cuadro 5) y agua hasta llegar a 800 g.

Cuadro 5. Composición de la solución Hoagland.

Solución	Solución stock	g/100 ml de solución stock	ml de solución stock/L de solución nutritiva	Elemento de
1	KNO ₃ 1M	10,11	6	K N
2	CaSO ₄ 1M	17,22	4	Ca S
3	MgSO ₄ .7H ₂ O 1 M	24,647	1	Mg S
4	KH ₂ PO ₄ 1 M	13,609	2	K P
5	Solución de micronutrientes	-	2	
6	Fe-EDTA 1000 mg/L	3	0,3	Fe

Solución de micronutrientes (5)

Compuesto	g/100 ml de solución stock	Elemento
KCl	0,1864	Cl
H ₃ BO ₃	0,0773	B
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0169	Mn
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0288	Zn
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,0062	Cu
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,0041	Mo

Con la finalidad de conocer el número de rizobios presentes en la semilla de *O. sativa* al momento de la siembra se realizó un recuento de viables en placa. Se colocaron 9 semillas en tubos con 9 mL de NaCl 0,85% (p/v) y de este tubo se realizaron 5 diluciones seriadas en tubos con NaCl 0,85% (p/v) y se sembraron

100 µL de cada dilución en placas con medio EMA por duplicado. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días para los tratamientos inoculadas con rizobios que nodulan *T. repens* y 10 para los inoculados con cepas que nodulan *L. corniculatus*. Se contaron colonias en las diluciones que presentaron entre 30-300 colonias y se expresó el resultado como ufc/semilla.

Posteriormente a los 10 días de la siembra, se llevó a cabo otro recuento de rizobios presentes en las raíces utilizando la técnica de micro gota (Howieson y Dilworth, 2016). Se extrajeron las raíces de las plantas, una repetición de cada tratamiento y se pesaron sobre papel de aluminio. A continuación, se colocaron en tubos con 9 mL de NaCl 0,85% (p/v), se agitaron durante 2 minutos y se realizaron diluciones seriadas. Las placas se dividieron en 6 sectores para realizar la inoculación; se colocó una gota (25 µl) de cada dilución en cada sector, evitando salpicar para no contaminar entre las diluciones. Las placas se incubaron en estufa a 28 °C durante 2 días. Las placas se observaron para determinar el número colonias teniendo en cuenta que el método toma como dilución apropiada para el conteo aquella que presente entre 5-50 ufc. El resultado obtenido se corrigió por el peso de las raíces para expresar el número de ufc/g de raíz.

Al momento de la cosecha (30 días desde la instalación del ensayo) se determinó peso seco de parte aérea y de raíz secados en estufa a 60°C durante 48 horas.

Para determinar la presencia de rizobios viables luego de transcurridos 30 días de la inoculación, se realizó un ensayo utilizando un macerado de raíces desinfectadas. Se elaboró una muestra compuesta por 0,1 g de raíces de cada una de las 5 repeticiones realizadas para cada tratamiento. Las raíces se desinfectaron en alcohol 70% e hipoclorito 2% por 1 y 2 minutos respectivamente, luego se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Se colocaron en total 0,5 g de raíces en un mortero estéril y se maceraron utilizando con 9 mL de NaCl 0.85% (p/v). De ese macerado se prepararon diluciones seriadas que fueron utilizadas para inocular con 1 mL las plantas de *L. corniculatus* y *T. pratense* luego de 3 días de sembradas. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Luego de 30 días se determinó la presencia o no de nódulos en las plantas. El procedimiento utilizado para el crecimiento de las plantas de *L. corniculatus* y *T. pratense* fue similar al empleado en el ensayo de eficiencia simbiótica; se prepararon tubos con 25 mL de medio Fahraeus, y se sembraron las semillas desinfectadas y pregerminadas.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de todos los ensayos se realizó utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2018) y la normalidad fue evaluada con el test de Shapiro-Wilk.

La variable peso de planta entera analizada en el ensayo de eficiencia simbiótica no se distribuyó normalmente por lo que se transformó utilizando la función raíz cuadrada. Se utilizó un análisis de varianzas (ANAVA) y se compararon las medias aplicando el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el ensayo de producción de biofilm la variable crecimiento se analizó utilizando (Box-Plot) para eliminar valores fuera de rango y la relación crecimiento / biofilm por no cumplir con el supuesto de normalidad se transformó utilizando la función logaritmo.

Las variables halo de degradación de pectina, halo de movilidad, crecimiento, crecimiento/biofilm, AIA/ crecimiento, largo de raíz, peso seco de parte aérea y de la raíz (ensayo en invernáculo) se analizaron mediante prueba de varianzas (ANAVA) y se compararon las medias aplicando el test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

La variable índice de eficiencia de solubilización se analizó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis por pares a un nivel de significancia del $p < 0,05$. El porcentaje de germinación se analizó utilizando el modelo lineal generalizado mixto (MLGM).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

4.1.1. Eficiencia simbiótica

Los resultados de la eficiencia simbiótica de las cepas, determinados a partir de la biomasa de la planta entera expresada como peso seco y a través de la presencia de nódulos en el sistema radicular de las plantas inoculadas mostraron diferencias entre las cepas. De las 16 cepas en estudio que originalmente nodularon *L. corniculatus*, se observó que LRT4 y LRT 70 no fueron capaces de generar nódulos en las plantas por lo que se descartaron y no se incluyeron en los siguientes ensayos, debido a que no se pudo demostrar que se logró establecer eficientemente la simbiosis rizobio- leguminosa.

Las restantes 14 cepas formaron nódulos en las raíces de las plantas de *L. corniculatus* pudiéndose determinar diferencias significativas en la eficiencia (Figura 8). Las cepas LRT 14, LRT 47, LRT 56, LRT 64, LRT 65, y LRT 72 dejaron en evidencia que no todas las interacciones son benéficas o positivas ya que mostraron ser muy poco eficientes puesto que la biomasa producida por las plantas inoculadas no presentó diferencias significativas con el control sin inocular (Figura 8). Frente a la presencia de poblaciones de rizobios nativos existe la posibilidad de que estas sean abundantes y competitivas, pero no siempre presenten una elevada fijación de nitrógeno, motivo por el que en algunas ocasiones se observa un descenso en el rendimiento de un cultivo. Esta situación es coincidente con los resultados obtenidos por Baraibar et al. (1999) en el que se analizó una población de rizobios nativos y su eficiencia en el establecimiento de la simbiosis en *Lotus*, donde se observaron situaciones en las que no lograron formar nódulos viables, por lo que presentaron una asociación simbiótica ineficiente. Según Denton, citado por Batista et al. (2015), estas poblaciones de rizobios nativos generan consecuencias negativas en primer lugar porque no son eficientes en la fijación de nitrógeno además de que se pueden establecer relaciones de tipo parasitarias.

A diferencia de lo mencionado anteriormente las plantas inoculadas con las cepas LRT 13, LRT 30, LRT 36, LRT 35, U510 y U531, no presentaron diferencias significativas respecto al control nitrogenado, que obtuvo el mayor valor en peso seco de planta entera, por lo que estos aislamientos se catalogaron como los más eficientes (Figura 8). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Monza et al. (1992) quienes caracterizan una población de rizobios nativos que nodulan *L. corniculatus* logrando establecer nodulaciones efectivas y

donde la eficiencia simbiótica fue similar o superior a la cepa del inoculante comercial.

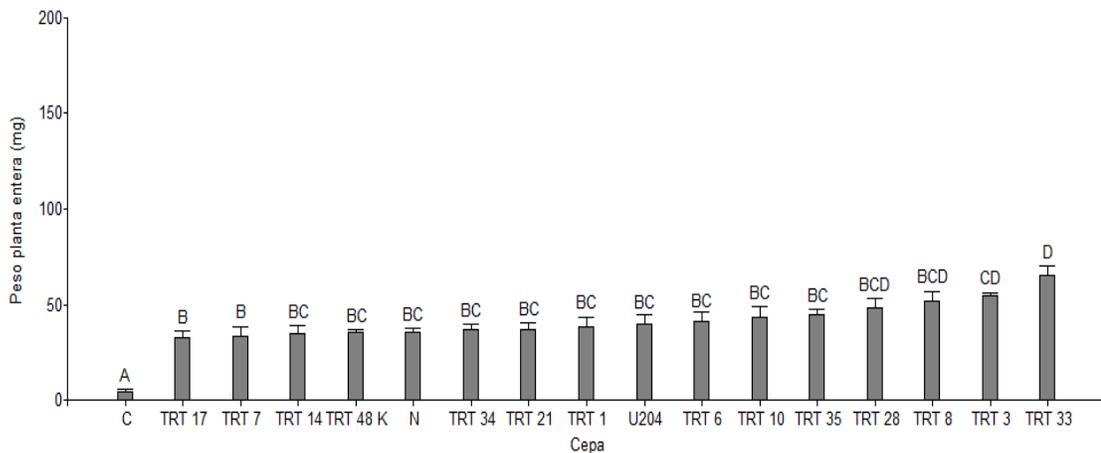
Figura 8. Biomasa generada por plantas de *L. corniculatus* (LRT) inoculadas con cepas de rizobios aisladas de *O. sativa*. Se incluyeron cepas de rizobios de los inoculantes comerciales U510 y U531, control nitrogenado (N) y control sin inocular (C).



Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$). $n = 4$.

Por otra parte, todas las cepas de rizobios aisladas de arroz que originalmente nodularon *T. repens* volvieron a generar nodulación en las raíces, por lo que no se descartaron aislamientos para los próximos ensayos. La biomasa producida en las plantas inoculadas con estos aislamientos fue en todos los casos mayor que la del control sin inocular y no se diferenció del tratamiento inoculado con la cepa del inoculante comercial U204 ni del control con aplicación nitrogenada (Figura 9); a excepción de la cepa TRT 33 que se destacó por su eficiencia ya que la biomasa superó a la cepa comercial U204 y al control nitrogenado (Figura 9). Este resultado concuerda con investigaciones realizadas en el país donde se reportan poblaciones de rizobios nativos que nodulan *T. repens* con presencia de cepas eficientes (Rodríguez-Blanco et al., 2010, Batista et al., 2015). Se ha comprobado que las plantas inoculadas con algunas de estas cepas nativas en comparación con la cepa U204 logran valores similares o mayores en producción de forraje entre otros parámetros de interés demostrando su adaptación y eficiencia para fijar nitrógeno (Irisarri et al., 2019).

