

<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1.Control biológico</b>	1
<b>1.1.a.</b> Factores abióticos	3
<b>1.1.b.</b> Factores bióticos	4
<b>1.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs)</b>	5
<b>1.3. Mecanismos de biocontrol</b>	6
<b>1.3.a.</b> Mecanismos directos	6
<b>1.3.a.I.</b> Producción de sideróforos	6
<b>1.3.a.II.</b> Fijación del nitrógeno	8
<b>1.3.a.III.</b> Solubilización de fosfatos	8
<b>1.3.a.IV.</b> Producción de fitohormonas	9
<b>1.3.b.</b> Mecanismos indirectos	13
<b>1.3.b.I.</b> Producción de sustancias movilizadoras de nutrientes	13
<b>1.3.b.II.</b> Antibiosis	13
<b>1.3.b.III.</b> Competencia en la rizósfera	14
<b>1.3.b.IV.</b> Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos	14
<b>1.3.b.V.</b> Síntesis de enzimas capaces de hidrolizar la pared celular de los hongos	14
<b>1.3.b.VI.</b> Bacteriocinas	15
<b>1.3.b.VII.</b> Ácido cianhídrico	15
<b>1.3.b.VIII.</b> Resistencia sistémica inducida	16
<b>1.4. Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos</b>	18
<b>1.4.a.</b> Síndrome de la muerte repentina	18
<b>1.4.b.</b> Podredumbre carbonosa del tallo	19
<b>1.4.c.</b> Podredumbre de la mazorca del maíz	19
<b>1.4.d.</b> Fusariosis de la espiga del trigo	20

<b>1.5. <i>Pseudomonas</i> y control biológico</b>	22
<b>1.5.a.</b> Características	22
<b>1.5.b.</b> Antecedentes	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	24
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Estudio de las características PGPR</b>	25
<b>3.1.a.</b> Producción de sideróforos	25
<b>3.1.b.</b> Producción de ácido indol acético (AIA) y/o análogos	25
<b>3.1.c.</b> Producción de ácido cianhídrico	25
<b>3.1.d.</b> Producción de exopolisacáridos	26
<b>3.1.e.</b> Solubilización de fosfato tricálcico	26
<b>3.1.f.</b> Solubilización de fosfato monocálcico	26
<b>3.2. Determinación de diversas actividades enzimáticas</b>	26
<b>3.2.a.</b> Determinación de la actividad caseinolítica	26
<b>3.2.b.</b> Determinación de lipasa	26
<b>3.2.c.</b> Determinación de lecitinasa	26
<b>3.2.d.</b> Determinación de celulasa	27
<b>3.2.e.</b> Producción de amilasa	27
<b>3.3. Estudio “in vitro” de la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por diferentes bacterias</b>	27
<b>3.4. Determinación del crecimiento de los microorganismos en diferentes condiciones</b>	28
<b>3.4.a.</b> Determinación del crecimiento de <i>Pseudomonas aurantiaca</i> , <i>Pseudomonas pútida</i> , <i>Pseudomonas fluorescens pf5</i> y <i>Pseudomonas fluorescens wcs 417r</i> utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato	28
<b>3.4.b.</b> Determinación del crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens wcs 417r</i> diferentes fuentes de carbono	28

3.4.c. Determinación del crecimiento de <i>Pseudomona aurantiaca</i> , <i>Pseudomona fluorescens chao</i> y <i>Bradyrhizobium spp. C145</i> utilizando diferentes fuentes de carbono	29
<b>3.5. Medios de cultivos y soluciones</b>	<b>30</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>4.1. Estudio de las características PGPR</b>	<b>34</b>
4.1.a. Producción de sideróforos	34
4.1.b. Producción cualitativa de ácido indol acético (AIA) y/o análogos	35
4.1.c. Producción de ácido cianhídrico	36
4.1.d. Producción de exopolisacáridos	37
4.1.e. Solubilización de fosfato tricálcico	39
4.1.f. Solubilización de fosfato monocálcico	39
<b>4.2. Determinación de diversas actividades enzimáticas</b>	<b>40</b>
4.2.a. Determinación de la actividad caseinolítica (proteolítica)	40
4.2.b. Determinación de lipasa	41
4.2.c. Determinación de lecitinasa	42
4.2.d. Determinación de celulasa	42
4.2.e. Producción de la amilasa	44
<b>4.3. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por diferentes bacterias</b>	<b>45</b>
<b>4.4. Crecimiento de los microorganismos en diferentes condiciones</b>	<b>52</b>
4.4.a. Crecimiento de <i>Pseudomona aurantiaca</i> utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato	52
4.4.b. Crecimiento de <i>Pseudomona pútida</i> utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato	53
4.4.c. Crecimiento de <i>Pseudomona fluorescens pf5</i> utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato	54

<b>4.4.d.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> wcs 417r utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato	55
<b>4.4.e.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> wcs 417r con diferentes fuentes de carbono	57
<b>4.4.f.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas aurantiaca</i> con diferentes fuentes de carbono	58
<b>4.4.g.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> chao con diferentes fuentes de carbono	59
<b>4.4.h.</b> Crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> spp. C145 con diferentes fuentes de carbono	60
<b>5. CONCLUSIONES</b>	62
<b>6. PERSPECTIVAS A FUTURO</b>	62
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	63

### 1.1. Control biológico

A partir de la segunda mitad del siglo XX, el conocimiento adquirido sobre la presencia de patógenos, de la ecología, y de la distribución de las comunidades microbianas nativas del suelo, se inició el desarrollo de una disciplina denominada Control Biológico de Patógenos de las Plantas.

La consecuente reducción de los síntomas de las enfermedades era debida, entre otras causas, a la presencia de microorganismos con características particulares (Hointink et al., 1997). Se comenzaron entonces a describir una gran variedad de microorganismos no patógenos, que interferían en la biología de otros microorganismos patógenos de las plantas, siendo así susceptibles de ser usados como elementos biológicos de control de la enfermedad, denominándose agentes de biocontrol.

Baker y Cook (1974), definen el control biológico como la estrategia de control de enfermedades de las plantas, en la cual hay una disminución de la densidad o de las actividades de uno o más patógenos que producen una enfermedad, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, del hospedador o del antagonista, o por la introducción de uno o más antagonistas.

Una de las grandes ventajas del control biológico, es que con frecuencia los agentes de biocontrol están dotados de propiedades similares al patógeno, como son la multiplicación y la dispersión.

El control biológico funciona naturalmente, es decir, en la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que no se desarrolle una determinada enfermedad (Cook y Baker, 1983). En condiciones naturales, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. La disminución de la flora de competencia por las prácticas agrícolas, por la aplicación de fungicidas y por la desinfección de los suelos, entre otras, favorecen el crecimiento de organismos potencialmente patógenos (Rollan et al., 1998).

El control biológico puede convertirse en un componente importante en las prácticas del manejo de las enfermedades de las plantas. La demanda de alternativas al control químico de los patógenos de las plantas se ha incrementado, debido a la preocupación sobre la seguridad y los impactos medioambientales de los agentes químicos (Jensen et al., 1996).

Según Harman y Lumsden, (1990) dos propósitos generales deberían desarrollarse con la finalidad que el control biológico sea más efectivo y menos variable que el químico y, de este modo, alcanzar un nivel de eficacia aceptable:

- 1- Utilización de cepas genéticamente superiores (obtenidas por selección o por manipulación genética).
- 2- Desarrollo de sistemas de soporte y distribución (que proveen un sistema conductivo para los bioprotectores en relación a minimizar las actividades competitivas con la microflora establecida).

La introducción masiva de microorganismos antagónicos al suelo con el objeto de inactivar propágulos de los agentes causantes de enfermedades, intenta reducir o suprimir la infección por estos. En su acción, el agente antagonista podría provocar una rápida colonización y/o competir por los exudados orgánicos del sistema radical. Por otra parte, la acción antagonista podría darse por la capacidad de sintetizar sustancias antibióticas o la

posibilidad de parasitar al agente infeccioso o por una combinación de ambos. Tal es el caso de la aplicación de un bioprotector como tratamiento de semillas, donde los agentes antagónicos podrán crecer sobre la semilla, transferirse a raíces emergentes y si la genética del microorganismo es apropiada, colonizar y proteger en forma integrada todas las porciones subterráneas de la planta.

Además, algunos microorganismos pueden actuar simplemente favoreciendo el desarrollo de las plantas, obteniendo de esta manera cultivos sanos y vigorosos. Tal es el caso de las ectomicorizas y de las micorizas vesículo-arbusculares (MVA), las cuales representan una barrera física que impide el contacto del patógeno con la epidermis del tejido vegetal o simplemente compiten por la captación del fósforo.

Incluso se ha observado, que a medida que la actividad microbiana incrementa en el suelo, algunos microorganismos antagonistas estimulan la producción de enzimas defensivas en el huésped. De esta forma, la inducción de resistencia o la sensibilización del tejido vegetal, activan mecanismos defensivos de pronta respuesta en las plantas (Baker y Cook, 1974).

La actividad biológica de los suelos puede verse incrementada por la acción directa del compost o de abonos verdes, siendo observada una intensa actividad biológica en experiencias con enmiendas a base de residuos de leguminosas, debido a su alto contenido en nitrógeno, carbono y vitaminas (Palti, 1981).