Figura 9. Biomasa generada por plantas de *T. repens* (TRT) inoculadas con cepas de rizobios aisladas de *O. sativa*. Se incluyeron la cepa de rizobios del inoculante comercial U204, control nitrogenado (N) y un control sin inocular (C).



Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0,05$) $n= 4$

4.1.2 Características relacionadas a la colonización

4.1.2.1. Degradación de pectina

La degradación de pectina cítrica se estimó a partir del diámetro del halo formado por cada colonia en cada punto de inoculación (Figura 10), se utilizó este valor como indicador de la capacidad de los aislamientos en degradar pared celular y su importancia radica en que la actividad pectinolítica podría estar relacionada con la capacidad de interactuar con la planta huésped y establecerse como endófitos de raíz.

Los resultados indicaron que 9 de las 16 cepas que nodulan *L. corniculatus* presentaron halos de degradación (Cuadro 6). Datos similares fueron obtenidos por Pariona–Llanos et al. (2010), que obtuvieron un porcentaje considerable de cepas (66%) aisladas de caña de azúcar con capacidad de degradar pectina.

Por otro lado, los aislamientos que nodulan *T. repens* presentaron una baja actividad ya que no formaron halos de degradación de pectina, estos resultados concuerdan con Castanheira et al. (2014) donde si bien se encontró habilidad de degradar pectina por parte de distintos géneros bacterianos, para el caso de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* se reportó escasa capacidad. Si se tiene en cuenta otros componentes de la pared celular, Mareque et al. (2015) determinó la actividad hidrolítica de celulosa y hemicelulosa de

endófitos de sorgo dulce en Uruguay, concluyendo que del total de aislamientos en estudio solo un porcentaje menor logró evidenciar capacidad de degradación de paredes celulares, pero de todos modos se establecieron como endófitos. Es interesante tener en cuenta este enfoque porque determina que a pesar de que los aislamientos presenten escasa actividad en degradar pared celular esta no es la única característica que puede influir en la colonización por lo que no es determinante en el establecimiento como endófitos.

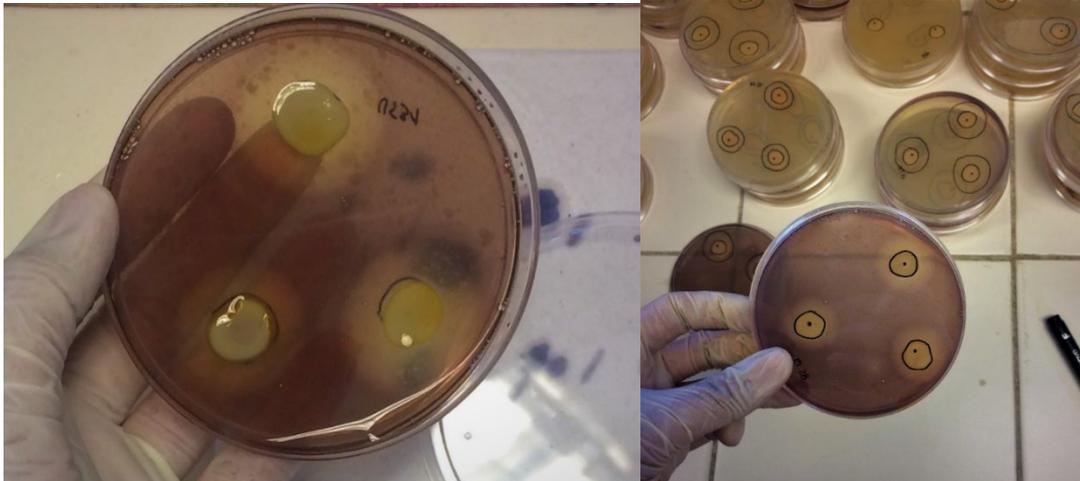
La actividad pectinasa varió entre los aislamientos que nodulan *L. corniculatus*, registrando halos que varían entre 0,6 y 1,6 cm. Las cepas que se destacaron fueron LRT 13, LRT 14 y el inoculante comercial U531 (Figura 10 y Cuadro 6). Esta variación en la actividad pectinasa dentro del género *Rhizobium* fue reportada por Castanheira et al. (2014) en un estudio en el que se evaluó el comportamiento de cepas bacterianas aisladas de rizósfera y raíz de raigrás anual donde se constató la formación de halos de degradación para algunos aislamientos del género *Rhizobium* mientras que otros aislamientos del mismo género presentaron nula actividad pectinasa.

Cuadro 6. Diámetro de los halos de degradación de pectina formados por aislamientos de rizobios que nodulan *L. corniculatus*.

Cepa	Halo (cm)
LRT 64	0,60 ^A
LRT 47	0,78 ^B
LRT 11	0,78 ^B
LRT 28	1,13 ^C
LRT 35	1,16 ^C
LRT 72	1,20 ^C
LRT 13	1,52 ^D
LRT 14	1,52 ^D
U531	1,60 ^D
U510	--
LRT 65	--
LRT 56	--
LRT 60	--
LRT 74	--
LRT 36	--
LRT 30	--

Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher $p \leq 0,05$). n= 3. (--) No forma halo de degradación de pectina.

Figura 10. Halos formados por rizobios que nodulan *L. corniculatus* en medio TY con agregado de pectina cítrica al 0,5 %. Izquierda: aislamiento que logró el mayor halo de degradación (U531). Derecha: Aislamiento que formó halo con diámetros intermedios (TRT28).



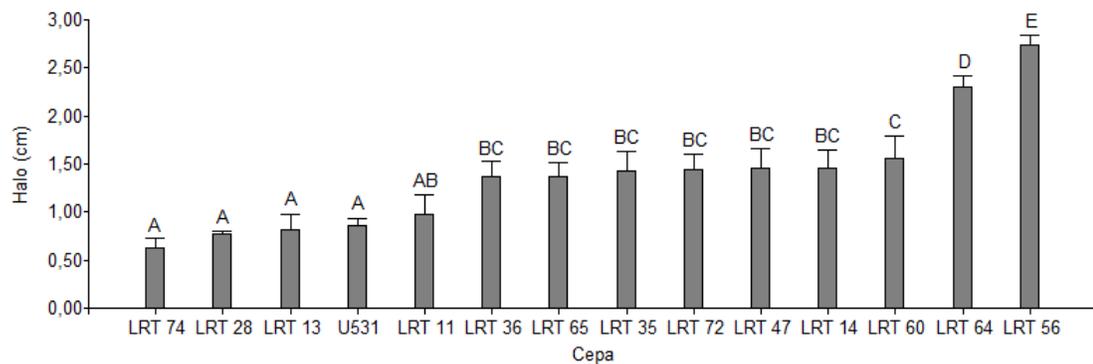
4.1.2.2. Movilidad – *swimming*

Durante el proceso de colonización bacteriana los microorganismos pueden emplear distintos mecanismos de movilidad; el *swimming* es un movimiento dependiente de flagelos que ocurre en medios acuosos y a diferencia de otros mecanismos de movilidad se caracteriza por tener un patrón de movimiento desorganizado (Kearns, 2010). Esta característica es considerada como una propiedad que determina que las bacterias tengan la posibilidad de colonizar y alcanzar nuevos ambientes, como también acceder a nutrientes entre otros beneficios, por lo que podría relacionarse con su competitividad y se considera una característica esencial (Vicario, 2015).

Se evaluó la movilidad, teniendo en cuenta los halos que formaron las colonias desarrolladas en cada punto de inoculación y los resultados obtenidos demostraron que los aislamientos que nodulan *L. corniculatus*, se agruparon en tres categorías de acuerdo al diámetro del halo de movilidad en el medio agar-aga 0,3%. Las cepas con menor halo de movilidad fueron LRT74, LRT28, LRT13 y U531 presentando halos en torno a 1 cm, mientras que los aislamientos LRT56 y LRT64 presentaron los mayores halos de movilidad entre 3 y 2,5 cm respectivamente (Figura 11). Se presentó un grupo con resultados intermedios

donde se ubicaron las restantes 8 cepas. Las cepas menos móviles fueron U510 y LRT 30 que no fueron capaces de generar halos de movilidad en estas condiciones.

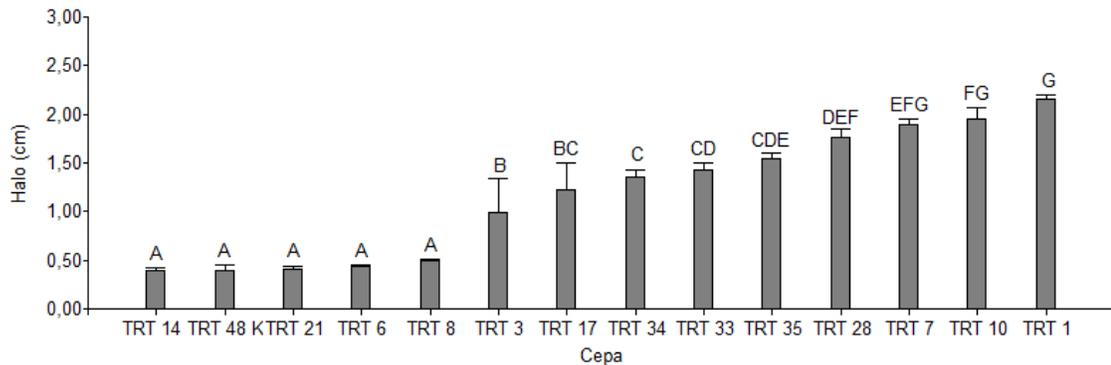
Figura 11. Diámetros de movilidad de aislamientos que nodulan *L. corniculatus* crecidas en agar - agua 0,3 %.



Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). $n=3$.

Los aislamientos que nodulan *T. repens* presentaron en general menor movilidad logrando halos entre 0,5 y 2 cm. También se agruparon en 3 categorías según la movilidad: un grupo con menores halos formado por TRT 14, TRT 48K, TRT 21, TRT 6 y TRT 8, mientras que TRT7, TRT10 y TRT1 lograron los mayores valores en diámetro del halo y las restantes 6 cepas presentaron valores intermedios (Figura 12). En este ensayo no se incluyó la cepa del inoculante comercial U204.

Figura 12. Diámetros de movilidad en cepas de *T. repens* crecidas en agar - agua 0,3 %.



Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). $n=3$.

En general se pudo constatar que todas las cepas de rizobios lograron trasladarse en el medio, aunque existió variabilidad en su desempeño; según Vicario et al. (2015) esta variación en los resultados podría estar atribuida a factores genéticos. Los valores logrados de diámetro de halo son concordantes con los resultados obtenidos por Vicario et al. (2015) en un estudio en el que evaluando la movilidad en medio agar- agua 0,3% de cinco cepas de rizobios (tres recomendadas para la elaboración de inoculantes comerciales y dos nativas) pertenecientes al género *Bradyrhizobium* sp. que nodulan maní, se observaron halos de entre 0,5 y 4 cm. Otros estudios han destacado situaciones similares, como expresa Albareda et al. (2006) que estudiando algunos rasgos bacterianos encontró movilidad en medio agar 0,3% en todas las cepas de rizobios noduladores de soja analizadas.

4.1.2.3. Formación de biofilm

Los biofilms son comunidades bacterianas rodeadas por una matriz polimérica producida por las propias bacterias que les permite adherirse a determinadas superficies, esta particularidad permite que puedan sobrevivir en condiciones ambientales adversas. En el caso de los rizobios la formación de biofilms es una característica que puede permitirles colonizar ciertas superficies como por ejemplo la superficie del sistema radicular de las plantas y permanecer en ambientes favorables como la rizósfera donde existen disponibilidad de humedad, nutrientes y exudados vegetales (Rinaudi y Giordano, 2010, Sorroche et al., 2012).

Para evaluar el desempeño de los rizobios en este sentido se determinó en primer lugar el crecimiento de las cepas luego de 48 horas de incubación en microplacas. LRT 28, LRT 36, LRT 11, LRT 13, LRT 35 y U531 no presentaron crecimiento apreciable en estas condiciones por lo que no pudieron ser incluidas en el análisis de datos. Como se puede observar en el cuadro 7, las cepas presentaron diferencias estadísticas en el crecimiento, por ese motivo la formación de biofilm se expresó en relación al crecimiento obtenido a las 48 horas (biofilm/crecimiento). Las cepas LRT 74, LRT 14 y LRT 72 se destacaron por mayor formación de biofilm (LRT 74 = LRT 14 > LRT 72) con diferencias significativas entre las cepas LRT 74 y LRT 72. Cabe destacar que LRT 74 presentó un registro con un valor elevado con muy buena formación de biofilm en torno a 10. Por otro lado, LRT 47 fue el aislamiento que presentó menor valor de biofilm/crecimiento. Las cepas restantes presentaron valores intermedios (Cuadro 7). Esta variación en los resultados concuerda con Sorroche et al. (2012) que encontraron resultados heterogéneos entre cepas nativas y de referencia de *Sinorhizobium meliloti*, bacteria fijadora de nitrógeno en plantas de alfalfa.

En el caso de las cepas de rizobios que nodulan en *T. repens*, TRT 35 y TRT 21 no crecieron luego de 24 horas por lo que no fueron evaluadas; el inoculante comercial U204 no fue incluido en esta prueba. Las cepas TRT 33 y TRT 3 alcanzaron mayor crecimiento diferenciándose significativamente en comparación con las demás en evaluación, por el contrario, TRT 34 presentó el valor más bajo en crecimiento (Cuadro 8). Se observó que estos aislamientos en general fueron menos formadores de biofilm si se compara con los aislamientos que nodulan *L. corniculatus*. Según la relación biofilm/ crecimiento, TRT 34 y TRT 14 fueron las cepas que presentaron mayor formación de biofilm sin diferenciarse estadísticamente entre ellas; se observó un grupo formado por 5 cepas que presentaron valores bajos en la formación de biofilm (Cuadro 8). La mayoría de los registros de estas cepas en promedio son similares a lo expresado por Paulucci et al. (2015) en un estudio en el que se determinaron características de una cepa bacteriana (L115) aislada de la rizósfera de maní y se concluyó que mostró capacidad para producir biofilm (registrándose valores en torno a 0,25 absorbancia de 590 nm) incluso superando al control utilizado en ese caso una cepa perteneciente al género *Bradyrhizobium* sp.

Cuadro 7. Crecimiento y relación biofilm / crecimiento para las cepas que nodulan *L. corniculatus* (LRT).

Cepa	Crecimiento (*) (DO a 600 nm)	Biofilm (DO a 570 nm) / crecimiento)
LRT 47	0,34 ^E	0,11 ^A
LRT 65	0,15 ^A	0,77 ^B
LRT 56	0,24 ^{CD}	0,87 ^{BC}
LRT 64	0,17 ^{AB}	0,99 ^{BC}
U510	0,28 ^{DE}	1,23 ^{BC}
LRT 60	0,23 ^{BCD}	1,55 ^C
LRT 72	0,26 ^{CD}	3,73 ^D
LRT 14	0,14 ^A	5,78 ^E
LRT 74	0,20 ^{ABC}	10,2 ^E

(*) Crecimiento = 48 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 5.

Cuadro 8. Crecimiento y relación biofilm / crecimiento para las cepas que nodulan *T. repens* (TRT).

Cepa	Crecimiento (*) (DO a 600 nm)	Biofilm (DO a 570 nm/ crecimiento)
TRT 28	0,23 ^{ABC}	0,03 ^A
TRT 1	0,24 ^{ABC}	0,06 ^{AB}
TRT 8	0,25 ^{BC}	0,07 ^{AB}
TRT 3	0,34 ^D	0,09 ^{ABC}
TRT 10	0,19 ^{AB}	0,14 ^{ABCD}
TRT 6	0,22 ^{ABC}	0,12 ^{BCD}
TRT 33	0,34 ^D	0,13 ^{BCD}
TRT 48K	0,26 ^{BC}	0,24 ^{CD}
TRT 17	0,23 ^{ABC}	0,29 ^{CD}
TRT 7	0,21 ^{ABC}	0,41 ^{CD}
TRT 14	0,28 ^{CD}	0,57 ^D
TRT 34	0,15 ^A	0,71 ^D

(*) Crecimiento = 24 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 5.

4.1.3. Características promotoras del crecimiento vegetal

4.1.3.1. Solubilización de fosfatos

De las 15 cepas que nodulan *L. corniculatus*, 8 presentaron capacidad solubilizadora de fosfatos determinada a través de la formación de zonas traslúcidas (halos de solubilización). Los halos presentaron diámetros ubicados en un rango entre 0.7 y 1.5 cm, con un promedio de 1 cm. El índice de eficiencia de solubilización se situó en un rango entre 1.4 y 2.7 con un promedio general de 1.9 cm (Cuadro 9). Las cepas que mostraron mayor capacidad de solubilizar P en estas condiciones fueron LRT47, LRT14, LRT35 y LRT11.

De las 15 cepas que nodulan *T. repens*, 12 formaron halos con diámetros que se ubicaron en un rango entre 0.6 y 1.4 cm, con un promedio de 0.9 cm (Cuadro 10). El índice de eficiencia de solubilización presentó menores valores que para las cepas que nodulan *L. corniculatus* (entre 1.1 y 1.3 cm con un promedio general de 1.2 cm). En esta prueba no se incluyó la cepa U204.

La capacidad de solubilizar P está ampliamente distribuida entre las bacterias. Varios trabajos lo demuestran en distintos géneros como señala Beltrán-Pineda (2014b) comprobó capacidad de solubilización en aislamientos bacterianos provenientes de cultivos de arroz. También esta característica se atribuye a los rizobios, como describe Fernández et al. (2005) en un estudio donde se encontró actividad solubilizadora en cepas de *Bradyrhizobium* sp aislados de suelos sojeros. De modo análogo Vargas et al. (2009) reporta en un trabajo en el que se analizó el comportamiento de *Rhizobium leguminosarum trifolii* en la promoción del crecimiento vegetal, que la capacidad de solubilizar fosfatos fue la característica más habitual.

Cuadro 9. Halos de solubilización y eficiencia de solubilización de fósforo (ES) en cepas de rizobios que nodulan *L. corniculatus* (LRT).

Cepa	Diámetro halo (colonia + halo) (cm)	Diámetro colonia (cm)	ES
LRT60	0,7	0,5	1,4 ^A
LRT36	0,8	0,5	1,6 ^{AB}
LRT28	0,8	0,5	1,6 ^{ABC}
LRT64	0,8	0,5	1,6 ^{ABC}
LRT47	1,2	0,5	2,5 ^{BCD}
LRT14	1	0,6	1,7 ^{CD}
LRT35	1	0,5	2,0 ^D
LRT11	1,5	0,6	2,7 ^D

*ES = eficiencia de solubilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas que nodulan *L. corniculatus* (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 3.

Cuadro 10. Halos de solubilización y eficiencia de solubilización de fósforo (ES) en cepas de rizobios que nodulan *T. repens* (TRT).