Los microorganismos candidatos para ejercer el biocontrol se encuentran en la rizósfera. Un gran número de organismos macroscópicos y microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos y algas coexisten en la rizósfera. Siendo las bacterias las más abundantes, por ello es muy probable que ellas influyan en la fisiología de la planta (Antoun et al., 2001).

Las interacciones entre los microorganismos del suelo y las raíces satisfacen los requerimientos nutricionales básicos para los vegetales y las comunidades microbianas asociadas a ellas (Brown, 1974; Bowen y Rovira, 1976; Lynch, 1976, 1982 a, 1982 b; Balandreau, 1978; Dommergues y Krupa, 1978; Newman, 1978; Harley y Russell, 1979; Bowen, 1980). Dichas interacciones se basan principalmente en la modificación interactiva del ambiente del suelo por procesos como: captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción microbiana de factores de crecimiento de vegetales, y captura de nutrientes minerales por parte de los microorganismos.

En la rizósfera, las raíces de las plantas tienen una influencia directa en la composición y en la densidad de la microbiota del suelo; es lo que se conoce como efecto rizosférico, en ella hay mayor proporción de bacilos gram negativos y una menor proporción de bacilos y cocos gram positivos, así como de formas pleiomórficas, que en el suelo, que carece de raíces (Rovira y Campbell, 1974; Woldendorp, 1978).

La diversidad bacteriana se define en términos taxonómicos, genéticos y de diversidad funcional. En la rizósfera, la versatilidad metabólica de la población bacteriana (diversidad funcional) se basa en su variabilidad genética y en las posibles interacciones con otros organismos procariontes y eucariontes tales como las plantas.

Las variaciones en las poblaciones por el espacio y el tiempo y su especialización en nichos ecológicos, son dos factores importantes en la rizósfera. El funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo se basa en como las diversas especies aprovechan eficientemente los recursos, y que esto se pueda mantener bajo las condiciones de cambios (Ekschmitt y Griffiths, 1998).

En la rizósfera, los cambios en algunos de los componentes pueden afectar al sistema completo o parte de este. El estado del sistema depende de cambios o variables tales como la edad de la planta, el área radical, la baja disponibilidad de nutrientes, la humedad, la temperatura y la nutrición de la planta (Curl y Truelove, 1986; Whipps, 1990).

La colonización de las raíces por parte de las bacterias es el primer paso, que es el fundamental en la interacción planta-microorganismo, y la capacidad de una bacteria de alterar la fisiología de la planta dependerá de su capacidad para establecerse en la rizósfera (Simons et al., 1996). Los estudios sobre la colonización microbiana de las raíces, indican que las bacterias se distribuyen irregularmente en el rizoplano en función del tipo de planta, del suelo y de las especies de microorganismos (Asanuma et al., 1979). En un segundo paso, los agentes de biocontrol ponen en funcionamiento los mecanismos necesarios para sobrevivir en el ecosistema en el que han ingresado, lo cual dependerá de la habilidad competitiva frente a la microflora nativa ya existente (Howie et al., 1987). El genotipo de la planta influye en la cantidad y composición de la microflora de la rizósfera, posiblemente a través de exudados radicales. Se ha comprobado que las características de los exudados de las plantas pueden influir en la capacidad de colonización y de crecimiento de los agentes de biocontrol (Jackson y Taylor, 1996).

Los factores edáficos que inciden en el crecimiento de las plantas se pueden agrupar en: factores abióticos, que engloban las características fisicoquímicas del suelo, y factores bióticos que abarcan los microorganismos rizosféricos, simbióticos o de vida libre, beneficiosos, neutros o perjudiciales.

### **1.1.a. Factores abióticos**

En este grupo se encuentran: las características fisicoquímicas del suelo, el pH, la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, la concentración de nutrientes y la estructura del suelo.

Las características físicas y químicas de los agregados orgánicos y minerales que constituyen el suelo son factores que influyen en el desarrollo radicular y en su capacidad de exudación, ya que determinan parámetros como la porosidad y, por lo tanto, la aireación, el potencial hídrico, la transferencia de calor, la disponibilidad de nutrientes y el pH (Curl y Truelove, 1986; Lynch, 1990). Además, la textura del suelo está íntimamente relacionada con la nutrición vegetal, ya que los cationes retenidos por el complejo adsorbente constituyen la fuente principal de nutrientes para la alimentación mineral de las plantas (Duchaufour, 1976).

El nitrógeno incrementa la superficie radical, efecto especialmente acusado cuando la fuente de nitrógeno es amonio (Marschner, 1986). Al suplementar nutrientes de forma localizada en el sistema radical, se ha comprobado que sólo la zona afectada, y no todo el sistema radical, responde al suplemento. En maíz, se ha visto como el floema libera productos de la fotosíntesis solo en la zona donde se suplementa con nitrato (Thoms y Sattelmachers, 1990) y también aumenta la respiración radical en esa zona (Granato y Raper, 1989).

El fósforo también afecta al desarrollo radical. Su deficiencia provoca en ciertas plantas la formación de manojos radicales en ciertas raíces laterales denominados "proteoid root", que son zonas con una alta tasa respiratoria y, por lo tanto, con una gran demanda de oxígeno (Vorster y Jooste, 1986).

Además, a estas zonas se les atribuye una elevada tasa de exudación, especialmente de ácido cítrico, que parece estar implicado en la mejora nutricional de fósforo en plantas que viven en ambientes deficitarios en este nutriente (Johnson et al., 1996).

El pH es un factor muy importante en el desarrollo radical, sobre todo por debajo de 5 y por encima de 7,5. Por encima de este valor, se inhibe el crecimiento radical, hecho que suele estar mediado por la presencia de amoníaco. Valores de pH inferiores a 5 también inhiben el crecimiento radical; en este caso, se produce un deterioro en las bombas de protones (Schubert et al., 1990 b) y un aumento en las concentraciones de aluminio que suelen aparecer en los suelos, siendo este catión tóxico para el desarrollo radical (Blamey et al., 1991).

Las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> varían de un suelo a otro, e incluso dentro del mismo suelo, dependiendo de la temperatura, de la humedad (Yamaguchi et al., 1991), el contenido de materia orgánica (Abrosimova y Revut, 1964), la profundidad del suelo (Wood et al., 1993) y el tipo de cultivo (Buyanovsky y Wagner, 1983). La influencia de las rizobacterias sobre la planta, depende en gran medida, de que éstas encuentren óptimos de crecimiento en el medio donde se desarrollan. De este modo, las variaciones en la concentración de estos gases afectarán al crecimiento de las poblaciones microbianas y a su capacidad de biocontrol (Kim et al., 1996), por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* sintetiza menos sideróforos cuando las concentraciones de CO<sub>2</sub> son altas (Kim y Misaghi, 1996).

### **1.1.b. Factores bióticos**

El factor biótico está constituido por los microorganismos edáficos, principalmente hongos y bacterias; éstas últimas más abundantes, que pueden ser simbióticas o de vida libre. Aún siendo de vida libre, los microorganismos que se desarrollan en el sistema rizosférico están íntimamente relacionados con el sistema radical, dada la dependencia energética que se establece, debido a que estos microorganismos se desarrollan cubriendo parcialmente la superficie radical o muy próximos a ella.

Por lo tanto, los metabolitos microbianos interfieren con el metabolismo de la planta y pueden causar respuestas fisiológicas inmediatas y de magnitud considerable.

La interacción entre las bacterias y las raíces puede ser beneficiosa, perjudicial o neutra para la planta y, en ocasiones, el efecto de una bacteria determinada varía según las condiciones del suelo (Lynch, 1990).

Dada la trascendencia del factor biótico y los efectos variados que pueden ejercer, se separa hongos de bacterias, agrupando estas últimas según tengan efecto negativos (DRBs) o positivo (simbiótica o de vida libre, PGPRs).

En cuanto a las bacterias de vida libre que ejercen un efecto negativo sobre la planta, conocidas como bacterias deletéreas (DRBs), coexisten con otras rizobacterias que pueden ser neutras o beneficiosas para la planta (Gutiérrez Mañero et al., 1996). Estas bacterias reducen el crecimiento de la planta causando daño en los tejidos radicales, o bien produciendo metabolitos tóxicos que inhiben el crecimiento y el desarrollo del sistema radical (Brian et al., 1951; Sarathchandra et al., 1996); no obstante, pueden actuar sin ocasionar síntomas visibles, de forma que sea difícil detectar su presencia (Fredrickson y Elliot, 1985 a; Bakker y Schippers, 1987; Schippers et al., 1987).

Las relaciones simbióticas más estudiadas corresponden a *Rhizobium-Bradhyrhizobium-Azorhizobium-Sinorhizobium* con leguminosas, y a *Frankia* con angiospermas no leguminosas.

El desarrollo de la simbiosis requiere de señales moleculares entre rizobios y las células de la planta. Los polisacáridos superficiales característicos de rizobios, particularmente exopolisacáridos y lipopolisacáridos, parecen estar implicados en la simbiosis con distintas leguminosas (Gray y Rolfe, 1990; Leigh y Coplin, 1992).

Por último, las bacterias edáficas de vida libre con un efecto beneficioso sobre la planta, se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o por su acrónimo PGPRs. Estas bacterias ejercen su efecto por dos vías, directa o indirecta, y cada una de ellas se puede desarrollar de diferentes formas, pudiendo una misma cepa utilizar más de un mecanismo de acción. Además, como ya se comentó anteriormente, para que las PGPRs ejerzan su efecto es requisito indispensable que exista un cierto grado de colonización radical. Dada la relevancia de todos estos puntos se describen a continuación en otro apartado.

### **1.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento (PGPRs)**

El término Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR (del inglés: Plant Growth-Promoting Rizobacterias) fue empleado por primera vez en 1978 por Kloepper y Schroth, para describir un grupo de bacterias rizosféricas (o Rizobacterias) que eran capaces de colonizar el sistema radical de la planta y promover el crecimiento vegetal y las subclasificaron por su mecanismo de acción como: directos; aquellos metabolitos bacterianos que se usan como reguladores del crecimiento o sus precursores y los indirectos: aquellos metabolitos que están involucrados en el control biológico, determinantes antagonísticos o que inhiben a los microorganismos que le causan daño a las plantas por medio de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas o inducción en la planta de resistencia sistémica (Jiménez-Delgado et al., 2001).

El término PGPR no incluye aquellas bacterias que actúan como agentes de biocontrol en la filósfera (Bashan y Holguin, 1998) ni a los patógenos intracelulares de nematodos (Siddiqui y Mahomood, 1999). La escasa nomenclatura para estos últimos grupos y la caracterización de pocas bacterias promotoras del crecimiento de la planta (BPCP) que no pertenecían a ningún grupo previamente definido inducía confusión en la clasificación y terminología. Bashan y Holguin (1998), proponen que el término PGPR debería actualizarse, ya que muchas de las bacterias que ejercen efectos positivos en las plantas pueden desarrollarse fuera del sistema rizosférico, y por lo tanto el término es restrictivo. Dada la enorme expansión en el estudio de estas bacterias, actualmente se propone la separación en dos grupos, las PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria, Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas), que afectan estrictamente el crecimiento vegetal, y las "biocontrol-PGPB", cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta.

Gray y Smith (2005), subdividen a las PGPR en dos categorías: extracelular PGPR (e-PGPR) e intracelular PGPR (i-PGPR).

Las e-PGPR, incluyen a las bacterias que existen en la rizósfera, en el rizoplano o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz, estimulando el crecimiento de la planta por la producción de fitohormonas, aumentando la resistencia de la planta a enfermedades o incrementando la movilización de los nutrientes del suelo. Para Picard y Bosco (2005), las e-PGPR representan las interacciones planta-microorganismo más frecuentes en las plantas sanas.

Las i-PGPR son aquellas bacterias que están dentro de las células de la raíz, generalmente en estructuras nodulares especializadas donde fijan nitrógeno. Estas i-PGPR son también conocidas como rhizobias, un nombre que deriva del género *Rhizobium* (Zakhia y de Lajudie, 2006) y referido a las bacterias que inducen nódulos en leguminosas y fijan nitrógeno atmosférico en simbiosis con ellas.

De cualquier modo, para las bacterias que muestran también esta habilidad y no pertenecen al género *Rhizobium*, se propuso el término legume-nodulating bacteria (LNB) (Zakhia y de Lajudie, 2006). No obstante, en el presente trabajo se mantiene el término PGPRs en un sentido general, tanto para designar a aquellas bacterias que incrementan el crecimiento y productividad de la planta, como para aquellas que controlan a algunos fitopatógenos, presentes en la rizósfera o fuera de ella.

### 1.3. Mecanismos de biocontrol

#### 1.3.a. Mecanismos directos

Son aquellos en los que el metabolito producido por la bacteria es capaz de estimular el crecimiento vegetal, y por lo tanto, ocurre independientemente del resto de la población microbiana edáfica (Kloepper., 1992), e incluso independientemente del soporte edáfico, es decir, no ejerce su efecto por la modificación del sustrato. De forma resumida los mecanismos de acción directa se muestran en la tabla 1.

Mecanismo	Efecto
Fijación de nitrógeno asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno
Producción de hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas)	Biomasa (parte aérea y radical) ramificación de raíces, floración
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical
Aumento de la permeabilidad de raíz	Biomasa y captación de nutrientes

**Tabla 1.** Mecanismos de acción directa de las PGPRs (Modificado de Chanway, 1997)

#### 1.3.a.I. Producción de sideróforos

El hierro es el micronutriente requerido en mayor cantidad para el crecimiento vegetal. Está involucrado en la síntesis de las clorofilas, y participa de un buen número de sistemas enzimáticos importantes para el metabolismo de las plantas. Su deficiencia se denomina clorosis férrica y se caracteriza, de forma visual, por un amarilleamiento intervenal de las hojas jóvenes. Como consecuencia de la clorosis férrica, las plantas se desarrollan de manera deficiente, con poco vigor y una baja producción.

Bajo condiciones limitadas de hierro, las bacterias liberan al medio compuestos quelantes de bajo peso molecular (entre 400 a 1000 Da) denominados sideróforos, los cuales tienen afinidad por el ión férrico, que es la forma predominante de dicho metal en la naturaleza. Como el ión férrico ( $Fe^{+3}$ ) es muy poco soluble (alrededor de  $10^{-18}$  M a pH 7,4), y por lo tanto no puede ser asimilado, la función de los sideróforos es unirse a él y transportarlo al interior celular, en donde se transformara en ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) y de esta forma se hará disponible para la bacteria (Neilands y Leong, 1986; Briat, 1992).

El beneficio que presenta para las plantas, es que estas moléculas de sideróforos se unen al ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) disponible en la rizósfera y como resultado evitan que los patógenos cercanos puedan proliferar a causa de la falta de hierro. La bacteria que originalmente sintetiza el sideróforo posee un receptor específico para el complejo hierro-sideróforo que se encuentra en el exterior de la membrana celular. A diferencia de los fitopatógenos microbianos, las plantas generalmente no se ven perjudicadas por la falta de hierro causada por las PGPR. La mayoría de ellas pueden crecer a concentraciones de hierro mucho más bajas, alrededor de 1000 veces menos que los microorganismos (O' Sullivan y O'Gara, 1992).

La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos depende de la planta, del fitopatógeno a eliminar, de la composición del suelo, de la bacteria PGPR y de la afinidad del sideróforo por el hierro (Glick, 1995).

Además, numerosas plantas son capaces de utilizar los complejos hierro-sideróforo provenientes de las bacterias como una forma de obtener hierro desde el suelo, si bien es el mecanismo de biocontrol ejercido por estas moléculas el de mayor importancia.

Casi todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas producen sideróforos, difiriendo en la eficiencia de producción. Las especies pertenecientes al grupo de *Pseudomonas fluorescens* producen sideróforos verdes-amarillentos, fluorescentes, solubles en agua, como la pioverdina, la que presenta alta afinidad con el  $\text{Fe}^{+3}$  y transporta este elemento al interior de las células. De esa manera, los microorganismos fijan  $\text{Fe}^{+3}$ , tornándolo menos disponible para aquellos incapaces de producir agentes similares de transporte de hierro o con una producción comparativamente menor (Buysens et al., 1996).

Diversos estudios han demostrado el rol del sideróforo pioverdina, producido por muchas especies de *Pseudomonas*, en el control de fitopatógenos como *Phytophthora spp.* y *Fusarium spp.*, comparando los efectos de la pioverdina purificada con quelantes de hierro sintéticos o a través del uso de mutantes deficientes en este sideróforo (Loper y Buyer, 1991; Duijff et al., 1993). Las especies del género *Pseudomonas* también producen otros sideróforos como la piocianina y su precursor, el ácido salicílico. La piocianina tiene una acción protectora en plantas de tomates contra *Phytophthora spp.* Sin embargo, los sideróforos no siempre están implicados en el control de enfermedades. La dinámica en la competición por el hierro en la rizósfera es muy compleja, por ejemplo, algunos sideróforos solo pueden ser utilizados por la bacteria que lo produjo, mientras que otras veces pueden ser utilizados por diferentes bacterias.

Distintos factores ambientales también pueden influir sobre la cantidad de sideróforos producidos. Se conoce además que la pioverdina y el ácido salicílico pueden actuar como elicitores para inducir resistencia sistémica contra fitopatógenos en algunas plantas (Métraux et al., 1990).

Se han realizado algunos estudios para comprobar si el efecto supresor es causado por la producción de sideróforos y/o antibióticos (Kloepper et al., 1980). Ellos demostraron en experimentos controlados, que la adición de hierro en forma de etileno-diamina tetracetato de  $\text{Fe}^{+3}$  (Fe-EDTA), inhibe la acción antagonista in vitro. Observaron también que el sideróforo pseudobactina purificado, de *Pseudomonas fluorescens* B-10, exhibió actividad bacteriostática contra *Erwinia carotovora*, lo cual no ocurrió con pseudobactina-férrico, sideróforo complejado con hierro.

### **1.3.a.II. Fijación del nitrógeno**

A partir de los años ochenta aumentó el uso de fertilizantes nitrogenados en los sistemas agrícolas. Paralelamente comenzó a plantearse el efecto perjudicial que el exceso de nitrato provoca en la salud humana y en el ambiente.

Es por ello que fue necesario reconsiderar la importancia de los microorganismos que logran un balance positivo del nitrógeno en el suelo a partir del proceso de fijación biológica, teniendo en cuenta que pueden aportar entre 139 y 170 millones de toneladas de nitrógeno a la tierra por año (Hernandez, 1998).