Cepa	Diámetro halo (colonia + halo) (cm)	Diámetro colonia (cm)	ES
TRT14	1,4	1,3	1,1 ^A
TRT21	1	0,9	1,1 ^{AB}
TRT8	1	0,9	1,1 ^{AB}
TRT28	1	0,9	1,1 ^{ABC}
TRT35	1	0,9	1,1 ^{ABC}
TRT10	1	0,9	1,1 ^{ABC}
TRT1	0,9	0,8	1,1 ^{BCD}
TRT6	0,9	0,8	1,1 ^{BCD}
TRT17	0,7	0,6	1,2 ^{CD}
TRT3	0,6	0,5	1,2 ^{DE}
TRT7	1,1	0,9	1,2 ^{DE}
TRT34	1	0,8	1,3 ^E

*ES = eficiencia de solubilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas que nodulan *T. repens* (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 3.

4.1.3.2. Producción de ácido indol acético (AIA)

Se observó producción de AIA por parte de todos los aislamientos que nodulan *T. repens* diferenciándose estadísticamente entre ellos. En el cuadro 11 se presentan los valores que variaron entre 23 y 132 ($\mu\text{g} / \text{ml}$). Algunas cepas (TRT 28, TRT 3, TRT 48 K) presentaron elevada producción de AIA (mayor a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Teniendo en cuenta a Khalid et al. (2004) se puede decir que todos los aislamientos se destacaron ya que este autor clasifica a las bacterias rizosféricas en tres grupos según la síntesis de auxinas; en bajas productoras de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, medianas productoras de 11 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y altas productoras de 21 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AIA.

Las auxinas intervienen en el proceso de crecimiento vegetal estimulando la división y elongación celular. Por su parte el AIA como precursor de estas fitohormonas ha sido reconocido por su capacidad de intervenir en la morfología de las raíces aumentando tamaño, peso, ramificaciones, así como también el área de superficie radicular que mantiene contacto con el suelo lo que puede ser determinante de una arquitectura de raíces más extensa en plantas no leguminosas. Diversos autores destacan que más del 80% de las bacterias del suelo son capaces de sintetizar auxinas (Vargas et al., 2017). En un trabajo Etesami (2015) se propuso detectar endófitos y bacterias de la rizósfera aisladas de plantas en rotación con *O. sativa* concluyó que 7 de cada 10 aislamientos analizados se comportaron como promotores del crecimiento y colonizadores potencialmente buenos, las plantas inoculadas con aislamientos productores de AIA produjeron más biomasa de brotes (tallo más hojas) y longitud de raíz que las plantas de control inoculadas con cepas no productoras de AIA.

Cuadro 11. Síntesis de ácido indol acético por aislamientos que nodulan *T. repens* (TRT).

Cepa	AIA (µg /ml) (*)
TRT 10	23,65 ^A
TRT 14	35,53 ^A
TRT 21	42,93 ^A
TRT 17	46,09 ^{AB}
TRT 1	46,17 ^{AB}
TRT 8	70,09 ^{BC}
TRT 7	79,24 ^{CD}
TRT 33	87,37 ^{CD}
TRT 6	90,19 ^{CD}
TRT 34	97,42 ^{DE}
TRT 35	99,72 ^{DE}
TRT 28	116,20 ^{EF}
TRT 3	127,29 ^F
TRT 48 K	132,55 ^F

(*) Valores normalizados por DO a 600nm. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 2.

4.2. CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO INICIAL DE *O. sativa* CON CEPAS SELECCIONADAS

4.2.1. Capacidad de promover la germinación

La capacidad de las cepas de promover la germinación y la elongación de la raíz de *O. sativa* se evaluó a través de germinadores (Figura 13).

Figura 13. Disposición de semillas de *O. sativa* sobre papel tela para evaluación de germinación y cuantificación del largo de raíz.



Entre las cepas que nodulan *L. corniculatus* se destaca que las semillas inoculadas con la cepa LRT 64 obtuvieron el máximo porcentaje de germinación, que superó los valores de los tratamientos inoculados con las cepas U510 y U531 utilizadas en los inoculantes comerciales y al control sin inocular (Cuadro 12). La inoculación con las cepas LRT 72, y LRT 56 también promovió la germinación de las semillas presentando un porcentaje entorno al 50% que superó al control sin inocular. El resto de los tratamientos, incluyendo los inoculados con las comerciales U510 y U531, presentaron valores de germinación sin diferencias significativas con el control sin inocular. El largo de la raíz se ubicó en un rango entre 2.8 - 4,5 cm, presentando un promedio de 3,5 cm. Se obtuvo un mayor largo de raíz cuando se inoculó con las cepas LRT 65, LRT 13, LRT 64, o U531, sus

raíces midieron en promedio más de 4 cm y superaron estadísticamente a 8 de las cepas, aunque no al control sin inocular ni al inoculante comercial (Cuadro 12).

Cuadro 12. Germinación y largo de raíz en semillas de *O. sativa* inoculadas con cepas que nodulan *L. corniculatus* (LRT).

Cepa	% Germinación	Largo de raíz (cm)
LRT 36	33 ^{DE}	2,8 ^A
LRT 47	33 ^{DE}	2,8 ^A
LRT 14	44 ^{BCDE}	2,9 ^A
LRT 28	47 ^{BCDE}	2,9 ^A
LRT 11	64 ^{BCDE}	2,9 ^A
LRT 72	53 ^{AB}	3,0 ^A
LRT 74	49 ^{ABCD}	3,0 ^A
LRT 56	53 ^{AB}	3,1 ^A
LRT 35	31 ^E	3,3 ^{AB}
U 510	33 ^{DE}	3,5 ^{AB}
LRT 60	47 ^{BCDE}	3,9 ^{AB}
Control	36 ^{CDE}	4,1 ^{AB}
LRT 65	51 ^{ABC}	4,2 ^B
LRT 13	40 ^{BCDE}	4,4 ^B
U531	42 ^{BCDE}	4,4 ^B
LRT 64	64 ^A	4,5 ^B

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). n= 3.

Las semillas inoculadas con cepas que nodulan *T. repens* presentaron en general un porcentaje de germinación mayor al observado con las cepas que nodulan *L. corniculatus*, aunque entre ellas y el control sin inocular no se diferenciaron estadísticamente (Cuadro 13). El largo de raíz se situó en un rango entre 2,0 - 4,5 cm, estos valores alcanzaron un promedio de 3 cm. Los tratamientos inoculados con las cepas TRT 10, TRT 14, TRT 21 y TRT 33 obtuvieron los mayores valores de longitud de raíz, las dos últimas superando los 4 cm, pero sin presentar diferencias estadísticas con el control. TRT 33 y TRT 21 no se diferenciaron de TRT 10, TRT 14 pero si obtuvieron diferencias estadísticas con las demás cepas en evaluación (Cuadro 13). Se observó que 8 tratamientos presentaron valores de largo de raíz significativamente menores que el control sin inocular por lo que estas 8 cepas inhibieron el crecimiento inicial de la raíz.

Cuadro 13. Germinación y largo de raíz en semillas de *O. sativa* inoculadas con cepas que nodulan *T. repens* (TRT).

Cepa	% Germinación	Largo de raíz (cm)
TRT 35	51 ^A	2,0 ^A
TRT 34	49 ^A	2,0 ^A
TRT 7	47 ^A	2,5 ^{AB}
TRT 3	42 ^A	2,5 ^{AB}
TRT 28	56 ^A	2,7 ^{ABC}
TRT 8	56 ^A	2,8 ^{ABC}
U 204	51 ^A	2,9 ^{ABCD}
TRT 17	63 ^A	2,8 ^{ABCD}
TRT 1	49 ^A	2,9 ^{ABCDE}
TRT6	53 ^A	3,0 ^{BCDE}
TRT 48K	40 ^A	3,1 ^{BCDE}
TRT 10	40 ^A	3,6 ^{CDEF}
TRT 14	53 ^A	3,8 ^{DEF}
Control	56 ^A	3,8 ^{EF}
TRT 21	58 ^A	4,2 ^F
TRT 33	64 ^A	4,5 ^F

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0,05$). $n = 3$.

En base a distintos autores citados anteriormente se podría esperar en este ensayo que la variable largo de raíz sea un indicador de que los aislamientos que sintetizan AIA en mayor proporción logren un efecto positivo en el desarrollo y morfología radicular que evidencie una respuesta fisiológica a la presencia de AIA. Sin embargo, algunos autores citados por Vargas et al. (2017) han reportado que, si bien esta hormona tiene un efecto positivo aun en concentraciones muy bajas, también tiene un efecto adverso o sin respuesta en la planta cuando existe una sobreproducción de AIA. En este sentido, Schlindwein et al. (2008) analizando cepas de *R. trifolii* encontró una relación inversa entre concentración de AIA y capacidad de germinación. Para evitar este efecto se podría realizar la inoculación de semillas con un medio de cultivo distinto al TY que no presente triptófano y así lograr que contenga menores cantidades de AIA producido por las cepas para mitigar este efecto inhibitorio.

A continuación, en los cuadros 14 y 15 se presenta un resumen del desempeño de los aislamientos en los distintos ensayos. Estos resultados fueron utilizados para realizar la selección de cepas evaluadas en el ensayo final. En los cuadros se presentan sombreados en gris las cepas que fueron seleccionadas para el ensayo de invernáculo.

Entre las cepas aisladas de arroz que nodulan *L. corniculatus* se seleccionaron: la cepa LRT 13 que provocó uno de los mayores valores en el largo de raíz y degradación de pectina, la cepa LRT 35 por su elevada eficiencia simbiótica y LRT 64 por promover la germinación de las semillas (Cuadro 14). Entre los aislamientos que nodulan *T. repens* se seleccionaron: la cepa TRT 10 que expuso uno de los mejores registros en movilidad en medio agar-agua, la cepa TRT 21 por lograr uno de los mayores porcentajes de germinación y largo de raíz, y por último TRT 33 se incorporó a los ensayos por presentar una importante eficiencia simbiótica y germinación. (Cuadro 15).

Cuadro 14. Resumen de la caracterización de las cepas aisladas de arroz que nodulan *L. corniculatus*.