La Fijación Biológica del Nitrógeno, es un proceso por el cual las plantas se asocian con bacterias capaces de transformar el nitrógeno atmosférico en amonio, y de esta manera las plantas asimilan el nitrógeno fijado (Evans et al., 1991). La fijación del nitrógeno ocurre normalmente como respuesta a concentraciones de amoníaco bajas o limitantes.

La fijación del nitrógeno atmosférico depende de la enzima nitrogenasa. Esta es inhibida frente a concentraciones altas de oxígeno, y se encuentra en una variedad de microorganismos que incluyen diazótrofos de vida libre, como especies de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y simbióticas, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En estos últimos se evidencia la formación de un nuevo órgano que es el nódulo radical, sitio donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Atlas y Bartha, 2002).

Los resultados experimentales demuestran que el efecto de algunas cepas de *Azospirillum* sobre su planta hospedadora no es solamente vía fijación de nitrógeno, sino que este efecto puede ser debido a un incremento en la asimilación de nitrato. La habilidad natural para fijar nitrógeno atmosférico puede contribuir al nitrógeno de la planta unido a la actividad de la nitrato reductasa (Bashan y Levanony, 1990).

### **1.3.a.III. Solubilización de fosfatos**

Luego del nitrógeno, el fósforo (P), es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas a pesar de ser abundante en los suelos. Según Goldstein et al. (1993), el fósforo acumulado en suelos de uso agrícola, es suficiente para abastecer cultivos de máximos rendimientos por 100 años. Muchos suelos tienen deficiencias de P porque la concentración de P libre disponible para las plantas, incluso en suelos fértiles no es mayor a 10µM. Estos bajos niveles de P se deben a su alta reacción con el Ca, Fe y Al que causan su precipitación.

Debido a la relativa inmovilidad del fosfato y la concentración extremadamente baja de éste, disuelto en el suelo, numerosos aportes de fertilizantes fosforados son aplicados a los suelos por cultivar; esto lleva a una acumulación de grandes cantidades de fósforo total en el suelo, del cual el 20-80% está en forma orgánica (Richardson, 1994).

Algunos investigadores, han encontrado que diferentes microorganismos pueden solubilizar formas no disponibles de fósforo y convertirlas en asimilables por las plantas (Asea et al., 1988). Bacterias, actinomicetos y hongos pueden disolver in vitro fosfatos insolubles en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (Alexander, 1977). En la solubilización de los fosfatos hay formación de quelatos de calcio, hierro y aluminio con los ácidos orgánicos (láctico, glucólico, cítrico, maleico, y otros) producidos por el metabolismo microbiano (Sperber, 1958).

El aprovechamiento de este fósforo depende en su mayoría de la actividad microbiana. La inoculación de plantas con microorganismos solubilizadores de fosfato, frecuentemente

estimula el crecimiento vegetal, por incremento de la absorción de este nutriente (Chabot et al., 1993; Kucey et al., 1989). Los microorganismos de la rizósfera aumentan la disponibilidad del fósforo mediante la solubilización, que de otro modo no estaría disponible para las plantas. Las plantas asociadas a microorganismos muestran mayores tasas de captación de dicho elemento que si crecen en suelos estériles (Campbell y Rovira, 1985).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos pueden interactuar con las micorrizas arbusculares con efecto sinérgico, lo que permite un mejor aprovechamiento del fósforo del suelo por las plantas (Villegas y Fortín, 2001; Babana y Antoun, 2006).

Las bacterias de diferentes géneros, tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*, son capaces de solubilizar fosfato (Gyaneshwar et al., 2002).

Las bacterias utilizan dos mecanismos para solubilizar fosfato:

- 1- Solubilizando fosfato orgánico presente en el suelo por medio de enzimas fosfatasas que hidrolizan uniones fosfoesteres o fosfoanhidridos (proceso conocido como mineralización).
- 2- Solubilizando fosfatos inorgánicos con ácidos orgánicos, como el ácido glucónico, que resulta de la acidificación de las células microbianas y su entorno. Como consecuencia el fósforo inorgánico (Pi) puede ser liberado del fosfato mineral por la sustitución de  $\text{Ca}^{+2}$  por  $\text{H}^+$  (Rodríguez y Fraga, 1999).

La habilidad de solubilizar complejos Ca-P se atribuye a un descenso del pH debido a la liberación de ácidos orgánicos o protones al medio (Gyaneshwar et al., 1998). Los ácidos orgánicos pueden disolver directamente el fósforo mineral por un intercambio aniónico de  $\text{PO}_4\text{H}^{2-}$  o quelando iones Fe y Al asociados a fosfatos.

En las bacterias Gram-negativas, la manera más eficiente de solubilizar fósforo resulta de la oxidación extracelular de glucosa a ácido glucónico, llevada a cabo por la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) (Liu et al., 1992).

La habilidad de solubilizar fósforo depende de la fuente carbonada y nitrogenada del medio; usando amonio en lugar de nitrato, las bacterias liberan protones al medio para compensar el ingreso del amonio, provocando un descenso del pH extracelular. Además, los mecanismos de solubilización de fósforo se ven estimulados por la deficiencia de fósforo (Goldstein y Liu, 1987).

### **1.3.a.IV. Producción de fitohormonas**

El mecanismo de acción directo de las PGPRs por excelencia es la producción de fitohormonas (Brown, 1974; Tien et al., 1979). Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento, especialmente cuando está en el estado de plántula (Brown, 1974; Nieto y Frankenberger, 1989; Lebhun et al., 1994).

Las PGPR pueden afectar directamente el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, entre ellas se encuentran auxinas, citoquinas y giberelinas (lippmann et al., 1995). Estos compuestos incrementan el número de raíces laterales y de pelos radicales, aumentando notablemente la superficie de la raíz, y en consecuencia, favoreciendo una mayor absorción de nutrientes (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

La auxina deriva del metabolismo del triptófano y su efecto depende de la concentración. Las auxinas sintetizadas por la planta y el microorganismo difieren solamente en el camino biosintético, dependiendo de la planta y del microorganismo. Más del 80% de las bacterias de la rizósfera son capaces de producir auxina. La razón por la que muchas bacterias de la rizósfera son capaces de producir auxina es aún desconocida.

Algunos autores sugieren que estas bacterias tienen un metabolismo relacionado al triptófano y que la biosíntesis de auxina es una detoxificación alternativa (Bar y Okon, 1992). Otros autores proponen que la auxina tiene alguna función celular, porque una relación evidente se ha observado entre la auxina y los niveles de AMP-3',5' cíclico (AMPC), el cual regula muchos procesos metabólicos (Katsy, 1997). Es que la síntesis de auxina promueve el crecimiento vegetal; por lo tanto, hay una mayor exudación y de esta manera más nutrientes disponibles para las rizobacterias. Esta hipótesis explica una asociación benéfica entre los microorganismos rizosféricos y la planta. La planta controla el flujo de energía del sistema, ya que es el productor primario y contribuye con la mayor parte de materia orgánica a la rizósfera. La auxina principalmente influye sobre las raíces (Salisbury, 1994). La auxina liberada por las rizobacterias afecta principalmente al sistema radical, aumentando el tamaño y el peso, el número y el área superficial en contacto con el suelo. Todos estos cambios contribuyen a incrementar la habilidad del suelo para intercambiar nutrientes, por lo tanto mejoran la nutrición vegetal y la capacidad de desarrollo (Gutiérrez Mañero et al., 1996). Otro importante resultado de la inoculación con bacterias productoras de auxina es la formación de raíces adventicias, las cuales derivan del sistema radical. La auxina induce al tejido radical para diferenciarse como tejido de la raíz. La formación de raíces laterales y adventicias son estimuladas por concentraciones elevadas de ácido indol acético ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$ M), mientras que la longitud de las raíces primarias es estimulada por niveles bajos ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M) e inhibida por concentraciones altas de esta fitohormona (Alvarez et al., 1989; Pilet y Saugy, 1987; Meuwley y Pilet, 1991; Peck y Kende, 1995). Por otro lado, concentraciones mayores a  $10^{-6}$  M de AIA, ejercen un efecto deletéreo en las plantas, ya que el mismo induce la vía de síntesis del etileno (Peck y Kende, 1995).

La auxina es una de las principales hormonas producidas por *Azospirillum*, en el cual se postuló que existen tres vías biosintéticas para la producción de ácido indol acético (AIA), dos de ellas dependientes del triptófano, identificadas como la vía 3- indol- acetamida (IAM) y la del ácido 3- indol- pirúvico (IpyA), y una tercera vía hasta el momento no identificada, que no utiliza triptófano como precursor.

Hasta el momento, *Azospirillum* es la única bacteria para la cual se ha informado una vía de producción de ácido indol acético (AIA) no dependiente de triptófano (Bar y Okon, 1995).