Cepa	Perfil BOX PCR	Eficiencia Simbiótica			Colonización		Promoción crecimiento	Promoción germinación	
		Nod ^a	Peso seco ^b	Pectina ^c	Movilidad ^d	Biofilm ^e	Solub.P ^f	% Germ. ^g	Largo raíz ^h
LRT 4	I	-							
LRT 11	II	+	++	+	+	-	++	+++	+
LRT 13	III	+	++	+++	+	-	-	+	++
LRT 14	V	+	+	+++	++	+++	+	++	+
LRT 28	III	+	++	++	+	-	+	++	+
LRT 30	-	+	++	-	-				
LRT 35	IV	+	+++	++	++	-	+	+	+
LRT 36	-	+	++	-	+	-	+	+	+
LRT 47	VI	+	+	+	++	+	++	+	+
LRT 56	-	+	+	-	+++	+	-	+++	+
LRT 60	VII	+	++	-	+++	++	+	++	++
LRT 64	VIII	+	+	+	+++	+	+	+++	++
LRT 65	V	+	+	-	++	+	-	+++	++
LRT 70	-	-							
LRT 72	III	+	+	++	++	+++	-	+++	+
LRT 74	V	+	++	-	+	>	-	++	+
U510	-	+	+++	-	-	++	-	+	++
U531	-	+	+++	+++	+	-	-	++	++

(a) Nod = Nodulación: (+) presenta nodulación (-) no presenta nodulación. Perfil BOX-PCR: (nd) no determinado, no se cuenta con datos. (b) Peso seco de planta entera (mg): (+) 50 – 60, (++) 60 – 80, (+++) > 80. (c) Pectina (cm): (+) 0,60 – 0,80, (++) 1,0 – 1,20, (+++) 1,50 – 1,60, (-) aislamientos que no presentaron halos. (d) Movilidad (cm): (+) 0,6 – 1, (++) 1,0 – 1,5, (+++) 1,5 – 2,5. (e) Biofilm (biofilm/ crecimiento): (+) 0,1 – 1,0, (++) 1,0 – 2,0, (+++) 3,0 – 6,0, (>) 10 (-) No crecieron en placa. (f) Solubilización de fosfatos (cm): (+) 1,0 – 2,0, (++) 2,5 – 2,7, (-) No forma halo. (g) Germinación (%): (+) 30 – 40, (++) 40 – 50, (+++) 50 – 64. (h) Largo de raíz (cm): (+) 2,8 – 3,5, (++) 3,5 – 4,5.

Cuadro 15. Resumen de la caracterización de las cepas aisladas de arroz que nodulan *T. repens*.

Cepa	Perfil BOX-PCR	Eficiencia Simbiótica		Colonización			Promoción crecimiento		Promoción germinación	
		Nod ^a	Peso seco ^b	Pectina ^c	Mov. ^d	Biofilm ^e	Solub. P ^f	AIA ^g	% Germ. ^h	Largo raíz ⁱ
TRT 1	III	+	+	-	+++	+	+	+	+	+
TRT 3	II	+	++	-	+	+	++	>	+	+
TRT 6	-	+	++	-	+	++	+	++	++	+
TRT 7	I	+	+	-	+++	+++	++	++	+	+
TRT 8	III	+	++	-	+	+	+	+	++	+
TRT 10	I	+	++	-	+++	++	+	+	+	++
TRT 14	III	+	+	-	+	+++	+	+	++	++
TRT 17	III	+	+	-	++	++	++	+	+++	+
TRT 21	V	+	+	-	+	-	+	+	++	++
TRT 28	III	+	++	-	+++	+	+	>	++	+
TRT 33	III	+	+++	-	++	++	-	++	+++	++
TRT 34	III	+	+	-	++	+++	++	++	+	+
TRT 35	III	+	++	-	++	-	+	++	++	+
TRT 48K	X	+	+	-	+	++	-	>	+	++
U 204	-	+	++	-	x	x	x	x	++	+

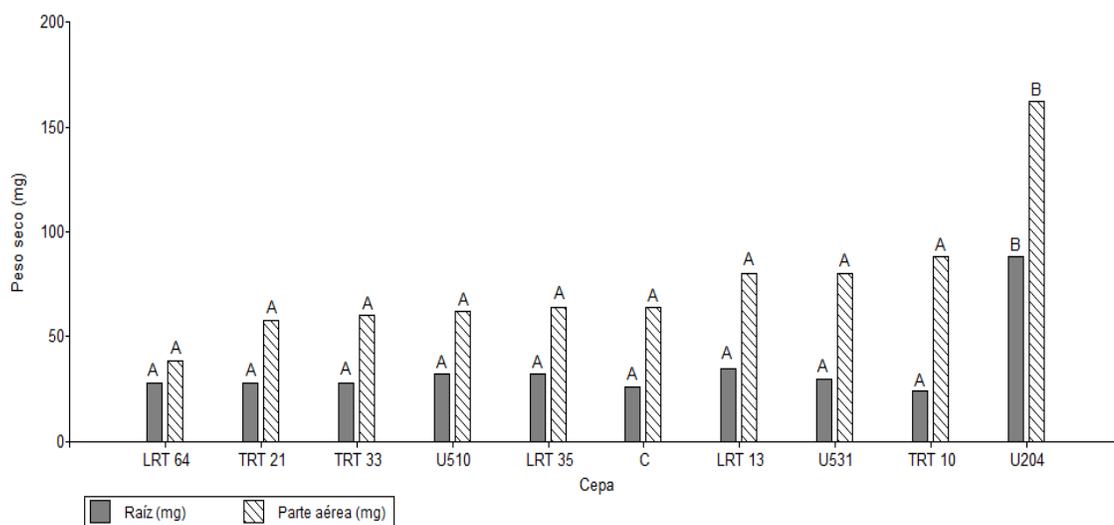
(a) Nod = Nodulación: (+) presenta nodulación (-) no presenta nodulación. Perfil BOX-PCR: (nd) no determinado, no se cuenta con datos. (b) Peso seco de planta entera (mg): (+) 30 – 40, (++) 40 – 55, (+++) > 60. (c) Pectina (cm): (-) aislamientos que no presentaron halos. (d) Movilidad (cm): (+) 0,4 – 1,0, (++) 1,0 – 1,5, (+++) 1,5 – 2,0 (-) No presentaron halo (x) No se incluyó en el ensayo. (e) Biofilm (biofilm/ crecimiento): (+) 0,03 – 0,1, (++) 0,1 – 0,3, (+++) 0,4 – 0,7 (-) No crecieron en placa (x) No se incluyó en el ensayo. (f) Solubilización de fosfatos (cm): (+) 1,1, (++) 1,2 – 1,3, (-) No forma halo (x) No se incluyó en el ensayo. (g) AIA (µg /ml): (+) 20 – 70, (++) 70 – 100, (+++) 100 – 133 (x) No se incluyó en el ensayo. (h) Germinación (%): (+) 40 – 50, (++) 50 – 60, (+++) 60 - 64. (i) Largo de raíz (cm): (+) 2 -3,0, (++) 3,0 – 4,5.

4.2.2 Ensayo en invernáculo

Este ensayo final se realizó en condiciones semicontroladas sin aumentar la complejidad del sistema utilizando en lugar de suelo, una mezcla de arena: vermiculita estéril como sustrato. La finalidad del ensayo fue evaluar el efecto de la inoculación con las cepas seleccionadas en etapas iniciales del desarrollo de las plantas de *O. sativa*, por ese motivo las plantas se mantuvieron 30 días en invernáculo.

La Figura 14 muestra la biomasa producida (parte aérea y raíz) de las plantas de *O. sativa* cultivar INIA Olimar inoculadas con las 9 cepas seleccionadas: 3 cepas que nodulan *L. corniculatus* (LRT), 3 cepas que nodulan *T. repens* (TRT) y las cepas comerciales U510, U531 y U204. El peso de raíz estuvo entre 10 y 130 mg con una media de 35 mg. La parte aérea alcanzó un peso seco entre 10 y 210 mg, el promedio de los datos se situó en 76 mg. La inoculación con la cepa U204 recomendada para la inoculación de *T. repens* y *T. pratense* promovió el desarrollo vegetal en etapas tempranas; las plantas presentaron mayor peso de raíz, y parte aérea, con diferencias significativas respecto de las demás cepas y del control sin inoculación. La biomasa producida tanto en raíz como en parte aérea duplicó la media obtenida para los registros de todas las cepas y el control. La inoculación con la cepa U204 fue el único tratamiento que presentó diferencias significativas con el control y con las demás cepas en estudio (Figura 15).

Figura 14. Biomasa (peso seco) generada por raíz y parte aérea de las plantas de *O. sativa* cultivar INIA Olimar crecidas en invernáculo en macetas con arena:vermiculita. Los tratamientos incluyeron 9 cepas de rizobios: 3 cepas que nodulan *L. corniculatus* (LRT), 3 cepas que nodulan *T. repens* (TRT) y las cepas comerciales U510, U531 y U204, además de un control sin inocular (C).



Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD Fisher $p \leq 0,05$). $n = 5$.

Figura 15. Planta de *O. sativa* cultivar INIA Olimar inoculada con la cepa U204 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.



La inoculación de las semillas con el procedimiento utilizado mostró ser un método que permite obtener número elevados de rizobios sobre las semillas ya que los recuentos realizados sobre las semillas de *O. sativa* inoculadas al momento de la siembra demostraron un número de rizobios entre 1.5 y 5.7×10^6 ufc/semilla (Cuadro 16). Por otro lado, el recuento realizado en la raíz luego de 10 días de la siembra mostró que todas las cepas fueron capaces de sobrevivir y colonizar las raíces con poblaciones de rizobios que alcanzaron al menos 10^5 - 10^6 ufc/g de raíz (Cuadro 16). Para las cepas LRT 64, TRT 10 y U204 no fue posible conocer el número de rizobios ya que tuvieron un crecimiento muy rápido formando macro colonias en la mayor dilución sembrada en el medio EMA. Las características morfológicas de las colonias observadas coinciden con las de rizobios por lo que se puede afirmar que estas cepas también fueron capaces de sobrevivir y colonizar las raíces de *O. sativa*.