La producción de hormonas tales como las giberelinas o las citoquininas, no está aun bien documentada debido al pequeño número de bacterias capaces de producir estos reguladores del crecimiento de la planta (Salisbury, 1994; Timmusk et al., 1999). Hay poca información acerca de microorganismos que producen giberelinas, si bien se conoce que existen bacterias simbióticas dentro de los nódulos en plantas leguminosas que fijan

nitrógeno (rizobias) capaces de producir giberelinas, auxinas y citoquininas en bajas concentraciones cuando la planta está formando el nódulo y una alta velocidad de duplicación celular (Atzorn et al., 1988). De cualquier modo, la producción de giberelinas por PGPR es poco común, solamente para dos cepas está documentado que las producen, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutiérrez Mañero et al., 2001). Estas bacterias se aislaron de la rizósfera de *Alnus glutinosa* y han mostrado una capacidad para producir grandes cantidades de giberelinas GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>20</sub> in vitro. Estos tipos de hormonas son el más amplio grupo de reguladores en vegetales, incluyendo más de cien moléculas diferentes con varios grados de actividad biológica. La razón por la que producen efecto las giberelinas, es que esta hormona puede ser translocada desde la raíz hacia la parte aérea de la planta. Los efectos en la parte aérea son notables, y más aun cuando la bacteria también produce auxina que estimula el sistema radical, aumentando el suministro de nutrientes para descender lo producido en la parte aérea.

La aplicación exógena de las giberelinas tiene una amplia variedad de respuestas en las plantas, y siempre actúan en concentraciones muy bajas. El más llamativo es la inducción de la elongación del tallo y floración en variedades genéticamente enanas (Phinney, 1956), y en las plantas de día largo (Lang, 1956), evitando también la necesidad de bajas temperaturas requeridas en este proceso. El mecanismo por el cual estimulan el crecimiento del tallo es aumentando la elongación y la división celular. La aplicación de giberelinas modifica sustancialmente los procesos reproductivos de los vegetales (Pharis y King, 1985).

Las citoquininas, son hormonas naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos; las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutos jóvenes en desarrollo, y ambos sufren una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas, puede facilitar su habilidad de actuar como fuente demandante de nutrientes (Mok y Mok, 2001). Sus efectos en plantas, incluyen la estimulación de la germinación de semillas, la estimulación de la formación de frutos sin semillas, la ruptura del letargo de semillas, la inducción de la formación de brotes, la mejora de la floración, la alteración en el crecimiento de frutos y la ruptura de la dominancia apical (Raisman, 2006).

Está comprobado que las citoquininas inducen la actividad de las amilasas y de las proteasas, y la síntesis de tiamina y de auxina. La citoquinina es poco móvil aplicada en forma exógena, si se aplica en la yema actúa en el lugar de la aplicación. La citoquinina endógena parece tener transporte polar basipétalo. Un efecto es producir mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, por lo que se le llama hormona de la división celular. El otro efecto es el retardo del envejecimiento o senescencia de los órganos y los fenómenos a que esta da lugar, como son el amarillamiento y la caída de las hojas (Somers et al., 2005).

El etileno es otro regulador del crecimiento cuyos niveles cambian las PGPRs, consecuentemente afectando los procesos fisiológicos en la planta. El etileno está fundamentalmente relacionado al desarrollo y al sistema de defensa de la planta y está también implicado a la respuesta por stress; y a procesos no relacionados al stress, como la maduración, el desarrollo de la raíz y la germinación de las semillas.

Si bien el etileno es importante como un regulador del crecimiento para un desarrollo normal de la planta, hay ejemplos en los cuales el etileno no parece tener un rol significativo; por ejemplo plantas mutantes que tienen bloqueada la síntesis de etileno pueden sobrevivir. La aplicación de inhibidores de la síntesis de etileno en varias especies

de plantas, las hace más sensible al ataque por patógenos y stress abiótico (Knoester et al., 1998).

En el siglo diecinueve, el investigador ruso Neljubov dedujo el efecto del etileno en plantas utilizando diferentes gases de la combustión (Abeles et al., 1992). Esto es a menudo preferible para retardar o reducir la síntesis de etileno, retrasando la maduración y así extendiendo la vida de la fruta. Mientras los niveles de etileno decrecen, el sistema radical aumenta su desarrollo, con los beneficios ya mencionados. Un interesante método para mejorar ciertos procesos fisiológicos de la planta podría ser utilizando PGPR capaces de reducir los niveles de etileno en la planta.

La biosíntesis de etileno comienza en el ciclo de la metionina; una molécula de ácido carboxílico-aminociclopropano (ACC) se forma por cada vuelta del ciclo. La enzima responsable de la producción del ACC es la ACC sintetasa, regulada por un gran número de señales tales como las de auxina, etileno y factores medioambientales. Esta enzima se ha purificado y clonado en muchas plantas. El ACC es el sustrato para la ACC oxidasa, también llamada enzima formadora de etileno (EFE), la cual produce etileno consumiendo oxígeno. Esta enzima ha sido también clonada para numerosas especies y pertenece a una familia multigénica que produce diferentes tipos de ACC oxidasa dependiendo del órgano de la planta y del estado de desarrollo.

El modelo propuesto para la regulación de etileno en la planta por PGPR se basa en la habilidad de algunas bacterias para degradar el ACC, el precursor directo del etileno (Glick et al., 1998). Parece que aquellas cepas capaces de crecer con ACC como única fuente de nitrógeno tienen la enzima ACC desaminasa (Glick et al., 1995) y suelen ser promotoras del crecimiento. Se ha demostrado, que *Pseudomonas putida* es capaz de sintetizar la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) (Jacobson, 1993; Jacobson et al., 1994). Esta enzima hidroliza el ACC, a nivel rizosférico, provocando una disminución en la concentración de ACC en la planta, que se traduce en una elongación radical.

Además el etileno estimula la germinación, rompe la dormición de las semillas (Esashi, 1991) y actúa sinérgicamente con otros microorganismos como las bacterias fijadoras de nitrógeno (De-Freitas et al., 1993).

Se ha demostrado que géneros como *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Azoarcus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Gluconeobacter diazotrophicus*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Azotobacter spp.*, *Azorhizophilus* y *Pseudomonas spp.*, son capaces de usar ACC como única fuente de nitrógeno para crecer. Un ejemplo de una bacteria que contiene ACC desaminasa es la PGPR *Pseudomonas putida* GR12-2 (Lifshitz et al., 1987) que estimula el crecimiento de la raíz en diferentes plantas como canela, lechuga y tomate bajo condiciones gnotobióticas (Glick et al., 1994; Grichko y Glick, 2001).

Experimentos con PGPR que expresan actividad ACC desaminasa demuestran que también pueden disminuir los efectos deletéreos en diferentes condiciones ambientales tales como metales pesados e inundación sobre la planta, probablemente por reducir la concentración de etileno en la planta estresada (Glick et al., 1997; Burd et al., 1998; Holguin y Glick, 2000). Curiosamente, todavía no se ha encontrado ningún microorganismo que sea capaz de producir etileno a partir de ACC. Este modelo ha sido ampliamente confirmado usando mutantes (Glick et al., 1994; Glick et al., 1998).

### **1.3.b. Mecanismos indirectos**

El mecanismo de acción indirecta es el punto de interés que poseen las PGPR cuando nos referimos al biocontrol. Estas rizobacterias ejercen control biológico a través de varios mecanismos. En general, la protección bacteriana contra los microorganismos fitopatógenos del suelo depende de dos hechos: la capacidad de colonización del agente de biocontrol y la producción de sideróforos o antibióticos que supriman el crecimiento de estos patógenos (Kloepper et al., 1988).

#### **1.3.b.I. Producción de sustancias movilizadoras de nutrientes**

Corresponden a ácidos orgánicos (Yosikawa et al., 1993; Jones, 1998) o a aminoácidos (Jones et al., 1994), liberados por las bacterias al medio, que son capaces de movilizar el fósforo, el hierro y/o el aluminio.

**1.3.b.II. Antibiosis** (Burr y Caesar, 1984; Schroth y Hancock, 1981; Gaskins et al., 1985; Davison, 1988).

Muchas bacterias, y en especial las pertenecientes los género *Pseudomonas* y *Bacillus*, son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos, sintetizando moléculas antifúngicas como pirrolnitrina, pioluteorina, tropolona, etc (Howell y Stipanovic, 1979; Howell y Stipanovic, 1980; Lindbergh, 1981).

La antibiosis es definida como una interacción entre organismos o un metabolito, generalmente de bajo peso molecular, producido por uno de ellos (Schroth y Hancock, 1981; Fravel, 1988). En general, esta sustancia suele ser un producto del metabolismo secundario. Las bacterias del género *Pseudomonas* son las que más se destacan por la diversidad de antibióticos que producen (Dowling y O'Gara, 1994).

Los microorganismos producen un amplio rango de antibióticos bajo diferentes condiciones fisiológicas. El 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG), fenazinas, piocianinas, pioluteorina, pirrolnitrina y tropolona se han caracterizado en muchas bacterias, y en las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*.

El 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), es una sustancia fenólica que se origina probablemente por la vía del acetato con el monoacetilfloroglucinol (MAPG) como producto intermediario (Shanahan et al., 1992; Bender et al., 1999). El DAPG presenta actividad antibiótica de amplio espectro, actuando como antifúngico, antibacteriano, antivírico y antihelmíntico (Keel et al., 1992; Maurhofer et al., 1992; Banger y Thomashow, 1996). Se han descrito diversas *Pseudomonas* del grupo fluorescentes que producen DAPG. Estas cepas tienen en común la habilidad de suprimir una o más enfermedades causadas por patógenos del suelo (Duffy y Défago, 1999; McSpadden et al., 2000).

Las fenazinas son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógenos, y son sustancias que se producen por la vía del ácido shikímico (Hollstein y Marshall, 1972).

Entre las cepas productoras, implicadas en procesos de biocontrol, están *Pseudomonas fluorescens* 2-79 y *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 (Thomashow y Weller, 1988; Thomashow et al., 1990; Mazzola et al., 1992; Pierson III y Pierson, 1996).

La pirrolnitrina es sintetizada por diversas especies de *Pseudomonas spp* a partir del triptófano (Van Pée, 1996; Hammer et al, 1997). Es una sustancia con actividad antifúngica de amplio espectro (Howell y Stipanovic, 1979).

Shanahan et al. (1992) reportaron que un transposón (Tn5) produce cepas mutantes DAPG- de *Pseudomonas fluorescent* que han perdido la capacidad de proteger las raíces de la remolacha azucarera contra la infección por *Pythium spp*. Mazzola et al. (1992), informan que cepas Q2.87 productoras de DAPG suprimen la enfermedad causada por tres aislados de *Gaeamannomyces graminis var. Tritici* sensibles al DAPG.

**1.3.b.III. Competencia en la rizósfera** (Kloepper et al., 1988; O'Sullivan y O'Gara, 1992; Devliegher et al., 1995).

Un aspecto muy importante que hace a la competitividad de un agente biocontrolador es su capacidad de persistir y proliferar. Sin embargo, esto es muy difícil de predecir porque el comportamiento de una PGPR en el ambiente va a estar influenciado por numerosos factores como son: la composición del suelo, la temperatura, la presencia de plásmidos recombinantes, la microflora nativa, etc.

Así, las bacterias resistentes a metales pesados o las capaces de utilizar compuestos xenobióticos, tales como herbicidas y pesticidas, o las resistentes a bajas temperaturas, van a tener mayor ventaja comparada a otros microorganismos en aquellos suelos que presenten dichas condiciones (Glick y Bashan, 1997).

**1.3.b.IV. Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos**

Cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas solanacearum* son capaces de degradar el ácido fusárico, agente causante del marchitamiento por infección de *Fusarium* (Toyoda y Utsumi, 1991).

**1.3.b.V. Síntesis de enzimas capaces de hidrolizar la pared celular de los hongos**

Muchas plantas responden al ataque de patógenos sintetizando proteínas que pueden hidrolizar las paredes celulares de algunos hongos. De manera similar ciertas PGPR producen enzimas, incluidas quitinasas,  $\beta$  1,3-glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden lisar células fúngicas (Chet e Inbar, 1994).

Lim et al., (1991); describen que cepas de *Pseudomonas stutzeri* productora de quitinasa y laminarinasas extracelulares, eran capaces de digerir y lisar micelio de *Fusarium solani* y, de esta manera, prevenir la pérdida de cultivos debido a la podredumbre de la raíz. *Pseudomonas cepacia* libera  $\beta$  1-3 glucanasa, inhibiendo el desarrollo de *Phytophthora ultimum* y de *Rhizoctonia solani* (Lim et al., 1991).

Se han aislado biovariedades de *Pseudomonas fluorescens* de la rizósfera de plantas de remolacha azucarera, que mostraron actividad quitinasa, que fue responsable del antagonismo hacia *Rhizotonia solani* (Nielsen et al., 1998). Se ha observado que algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* colonizadoras de la raíz de plantas de arroz, indujeron resistencia sistémica en un cultivar IR 50 de arroz, susceptible a una enfermedad causada por *Rhizotonia solani*. La inoculación del patógeno en las vainas demostró un incremento en la actividad quitinasa en las plantas tratadas con *Pseudomonas*, mientras que en el control no tratado, el incremento luego de la inoculación del patógeno fue menor. Los

autores concluyeron que la inducción de quitinasa fue la responsable de la supresión de la enfermedad (Radjacommare et al., 2003).

### **1.3.b.VI. Bacteriocinas**

Las bacteriocinas constituyen la clase más diversa y abundante de agentes antimicrobianos. Tradicionalmente, han sido definidas como compuestos proteicos sintetizados por bacterias que tienen un espectro de acción limitado. Estas sustancias son capaces de matar a las bacterias competidoras mientras que no perjudican a la célula productora, o bien causan un daño menor, debido a que existen en ella mecanismos inmunes específicos y/o mecanismos postranscripcionales (Hancock y Chapple, 1999).

### **1.3.b.VII. Ácido cianhídrico**

La producción de ácido cianhídrico (HCN), como un mecanismo de control de patógenos queda limitado a la rizósfera donde las condiciones ambientales son más estables, ya que al ser una sustancia volátil no perduraría en la filósfera. Aunque se ha demostrado, que es rápidamente inactivado por componentes del suelo o metabolizado por microorganismos (Castric et al., 1981).

Voisard et al., (1989), sugieren que este metabolito, el ácido cianhídrico (HCN), puede actuar en el control biológico de dos maneras distintas: 1) por antagonismo directo con el patógeno; esto estaría limitado a la superficie de la raíz que es su hábitat y 2) que alternativamente el ácido cianhídrico podría actuar induciendo un mecanismo de defensa en la planta, se ha demostrado que la producción de cianida por las bacterias depende de la disponibilidad del ion férrico ( $Fe^{+3}$ ), y que puede por lo tanto influir en la competencia por el hierro.

El principal mecanismo de acción del ácido cianhídrico es la inhibición directa sobre los hongos (Blumer y Hass, 2000), en cuyo caso, el efecto de la bacteria podría compararse al rol del ácido cianhídrico en los mecanismos de defensa de las plantas. Su función es inhibir la citocromo C oxidasa terminal de la cadena respiratoria y unirse a metaloenzimas, los efectos inmediatos son una reducción de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos. Es importante destacar que la inhibición de la respiración mediante cianidas ocurre a concentraciones de  $10^{-5}$ -  $10^{-6}$  mol  $m^{-3}$  de cianida y para esto se requeriría altos niveles de células bacterianas ( $10^8$ - $10^9$  por gramo de peso húmedo de raíz) en la superficie de la raíz, tales condiciones no son habituales en la rizósfera, pero pueden establecerse cuando hay abundante fuente carbonada disponible para el crecimiento bacteriano (Schippers et al., 1987).

Se ha demostrado que la propiedad de algunas *Pseudomonas spp.* de sintetizar ácido cianhídrico (HCN), al cual ellas mismas son resistentes, está vinculada a la capacidad de estas cepas de inhibir ciertos hongos fitopatógenos, como *Thielaviopsis basicola* en el tabaco (Voisard et al., 1989; Laille et al., 1998) o *Septoria tritici* y *Puccinia recondita f. sp. Tritici* en el trigo (Weller, 1988).

Aproximadamente el 12% de los aislados de *Pseudomonas spp.* fluorescentes, de rizósfera de *Lotus corniculatus*, ensayados in vitro contra los hongos fitopatógenos *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, inhibieron a ambos; dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* producían ácido cianhídrico y sideróforos, la adición de hierro no afectó la actividad

antagónica, sugiriendo como principal mecanismo de acción la producción de ácido cianhídrico (Bagnasco et al., 1998).

La inserción de los genes hcnABC de la cepa CHAO de *Pseudomonas fluorescens* aumenta la producción de ácido cianhídrico en *Pseudomonas putida BK661* y la supresión de los síntomas causados por patógenos foliares aumentan también significativamente. Esta acción indica que el ácido cianhídrico sería el responsable de la inhibición de los patógenos en estos sistemas foliares (Flaishman et al., 1996).

Sin embargo, además de su rol protector, se ha informado un efecto perjudicial del ácido cianhídrico sobre diversas plantas y parece ser un factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Gallagher y Manoil, 2001). En respuesta a esto se han investigado cepas perjudiciales productoras de ácido cianhídrico para el biocontrol de malezas (Kremer y Souissi, 2001).

### **1.3.b.VIII. Resistencia sistémica inducida**

La existencia de microorganismos capaces de prevenir enfermedades en plantas por sistemas tales como la exclusión de nichos o por la producción de sustancias inhibitorias del patógeno; cuando se requiere un contacto entre el microorganismo patógeno y el protector, el proceso se conoce como biocontrol (Bloemberg y Lugtenberg, 2001; Compant et al., 2005).

A principio de la década del '90, Van Peer et al., 1991 y Wei et al., 1991, hacen un importante descubrimiento con respecto a la productividad y los mecanismos de defensa de la planta. Ciertas bacterias no patógenas eran capaces de evitar el ataque por un patógeno antes de que el mismo llegara a la planta. La diferencia con el biocontrol es que la bacteria benéfica no interactúa físicamente con el patógeno, disparando una respuesta en la planta, la cual es efectiva contra el subsiguiente ataque de un patógeno. Esta respuesta es sistémica; es que la bacteria interactúa con la planta en un área restringida, pero la respuesta se extiende por toda la planta. Esta respuesta está mediada por conversiones metabólicas que no son algunas veces aparentes. El biopriming ocurre cuando la planta está sistemáticamente protegida por una bacteria no patógena contra un subsiguiente ataque del patógeno, pero el efecto no es detectado hasta que el patógeno desafía (Conrath et al., 2002). Para que la protección sea efectiva, es necesario un intervalo de contacto entre la PGPR y la planta y que el ataque del patógeno ordene la expresión de los genes involucrados en los mecanismos de defensa.