Al finalizar el ensayo, al momento de la cosecha, se confirmó la presencia de rizobios viables en el interior de las raíces ya que las plantas de *L. corniculatus* y *T. repens* inoculadas con un macerado de raíces desinfectadas desarrollaron

nódulos luego de 30 días de inoculadas (Cuadro 16). Este resultado indica la capacidad de estas cepas de rizobios de colonizar el interior de las raíces de las plantas de *O. sativa*.

Cuadro 16. Número de rizobios en las semillas y raíces de plantas de *O. sativa* cultivar INIA Olimar inoculadas con cepas de rizobios.

Cepa	Conteo en semillas ^a (ufc/semilla)	Conteo en raíz ^b (ufc /g raíz)	Rizobios en raíces a la cosecha ^c
LRT13	nd*	4,0 x 10 ⁵	+
LRT35	2,9 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁵	+
LRT64	nd*	> 10 ⁸	+
U510	4,7 x 10 ⁶	nd**	+
U531	1,5 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	+
TRT10	3,5 x 10 ⁵	> 10 ⁸	+
TRT21	2,0 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁵	+
TRT33	4,7 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁵	+
U204	5,7 x 10 ⁶	> 10 ⁶	+

^a al momento de la siembra, ^b a los 10 días post siembra, ^c presencia de rizobios capaces de nodular en raíces desinfectadas al momento de la cosecha (30 días).

Nd* no determinado por la presencia de contaminantes junto a los rizobios; nd** no determinado porque la semilla inoculada no germinó. (+) formación de nódulos en plantas de *L. corniculatus* inoculadas con macerado de raíces de los tratamientos inoculados con cepas LRT, U510 y U531 o en plantas de *T. pratense* inoculadas con cepas TRT y U204.

En este estudio se determinó que la cepa U204 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* logró promover el crecimiento inicial en las plantas de *O. sativa*, aumentando la producción de biomasa de parte aérea y raíz. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Granada et al., 2014, en el que se estudiaron cepas de rizobios nativas aisladas de *T. repens* en suelos de Brasil y se constató que estos aislamientos lograron mejorar la velocidad de germinación y favorecieron el crecimiento de plantas de *O. sativa*. Son varias las investigaciones que han demostrado que rizobios de distintos géneros y especies son capaces de promover el crecimiento de plantas de arroz (Prayitno et al., 1999, Biswas et al., 2000, Chi et al., 2005, Vargas et al., 2009, Yanni y Dazzo, 2010, Granada et al., 2014). Es de destacar que la cepa U204 no había promovido ni la germinación ni el largo de raíz en el germinador y que las cepas que si lo hicieron no promovieron el crecimiento en el ensayo de invernáculo. Este resultado podría deberse a un efecto hormonal de las cepas que presentan

una elevada producción de AIA. Si bien la presencia de esta hormona se asocia con un efecto positivo sobre el crecimiento, en condiciones de sobreproducción el efecto es adverso al esperado y conlleva a una inhibición sobre las plantas, teniendo esto en cuenta no se espera una correlación positiva entre concentración de AIA y germinación o crecimiento. Algunos autores mencionan que con una concentración mínima de esta hormona ya podría afectar positivamente. Un ejemplo de esta situación ocurre con el aislamiento TRT 10 que es el aislamiento que presentó menor síntesis de AIA, pero logró muy buen comportamiento en germinación, largo de raíz, y principalmente en el ensayo final.

El aislamiento U204 que presentó resultado significativo en este ensayo final, se caracteriza por ser utilizado para la fabricación de inoculantes comerciales para *T. repens* y *T. pratense* dos componentes importantes en nuestro sistema de praderas por lo que está ampliamente estudiado y además presenta como ventaja que se conoce su comportamiento industrial y ya está desarrollada la tecnología para su producción como inoculante, otro aspecto importante a destacar es que en un sistema de rotaciones que implemente el componente praderas a un sistema de arrocero es de esperar que se encuentren poblaciones de esta cepa utilizada para las inoculaciones en las plantas de arroz.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que las cepas de rizobios evaluadas fueron capaces de colonizar y persistir por 30 días en las raíces de arroz. Estos resultados confirman lo reportado por varios autores de que los rizobios suelen establecer una relación con plantas pertenecientes a la familia de las gramíneas. Teniendo en cuenta el proceso de colonización en un estudio Chi et al. (2005) analizando los procesos de infección y colonización determinaron los sitios donde ocurre la interacción rizobio – raíz en plantas de arroz, destacando que la infección suele ocurrir entre células epidérmicas que se encuentran desplazadas y que este hecho coincide con otros estudios que han encontrado que éste es el principal sitio en donde ocurre la colonización de rizobios con otras especies no leguminosas. Por otro lado, Lupwayi et al. (2004) encontraron rizobios en las raíces de trigo, cebada y canola y a su vez comprobaron una correlación positiva entre la presencia de poblaciones de rizobios y el rendimiento (expresado en toneladas por hectárea) de estos cultivos. En el presente trabajo, sólo la cepa U204 fue capaz de demostrar promoción del crecimiento vegetal, las restantes cepas a pesar de colonizar y persistir en la planta, no demostraron favorecer el crecimiento vegetal en estas condiciones. A futuro sería interesante evaluar el efecto de la inoculación con estas cepas en ensayos realizados en otras condiciones, como por ejemplo teniendo en cuenta

la disponibilidad de nutrientes de forma contrastante para determinar la respuesta de las plantas inoculadas, también se pueden considerar otros factores como el tiempo de duración ya que la promoción del crecimiento es un mecanismo multifactorial por lo que algunos procesos pueden implicar un período más extenso para poder expresarse y ser evaluados.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los rizobios aislados de arroz que nodulan *L. corniculatus* o *T. repens* presentan variabilidad en características como la eficiencia simbiótica, como también en características relacionadas a la colonización-infección de raíces (degradación de pectina, movilidad, producción de biofilm) y promoción del crecimiento (síntesis de ácido indol acético y solubilización de fosfatos).

Las cepas evaluadas presentaron capacidad de interactuar y asociarse con plantas de *O. sativa* cultivar INIA Olimar y comportarse como endófitos de raíz. Los efectos de la inoculación con estas cepas fueron variables, algunas cepas demostraron promover la germinación y largo de raíz mientras que se detectaron otras que no se diferenciaron del control por lo que se concluyó que se comportaron como inocuas y la interacción en esos casos no fue benéfica.

La inoculación con la cepa U204 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* utilizada en los inoculantes comerciales para *T. repens* y *T. pratense*, logró promover el crecimiento inicial en plantas de *O. sativa* expresado a través del peso seco del sistema radical y parte aérea. Es necesario comprobar este efecto en futuros ensayos usando suelo como sustrato y a campo. Si bien las inoculaciones realizadas con las demás cepas no lograron diferencias significativas con respecto al control, las plantas establecieron una interacción con los rizobios, por lo que no se podría descartar que en otras condiciones de crecimiento tengan un efecto benéfico constituyendo un recurso potencial para futuras investigaciones.

6. RESUMEN

Una de las interacciones entre plantas y microorganismos de mayor interés biológico y agronómico es la denominada simbiosis que ocurre entre la familia de las Leguminosas y bacterias llamadas rizobios. Estas bacterias también pueden establecer una interacción como endófitas con otras familias como son las gramíneas y promover el crecimiento en especies como el arroz (*Oryza sativa*). Este cultivo es de particular importancia en nuestro país por su contribución a la economía nacional como también por tratarse de un sector con reconocimiento internacional en algunos aspectos como la calidad del producto exportado, la integración en las etapas de la cadena productiva y las líneas de investigación desarrolladas.

En este trabajo se caracterizó una colección de cepas de rizobios compuesta por 14 aislamientos que nodulan Trébol blanco (*Trifolium repens*) y 16 que nodulan Lotus (*Lotus corniculatus*), aisladas de raíces desinfectadas de plantas de arroz provenientes del ensayo de larga duración de la Estación Experimental Paso de la Laguna, INIA, Treinta y Tres. También se caracterizaron las cepas utilizadas en la fabricación de inoculantes comerciales U531 *Mesorhizobium loti*, U510 *Mesorhizobium huakuii* y U204 *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. Se determinaron *in vitro* características relacionadas con la capacidad de colonización, y de promoción del crecimiento vegetal como: eficiencia simbiótica, degradación de pectina, movilidad, producción de biofilm, solubilización de fosfatos, síntesis de ácido indol acético y capacidad de promover la germinación en semillas de *Oryza sativa*. Los resultados mostraron variabilidad entre las cepas, algunas cepas se destacaron mostrando ser candidatas a seguir evaluando en ensayos de inoculación.

El ensayo de invernáculo llevado a cabo inoculando semillas de *Oryza sativa* cultivar INIA Olimar con 3 de las cepas que nodulan *Lotus corniculatus*, 3 de las que nodulan *Trifolium repens* y las cepas de los inoculantes comerciales U510, U531 y U204 confirmó la interacción de las mismas con plantas de arroz ya que mostró que estas cepas fueron capaces de colonizar y persistir en las raíces hasta 30 días luego de la inoculación. Entre las 9 cepas evaluadas se destacó la cepa U204 *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*, que logró promover el crecimiento de las plantas de arroz crecidas en arena: vermiculita mostrando un incremento significativo en la producción de materia seca de la parte aérea y la raíz. Es necesario comprobar estos resultados en futuros ensayos de inoculación usando suelo como sustrato y en condiciones de campo.

Palabras clave: PGPR, rizobios endófitos, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Oryza sativa*.

7. SUMMARY

One of the interactions between plants and microorganisms of greatest biological and agronomic interest is the symbiosis between the Legume family and bacteria called rhizobia. These bacteria can also establish an interaction as endophytes with other families such as grasses and to enhance production in species such as rice (*Oryza sativa*). This crop is of particular importance in our country for its contribution to the national economy as well as for being a sector with international recognition in some aspects such as the quality of the exported product, the integration in the stages of the productive chain and the lines of research developed.

In this work, 14 rhizobial strains nodulating white clover (*Trifolium repens*) and 16 nodulating bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*), previously isolated from disinfected roots of rice plants from the long-term experiment of Paso de la Laguna, INIA, Treinta y Tres were characterized. The strains used in commercial inoculants U531 *Mesorhizobium loti*, U510 *Mesorhizobium huakuii* and U204 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* were also included. The strains were screened for their colonization capacity and plant growth promoting traits, such as: symbiotic efficiency, pectin degradation, mobility, biofilm production, phosphate solubilization, indole acetic acid synthesis and ability to promote seed germination of *Oryza sativa*. The results showed variability among the strains, some strains stood out showing to be candidates to continue evaluating in inoculation tests.

Three of the strains nodulating *Lotus corniculatus*, 3 nodulating *Trifolium repens* and the strains of the commercial inoculants U510, U531 and U204 confirmed their interaction with rice plants cultivar INIA Olimar being able to colonize and persist in the roots up to 30 days post inoculation in greenhouse. Among the 9 tested strains, strain U204 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, showed the ability to promote growth of rice plants grown in sand: vermiculite showing a significant increase in shoot and root dry matter. It is necessary to check these results in future inoculation trials using soil as substrate and under field conditions.

Keywords: PGPR, endophytic rhizobia, *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Oryza sativa*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Albareda, M.; Dardanelli, M. S.; Sousa, C.; Megías, M.; Temprano, F.; Rodríguez-Navarro, D. N. 2006. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiology Letters*. 259(1): 67 – 73.
2. Atlas, R. M.; Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid, Addison Wesley. 677 p.
3. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2013. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2da ed. Madrid, McGraw-Hill. 651 p.
4. Balian, C.; Silva, M.; Borges, M. 2018. Análisis costo-beneficio del riego intermitente en el cultivo de arroz en Uruguay. *Anuario OPYPA*. 2018: 569 – 581.
5. Banerjee, S.; Palit, R.; Sengupta, C.; Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science*. 4(6): 378 – 383.
6. Baraibar, A.; Frioni, L.; Guedes, M. E.; Ljunggren, H. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 34(6): 1010 – 1017.
7. Barea, M.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. *In: Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Berlin, Springer. pp. 195 – 212.
8. Batista, L.; Irisarri, P.; Rebuffo, M.; Cuitiño, M. J.; Sanjuán, J.; Monza, J. 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*. 51(1): 11 – 20.
9. Beltrán-Pineda, M. E. 2014a. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*. 15(1): 101 – 113.

10. _____. 2014b. Bacterias solubilizadoras de fosfato con potencial biofertilizante en suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía*. 22(2): 7 – 20.
11. Beyhaut, E.; Nuñez, E.; Terra, J. 2015. Fijación biológica de nitrógeno: nuevos desafíos: mesa tecnológica de oleaginosas. (en línea). In: Jornadas de Agrobiotecnología INIA (9°. , 2015, Montevideo). Apostando a la investigación para un futuro innovador. Montevideo, INIA. p. 8 (Actividades de difusión no. 755). Consultado feb. 2022. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9863/1/SAD-755-p.8.pdf>.
12. _____.; Lattanzi, F. 2019. Fijación biológica de nitrógeno: avances en soja y leguminosas forrajeras. (en línea). In: Ciclo de destacadas INIA (2019, Las Brujas). Herramientas biológicas para una producción agroecológica. Montevideo, INIA. 31 p. Consultado feb. 2022. Disponible en <http://inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Las%20Brujas/Herramientas%20biol%C3%B3gicas%2026%20set%202019/2%20-%20Beyhaut%20-%20Lattanzi%20-%20Fijaci%C3%B3n%20nitr%C3%B3geno.pdf>.
13. Biswas, J.; Ladha, J.; Dazzo, F. B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Science Society of America Journal*. 64(5): 1644 – 1650.
14. Blanco, P.; Molina, F.; Pérez de Vida, F.; Ávila, S.; Lavecchia, A.; Marchesi, C.; Deambrosi, E.; Méndez, R.; Saldain, N.; Roel, A.; Zorrilla, G.; Acevedo, A. 2004. INIA Olimar: características y comportamientos en la zafra 2003/2004. *Arroz*. 10(38): 40 – 48.
15. Borjas-Ventura, R.; Julca-Otiniano, A.; Alvarado-Huamán, L. 2020. Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 8(2): 150 – 164.
16. Casbis, G.; Torres, O. 2016. Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos. *Acta Agrícola y Pecuaria*. 2(3): 55 – 61.
17. Castanheira, N.; Dourado, A. C.; Alves, P. I.; Cortes-Pallero, A. M.; Delgado-Rodríguez, A. I.; Prazeres, Â.; Fareleira, P. 2014. Annual

ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. *Microbiological Research*. 169(9-10): 768 – 779.

18. Chi, F.; Shen, S. H.; Cheng, H. P.; Jing, Y. X.; Yanni, Y. G.; Dazzo, F. B. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 7271 – 7278.
19. Courdin, V.; Hernández, A. 2013. Dinámica del cultivo de arroz en Uruguay en el “nuevo” escenario agropecuario (2000-2010). *Cangüé*. no. 34: 21 – 31.
20. Courdin, V. 2014. El complejo arrocero de Uruguay durante 2000–2010: la visión de sus actores. *Pampa*. 10(10): 247 – 262.
21. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. *InfoStat*. (en línea). Versión 2018. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Consultado feb. 2022. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>.
22. Egamberdieva, D.; Wirth, S.; Alqarawi, A.; Abd Allah, E.; Hashem, A. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. (en línea). *Frontiers in Microbiology*. 8: 2104. Consultado feb. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>.
23. Etesami, H.; Alikhani, H. A.; Hosseini, H. M. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*. 2: 72 – 78.
24. Fankem, H.; Nwaga, D.; Deubel, A.; Dieng, L.; Merbach, W.; Etoa, X. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*. 5(24): 2450 – 2460.
25. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2011. *Agronoticias: actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe: Uruguay: noveno exportador mundial de*

arroz. (en línea). Roma. Consultado set. 2021. Disponible en <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/507782/>.

26. Ferguson, J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, H.; Lin, H.; Reid, E.; Gresshoff, M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52(1): 61 – 76.
27. Fernández, L. A.; Zalba, P.; Gómez, M. A.; Sagardoy, M. A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo*. 23(1): 31 – 37.
28. Fernández-Canigia, V. 2020. Factores determinantes de la nodulación. (en línea). ed. amp. act. Buenos Aires, Nitragin. 87 p. Consultado feb. 2022. Disponible en https://biosolutions.novozymes.com/sites/default/files/file_download/actores_determinantes_de_la_nodulacion%20-%20web.pdf.
29. Frioni, L. 1990. *Ecología microbiana del suelo*. Montevideo, Universidad de la República. 519 p.
30. _____. 2006. *Microbiología, básica, ambiental y agrícola*. Montevideo, Facultad de Agronomía. 463 p.
31. García, F.; Courdin, V.; Hernández, A. (2011). Complejo arrocero. In: Vassallo, M. eds. *Dinámica y competencia intrasectorial en el agro: Uruguay 2000–2010*. Montevideo, Universidad de la República. pp. 91 – 104.
32. Glick, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169(1): 30 – 39.
33. Gordon, S. A.; Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 26(1): 192 – 195.
34. Granada, C. E.; Arruda, L.; Lisboa, B. B.; Passaglia, L. M.; Vargas, L. K. 2014. Diversity of native rhizobia isolated in south Brazil and their growth promotion effect on white clover (*Trifolium repens*) and rice (*Oryza sativa*) plants. *Biology and Fertility of Soils*. 50(1): 123 – 132.
35. Hirsch, P.; Mauchline, T. 2012. Who's who in the plant root microbiome? *Nature Biotechnology*. 30: 961 – 962.

36. Howieson, J. G.; Dilworth, M. J. 2016. Working with rhizobia. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research. 312 p.
37. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2006. El cultivo en Uruguay: Uruguay exportador de arroz. (en línea). Suplemento tecnológico. nro. 11: 12. Consultado 02 set. 2021. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5749/1/Suplemento-tecnologico-2006.pdf>.
38. _____. 2018. Sistema arroz-ganadería: INIA Merín. (en línea). Montevideo. 3 p. (Ficha Técnica nro. 37). Consultado set. 2021. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/Ficha-37-2018.pdf>.
39. Irisarri, P.; Cardozo, G.; Tartaglia, C.; Reyno, R.; Gutiérrez, P.; Lattanzi, F. A.; Monza, J. 2019. Selection of competitive and efficient rhizobia strains for white clover. (en línea). *Frontiers in Microbiology*. 10: 768. Consultado feb. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>.
40. Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. In: Squeo, F, A.; Cardemil, L. eds. *Fisiología vegetal*. La Serena, Universidad de La Serena. pp. 1 – 28.
41. Kearns, D. B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 634 – 644.
42. Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96(3): 473 – 480.
43. Kouchi, H.; Imaizumi-Anraku, H.; Hayashi, M.; Hakoyama, T.; Nakagawa, T.; Umehara, Y.; Kawaguchi, M. 2010. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant and Cell Physiology*. 51(9): 1381 – 1397.
44. Kucey, R. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*. 63(4): 671 – 678.