La resistencia inducida puede diferenciarse en dos tipos: la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) que es la respuesta a la agresión causada por patógenos y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), que es la respuesta que resulta de la interacción con bacterias no patógenas. Entre éstas se destacan algunas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Van Loon et al., 1998). El SAR se caracteriza por la acumulación de ácido salicílico y proteínas relacionadas con la patogénesis, destacándose glucanasas y quitinasas que permiten aumentar la resistencia de la planta (Van Loon et al., 1998).

Este mecanismo se descubrió en la planta *Arabidopsis thaliana*, pero ahora se ha extendido a muchas especies vegetales. PGPR específicas tales como cepas de *Pseudomonas* inducen resistencia sistémica en clavel, rábano, tabaco y *Arabidopsis* (Van Loon y Bakker, 2005). Este hallazgo es fundamental porque propone una respuesta inmune en la planta, planteando una posibilidad de vacunación para la planta.

La adquisición de la resistencia por la planta para un posterior ataque del patógeno, causa pequeños daños o necrosis localizada y resistencia a futuros ataques patogénicos (Ryals et al., 1996).

Durante el ataque del patógeno, especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen en áreas de necrosis, causan la muerte del tejido y una obstrucción en la expansión del patógeno.

Las respuestas defensivas SAR e ISR se inducen por algunas moléculas, llamadas elicitores, presentes o producidos en el patógeno o en la PGPR, respectivamente. Los elicitores bióticos se clasifican dentro de distintos grupos: proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y compuestos volátiles (Radman et al., 2003).

En *A. thaliana*, las respuestas SAR e ISR se regulan por caminos diferentes. La primera respuesta, SAR, se asocia con un incremento en el nivel del ácido salicílico y la translocación de una proteína tipo anquirina llamada NPR1, localizada en el núcleo, la cual induce la transcripción de los genes relacionados al patógeno. Estos genes codifican la proteína PR y son responsable de la respuesta sistémica en la planta (Lawton et al., 1996; Uknes et al., 1993).

Algunas de las PR tales como quitinasa (PR3) (Legrand et al., 1987), y  $\beta$ -1,3- glucanasa (PR2) (Kauffman et al., 1987) fueron caracterizadas con actividad antifúngica potencial. Estas proteínas degradan fragmentos de quitina y glucano de la pared celular de los hongos liberando oligómeros de quitina y glucano, los cuales actúan como desencadenantes, y a su vez provocan mecanismos de defensa en la planta. Luego, si estos mecanismos de defensa son desencadenados por un estímulo anterior a la infección por un patógeno de la planta, la enfermedad puede ser reducida.

La acción biocontroladora puede ser ejercida por mecanismos múltiples. Por ejemplo se ha demostrado que *Serratia plymuthica* posee actividad antifúngica contra *Botrytis cinérea* y *Sclerotinia*, causantes de enfermedades. Kamensky et al., (2003), encontraron que la bacteria 17ran negativa *Serratia plymuthica*, suprime un gran número de hongos patogénicos in vitro. La bacteria posee actividad quitinolítica y proteolítica, produce el antibiótico pirrolnitrina, sideróforos y secreta la hormona de crecimiento, el ácido indol acético. En la respuesta ISR, los niveles de ácido salicílico no se alteran, pero son mediados por dos reguladores del crecimiento, el etileno y el ácido jasmónico, los cuales actúan como señales transductoras y no como hormonas de stress. En la ISR, la proteína NPR1 también se desarrolla, pero aquí se induce la expresión de otra proteína diferente de la PR (Conrath et al., 2002).

La respuesta originada del SAR y del ISR inducen protección para la planta contra el espectro de diferentes patógenos, pero hay un espectro que desarrolla. La habilidad de una PGPR para inducir resistencia sistémica depende de una respuesta altamente específica sobre el sistema planta, bacteria benéfica y patógena. Además de la respuesta SAR e ISR, pueden coexistir en la misma planta y al mismo tiempo (Van Wees et al., 2000). Así, el uso de PGPR o PGPR mixtas que son capaces de disparar ambas respuestas al mismo tiempo, podrían resultar en un importante avance en el desarrollo de sistemas de defensa para plagas.

### 1.4. Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos

#### 1.4.a. Síndrome de la muerte repentina

El Síndrome de la Muerte Repentina (SMR) es una enfermedad de la soja descrita por primera vez en Arkansas (EE.UU) en 1971. A nivel mundial su descripción es todavía restringida. En Argentina fue detectada por primera vez en cultivos del área de Pergamino (Bs. As), durante la campaña 1991/92 (Ivancovich et al., 1992) y en la región del Noroeste (Salta y Tucumán), durante el ciclo 1992/93.

Es una enfermedad causada por *Fusarium solani*, produce severos daños, dependiendo del cultivar y del momento de infección. Las plantas normales y vigorosas, al ser infectadas se tornan amarillentas y mueren en forma rápida (de 10 a 20 días después de la aparición de los síntomas). La enfermedad ocasiona podredumbre radical, aunque se manifiesta a través de síntomas foliares, que pueden aparecer desde el final del período de floración en adelante y son causados por una toxina que produce el hongo. En un primer momento aparecen manchas cloróticas entre las nervaduras, que luego derivan en una clorosis internerval, quedando las hojas de color marrón, a excepción de las nervaduras, que permanecen verdes. Se observa una coloración grisasea de los tejidos internos del tallo, aunque la médula permanece blanca. En las raíces se observa deterioro de los nódulos fijadores de nitrógeno; el sistema radical secundario se destruye.

Aunque los síntomas pueden aparecer en estadios vegetativos tempranos, es común observarlos desde la floración hasta el llenado de vainas.

Entre los factores que predisponen al desarrollo de esta enfermedad se mencionan las condiciones ambientales, la fecha de siembra, el cultivar utilizado y su grupo de madurez y el estado de crecimiento del cultivo (Rupe, 1995).

El agente etiológico hasta el año 2003 se conocía como *Fusarium solani f. sp. glycines* (Scandiani et al., 2003). Recientes estudios morfológicos y moleculares han permitido determinar al menos 4 especies responsables de producir síntomas de la enfermedad, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium virguliforme* y dos especies más en estudio, encontradas en Brasil (Aoki et al., 2004). En Argentina se ha determinado la presencia de *Fusarium tucumaniae* (Aoki et al., 2003; Scandiani et al., 2004) y *Fusarium virguliforme* (Scandiani et al., 2004). Estas especies producen pigmentos azules a verdes y abundantes macroconidios en medio de cultivo agar papa dextrosa al 2% (Scandiani et al., 2003). La principal diferencia morfológica entre ambas especies está dada en los macroconidios con 4 tabiques. Los de *F. tucumaniae* son más delgados y largos que los de *F. virguliforme* y éste produce otro tipo de conidios con forma de coma (Scandiani et al., 2004).

Entre las medidas de control se menciona el uso de variedades de buen comportamiento, lotes con buen drenaje. En los cultivares de ciclo corto que escapan a las condiciones de alta humedad del suelo en los períodos reproductivos, se observa menos ataque. Se dispone de datos sobre la estimación de la enfermedad que destacan a algunas variedades con buen comportamiento, entre ellas se encuentran A-5153, NK 642, A6401 RG, RA 702 y RA 626. Las rotaciones y la elección de los cultivares constituyen las alternativas de manejo de la enfermedad actuales, siendo el control biológico una estrategia potencialmente interesante que requiere la continuidad y profundización de su estudio (Scandiani et al., 2004).

### **1.4.b. Podredumbre carbonosa del tallo**

Está presente en todas las áreas sojeras del mundo; en países tropicales, en donde la enfermedad provoca el tizón de las plántulas emergentes, las pérdidas de plantas pueden llegar al 77%. Es una enfermedad principalmente ocasionada en plantas adultas, se observan hojas que se tornan amarillas, se marchitan y permanecen adheridas al tallo, que presenta en su parte inferior una coloración marrón clara, al igual que la raíz principal. Un síntoma muy característico es que se extrae muy fácilmente la epidermis de las raíces y la base del tallo, cuyos tejidos presentan una típica coloración grisácea, por los abundantes microesclerocios oscuros que se forman.

La infección en las plántulas se presenta con lesiones marrón rojizas sobre el tallo, a nivel del suelo. Si las condiciones ambientales se tornan cálidas y secas, el color vira al marrón oscuro o negro, pudiendo la plántula llegar a morir. En climas fríos la infección se hace latente.

El agente causal, *Macrophomina phaseolina*, produce microesclerocios negros que sobreviven en los restos de cultivo y en el suelo seco por muchos años, pero en suelo húmedo no resiste más de 7 u 8 semanas. Altas temperaturas (28-35 °C) y baja humedad edáfica son condiciones predisponentes al ataque por este organismo. Este es el caso de la aparición de *M. phaseolina* en las zonas productoras de soja de la provincia de Salta, Tucumán y Buenos Aires durante las últimas campañas (2003/04 y 2004/05). Este mismo problema también se evidenció en las campañas 2000/01 en la región Noreste de nuestro país, lo que motivó la investigación y búsqueda de soluciones a esta problemática fitosanitaria (Cabrera et al., 2001).