45. Kuiper, I.; Lagendijk, L.; Bloemberg, V.; Lugtenberg, J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular plant-microbe interactions*. 17(1): 6 – 15.
46. Kumar V.; Narula, N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter choroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*. 28(3): 301 – 305.
47. Lara, C.; Esquivel Ávila, L.; Negrete Peñata, J. 2011. Native phosphate solubilizing bacteria to increase the crops in the department of Cordoba-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(2): 114 – 120.
48. López Rodríguez, M.; Arcia, P.; Pérez de Vida, F.; Tresso, G.; Figueredo, V.; Luzardo, C.; Gonnet, D.; Uraga, R.; Sanguinetti, M.; Billiris, A. 2020. Red tecnológica de arroz: grupos de calidad del arroz uruguayo. In: Terra, J. A.; Martínez, S.; Saravia, H.; Mesones, B.; Álvarez, O. eds. *Arroz 2020*. Montevideo, INIA. pp. 113 – 116. (Serie Técnica nro. 257).
49. Lupwayi, N. Z.; Clayton, G. W.; Hanson, K. G.; Rice, W. A.; Biederbeck, V. O. 2004. Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. *Canadian Journal of Plant Science*. 84(1): 37 – 45.
50. Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 2015. *Brock: biología de los microorganismos*. 14 ed. Madrid, Pearson. 1011 p.
51. Mareque, C.; Taulé, C.; Beracochea, M.; Battistoni, F. 2015. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*. 65(2): 1057 – 1067.
52. Marin, V.; Baldani, V.; dos Santos-Teixeira, K.; Baldani, J. 1998. Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. São Paulo, EMBRAPA. 24 p. (Documentos no. 91).
53. Márquez, A.; Betti, M.; García-Calderón, M.; Pal'ove-Balang, P.; Díaz, P.; Monza, J. 2005. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*. 56(417): 1741 – 1749.

54. Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola. 4(1): 1 – 20.
55. Mengel, K.; Kirkby, E. 2000. Principios de nutrición vegetal. 4 ed. Basilea, Instituto Internacional de la Potasa. 307 p.
56. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2019. Encuesta de arroz: zafra 2018-2019. (en línea). Montevideo. 19 p. (Serie Encuestas no. 359). Consultado 3 set. 2021. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-estadisticas/estadisticas/encuesta-arroz-zafra-201819>.
57. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2021. Encuesta de arroz: zafra 2020-2021. (en línea). Montevideo. 10 p. (Serie Encuestas no. 367). Consultado set. 2021. Disponible en https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2021-09/Pub_Arroz%202020_21.pdf.
58. MINTUR (Ministerio de Turismo, UY). 2021. Uruguay es el 7º exportador mundial del arroz: te invitamos a conocer su ruta. (en línea). Montevideo. Consultado set. 2021. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-turismo/comunicacion/noticias/uruguay-es-7o-exportador-mundial-del-arroz-te-invitados-conocer-su-ruta>.
59. Molina, F.; Terra, J.; Roel, A.; Oxley, M. 2020. Arroz 2020: indicadores tecnológicos-productivos zafra arrocería 2019-2020. Montevideo, INIA. 13 p. (Serie Técnica no. 257).
60. Molina, F.; Terra, J. A.; Roel, A. 2019. Evolución de algunas variables tecnológicas en el cultivo de arroz en Uruguay: arroz 2019. Montevideo: INIA. p. 1 – 3. (Serie Técnica no. 250).
61. Monza, J.; Fabiano, E.; Arias, A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. Soil Biology and Biochemistry. 24(3): 241 – 247.
62. Morón, A. 1996. El fósforo en los sistemas productivos: dinámica y disponibilidad en el suelo. Tacuarembó, INIA. 33 p. (Serie Técnica no. 80).

63. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170(1): 265 – 270.
64. Oldroyd, E.; Murray, D.; Poole, S.; Downie, A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45: 119-144.
65. _____. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*. 11(4): 252 – 263.
66. Paredes, M.; Espinosa, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28(1): 61 – 70.
67. Pariona-Llanos, R.; Ibañez de Santi Ferrara, F.; Soto Gonzales, H. H.; Ramos Barbosa, H. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *European Journal of Soil Biology*. 46(6): 387 – 393.
68. Patiño-Torres, C. 2010. Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del cauca: Estudio de biodiversidad y eficiencia. Tesis Dr. en Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 133 p.
69. Patiño-Torres, C.; Sanclemente-Reyes, O. 2014. Phosphate-solubilizing microorganisms (PSM): a biotechnological alternative solution for a sustainable agriculture. *Entramado*. 10(2): 288 – 297.
70. Paulucci, N. S.; Gallarato, L. A.; Reguera, Y. B.; Vicario, J. C.; Cesari, A. B.; de Lema, M. B. G.; Dardanelli, M. S. 2015. *Arachis hypogaea* PGPR isolated from Argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity. *Microbiological Research*. 173: 1 – 9.
71. Peng, G.; Yuan, Q.; Li, H.; Zhang, W.; Tan, Z. 2008. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(9): 2158 – 2163.

72. Pérez-Montaño, F.; Alías-Villegas, C.; Bellogín, R. A.; del Cerro, P.; Espuny, M. R.; Jiménez-Guerrero, I.; Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169(5-6): 325 – 336.
73. Prayitno, J.; Stefaniak, J.; McIver, J.; Weinman, J.; Dazzo, B.; Ladha, J.; Rolfe, B. G. 1999. Interactions of rice seedlings with bacteria isolated from rice roots. *Functional Plant Biology*. 26(6): 521 – 535.
74. Raghothama, G. 2000. Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 3(3): 182-187.
75. Récord en producción: optimismo para un sector clave. 2021. *Arroz*. 21(103): 30 – 31.
76. Restrepo-Franco, G.; Marulanda-Moreno, S.; de la Fe-Pérez, Y.; Díaz de la Osa, A.; Hernández-Rodríguez, A. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 46(1): 63 – 76.
77. Rinaudi, L.; Giordano, W. 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*. 304:1 – 11.
78. Rives, N.; Acebo, Y.; Hernández, A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.): perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28(2): 29 – 38.
79. Rodríguez Blanco, A.; Sicardi, M.; Frioni, L. 2010. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biology and Fertility of Soils*. 46(4): 419 – 425.
80. Rojas-Contreras, A.; Rodríguez Dorantes, A. M.; Montes Villafán, S.; Pérez Jiménez, S.; Rodríguez Tovar, A.; Guerrero Zúñiga, L. A. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*. no. 29: 131 – 147.

81. Rooney, C.; Clipson, J. 2009. Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microbial ecology*. 57(1): 4 – 13.
82. Salgado, L. 2019. Arroz: situación y perspectivas. *Anuario OPYPA*. 2019: 211 – 223.
83. Sanabria, Y. 2018. Alternativas tecnológicas para el sector arrocero en un escenario desafiante: estado actual de las variedades de arroz en el cono sur y perspectivas de nuevos cultivares para la región. *In*: Zorrilla de San Martín, G.; Martínez, S.; Terra, J. A.; Saravia, H. eds. *Arroz 2018*. Montevideo, INIA. pp. 35 – 37. (Serie Técnica no. 246).
84. Santoyo, G.; Moreno-Hagelsieb, G.; del Carmen Orozco-Mosqueda, M.; Glick, B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*. 183: 92 – 99.
85. Scattareggia, J. 2016. Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis Ing. Recursos Naturales Renovables. Mendoza, Argentina. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Agrarias. 57 p.
86. Schlindwein, G.; Vargas, L. K.; Lisboa, B. B.; Azambuja, A. C.; Granada, C. E.; Gabiatti, N. C.; Prates, F.; Stumpf, R. 2008. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. *Ciencia Rural*. 38(3): 658 – 664.
87. Sorroche, F. G.; Spesia, M. B.; Zorreguieta, Á.; Giordano, W. 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(12): 4092 – 4101.
88. Sotelo, E. 2011. Uruguay apuesta a la semilla de arroz de calidad. *Arroz*. 15(66): 44 – 46.
89. Soto, M. J.; Sanjuan, J.; Olivares, J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*. 152(11): 3167 – 3174.

90. Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31(4): 425 – 448.
91. Terra, J.; García Préchac, F.; Rovira, P. 2003. Rotaciones forrajeras en siembra directa en Lomadas del Este: evolución de indicadores (1995-2003). *In: Jornada Anual de Producción Animal (2003, Treinta y Tres)*. Resultados experimentales. Montevideo, INIA. p. 83 – 89. (Serie Actividades de Difusión no. 332).
92. _____; Altier, N. 2015. Desarrollo de insumos microbianos para la agricultura. (en línea). Contribución presentada en: Jornada Técnica: Fijación biológica de N y enfermedades de implantación en soja (2015, Las Brujas). Consultado feb. 2022. Disponible en http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Las%20Brujas/Fijaci%C3%B3n%20de%20nitr%C3%B3geno%2028_8_2015/Jo%C3%A9%20Terra.pdf.
93. Tommasino, H.; Hernández, A. 2003. El cultivo de arroz en Uruguay: contribución a su conocimiento. Montevideo, DIEA. 31 p.
94. Vargas, L.; Lisboa, B. B.; Schlindwein, G.; Granada, C. E.; Giongo, A.; Beneduzi, A.; Passaglia, L. M. P. 2009. Ocorrência de características de promoção de crescimento em rizóbios noduladores de trevo isolados de solos do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 33: 1227 – 1235.
95. _____; Volpiano, C. G.; Lisboa, B. B.; Giongo, A.; Beneduzi, A.; Passaglia, L. M. 2017. Potential of rhizobia as plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Zaidi, A.; Saghir Khan, M.; Musarrat, J. eds. Microbes for legume improvement*. Cham, Springer. pp. 153 – 174.
96. Vega-Celedón, P.; Canchignia Martínez, H.; González, M.; Seeger, M. 2016. Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*. 37: 33 – 39.
97. Vicario, J. C.; Dardanelli, M. S.; Giordano, W. 2015. Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*. 362(2): 1 – 6.

98. Yanni, Y. G.; Dazzo, F. B. 2010. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. *Plant and Soil*. 336(1): 129 – 142.
99. _____; Rizk, R.; Corich, V.; Squartini, A.; Ninke, K.; Philip-Hollingsworth, S.; Orgambide, G.; de Bruijn, F.; Stoltzfus, J.; Buckley, D.; Schmidt, M.; Mateos, F.; Ladha, J.; Dazzo, B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*. 194(1-2): 99 – 114.
100. Zorrilla, H. 2015. Producir y exportar arroz en Uruguay: fortalezas y obstáculos. Contribución presentada en: Seminario: El sector arrocerero en Uruguay: Desafíos para la competitividad (2015, Montevideo).