El hongo *M. phaseolina* suele ser considerado un patógeno secundario, pues los síntomas son observados hacia finales del ciclo de los cultivos en la mayoría de los casos, sin embargo, actualmente se sabe que la enfermedad puede aparecer en cualquier estado fenológico de la planta (Machado, 1987). Mayek Pérez et al. (2001), observaron infecciones iniciales en semillas, las que permanecieron latentes hasta que las plantas de soja alcanzaron estadios avanzados de crecimiento, como R5, R6 y R7. Los síntomas típicos muestran lesiones negras a grises en tallos, pérdida de folíolos, reducción del vigor y finalmente daños y pérdidas en la producción. Diversos autores han observado una estrecha relación entre las condiciones de sequía con altas temperaturas, imperantes en regiones con climas tropicales y subtropicales y la incidencia de la enfermedad (Almeida et al., 2003; Machado, 1987; Smith et al., 1997).

### **1.4.c. Podredumbre de la mazorca del maíz**

*Fusarium verticillioides* es el principal agente causal de la podredumbre de la mazorca en el cultivo de maíz. El hongo penetra mayormente por los estigmas o heridas de las mazorcas, dañando los granos y contaminándolos con micotoxinas. Estas sustancias son perjudiciales para la salud tanto humana como animal, destacándose por sus efectos y niveles de producción las fumonisinias B1 y B2. En este contexto, la presencia de *F. verticillioides* y sus toxinas en los granos es un problema de primer orden para la industria maicera mundial.

Ya que en las infecciones vía estigmas, ellos son los primeros tejidos con el cual el patógeno interacciona con el hospedante, es razonable pensar en materiales resistentes, ya que la barrera inicial a la infección estaría en estos tejidos.

### 1.4.d. Fusariosis de la espiga del trigo

El principal agente etiológico de la enfermedad a escala mundial es *Fusarium graminearum*. Durante muchos años fue considerada una enfermedad de importancia secundaria. Sin embargo, debido al aumento de su frecuencia de aparición y severidad, se ha convertido en una de las principales enfermedades del trigo. La fusariosis de la espiga es una enfermedad difundida en áreas productoras de trigo del mundo donde los estados de espigazón, floración e inicios de llenado del grano coinciden con período húmedo y templado-cálido. En los últimos 20 años y especialmente en la década pasada, se incrementó la frecuencia de epidemias de fusariosis de la espiga en algunas áreas de Argentina, así como en los Estados Unidos, Canadá, países del centro-este de Europa, China y Japón. Esto ha sido asociado a posibles cambios climáticos, pero más frecuentemente a la adopción de sistemas de labranza conservacionistas, como la siembra directa, y a la difusión del cultivo de maíz. Su presencia ocurre principalmente en regiones de clima húmedo y de altas temperaturas, coincidiendo con los estadíos de floración. Las epidemias generalmente están asociadas a períodos de mojado de la espiga prolongados, mayor a las 72 horas, durante la antesis, extendiéndose hasta la formación del grano lechoso-pastoso.

Por infectar la planta a través de las anteras, es considerada una enfermedad de infección floral. Los síntomas son fácilmente diagnosticados mediante la observación del blanqueamiento de espigas y espiguillas, y por la formación de una masa rosada salmón (macroconidios) sobre las estructuras florales. Los daños causados por la enfermedad se manifiestan a través de la reducción del rendimiento, disminución del peso hectolítrico, del tenor proteico, reducción del poder germinativo y del vigor de las semillas, y por la presencia de micotoxinas que son nocivas para el hombre y los animales. De las enfermedades de los cereales de invierno, la fusariosis es la que presenta las mayores dificultades para su control, por lo que deriva en grandes pérdidas económicas, ya que provoca la disminución de los precios en el trigo y disminuye notablemente la calidad panadera de las harinas. Las pérdidas de rendimiento producidas por esta enfermedad pueden llegar al 50% en condiciones de epidemias severas y variedades muy susceptibles. Con epidemias moderadas, pueden esperarse pérdidas entre 10% y 20%. A esto debe sumarse la contaminación por micotoxinas que limita la utilización del producto por su toxicidad en animales y el hombre. Los primeros síntomas son pequeñas áreas pardas y húmedas en las glumas, que rápidamente se decoloran tomando el color atizonado característico, similar a una madurez prematura. Según la resistencia de la variedad y las condiciones del ambiente, el atizonamiento puede quedar limitado a la espiguilla infectada, afectar varias de ellas o toda la espiga. En infecciones severas y en variedades susceptibles, el pedúnculo puede tomar una coloración marrón. Puede producir aborto de las flores, granos chuzos en diverso grado, cubiertos de micelio rosa o blanquecino y aún granos con tamaño y peso similar a los normales, con una leve decoloración en el pericarpio. En los granos fusariosos, el patógeno destruye los gránulos de almidón, proteínas de reserva y paredes celulares, resultando un producto de baja calidad. Aunque el micelio no invade el embrión, excepto en granos muy afectados, la semilla puede resultar con germinación reducida y de escaso vigor. La infección es típicamente floral y ocurre cuando las ascosporas dispersadas por el viento se depositan en las anteras extruídas, que es la principal vía de penetración. El hongo coloniza saprofiticamente los tejidos de las anteras y alcanza rápidamente el ovario o el grano en formación, estimulado por la presencia de dos

substancias cuaternarias, betaína y colina, que favorecen el crecimiento del micelio. En tiempo seco y cálido, las anteras se desprenden rápidamente y las flores escapan a la infección. En ciertas variedades y condiciones de ambiente, las anteras tienden a quedar retenidas entre las glumelas, hecho que incrementa las posibilidades de infección y extiende el período de vulnerabilidad hasta inicios de grano pastoso. Los granos infectados con suficiente tamaño y peso pueden sobrepasar los sistemas de clasificación de semilla. Sembrados en ciertas condiciones de ambiente, fundamentalmente en suelos secos y cálidos, pueden desarrollar la enfermedad conocida como 'tizón de la plántula' que produce debilitamiento o muerte de las mismas, con la consiguiente reducción del stand de plantas del cultivo. En nuestro ambiente, las condiciones de humedad y temperaturas del suelo en el momento de siembra y germinación no favorecen su presencia, por lo que muy raramente se la ha mencionado. Sin embargo, si fuera necesario utilizar semilla con cierta proporción de granos fusariosos, por precaución se deberá utilizar un fungicida curasemilla adecuado. El tizón de la plántula no tiene influencia en la fusariosis de la espiga. En esta última, el inóculo proviene fundamentalmente de peritecios formados en diferentes substratos, como se ha mencionado. La infección y el desarrollo de la fusariosis de la espiga son altamente dependientes de factores climáticos y entre ellos, la humedad relativa ambiente (HR) es el principal condicionante. Las epidemias severas se producen cuando el estado de floración y primeras etapas de formación del grano coinciden con períodos de precipitaciones frecuentes, elevada y continua HR, superior a 80% y temperaturas entre 20 - 30°C. La temperatura y la humedad interactúan en la infección y expresión de los síntomas. En condiciones óptimas de temperatura y HR continua (25°C y >90% respectivamente), el período de incubación se reduce a solo dos días, incrementándose este período a medida que las temperaturas se alejan de la óptima, tanto por encima como por debajo de la misma. La mayor severidad se produce a 25°C, aunque con temperaturas superiores o inferiores se pueden alcanzar niveles similares con períodos de exposición a elevada HR más prolongados. El efecto de las condiciones climáticas sobre la enfermedad puede dividirse en tres fases: 1ª fase: corresponde al período previo a la espigazón, donde los factores climáticos influyen sobre la acumulación y maduración de peritecios de *Gibberella zeae*; 2ª fase: desde espigazón a floración, donde la temperatura y humedad adecuadas son esenciales para la dispersión de ascosporas y la infección; 3ª fase: luego de la infección, en la fase final las condiciones del ambiente regulan el desarrollo de la enfermedad. De las tres fases, la segunda posee mayor influencia en el desarrollo epidémico. La fusariosis de la espiga es actualmente la enfermedad del trigo que más desafíos presenta para su control. No solo preocupa por la reducción de los rendimientos y calidad, sino por los riesgos en la seguridad alimentaria a causa de la contaminación con micotoxinas. Hasta el momento, ninguna de la estrategia de control utilizada para otra enfermedad ha mostrado suficiente eficacia sobre la fusariosis. La resistencia genética es escasa y difícil de incorporar en variedades de alta productividad y calidad. Las labranzas conservacionistas, especialmente la siembra directa, ocupan una importante y creciente superficie en la región pampeana norte y los beneficios agronómicos indudables de esta modalidad de producción fuerzan a buscar soluciones que limiten la supervivencia del patógeno y su dispersión. La alternativa del control químico presenta dificultades en su implementación y no siempre justifica la inversión. Finalmente, esta enfermedad es altamente dependiente de las condiciones climáticas y sobre esta realidad, el hombre no tiene influencia. Sin embargo, los sistemas de pronósticos a corto y mediano plazo, así como la aplicación del modelo predictivo de incidencia ya desarrollado en el país, pueden ayudar a tomar decisiones. La única manera

de reducir el impacto de la fusariosis en los rendimientos y calidad a niveles tolerables es la integración de técnicas que contribuyan en conjunto a disminuir el nivel de la enfermedad. En el trigo existe variabilidad genética para resistencia a fusariosis, aunque no se conoce ningún genotipo inmune. Se han identificado buenas fuentes de resistencia, pero aún no ha sido posible transferirlas en germoplasma de alto rendimiento y calidad.

### **1.5. Pseudomonas y control biológico**

Uno de los grupos de microorganismos con más expectativas como agente de biocontrol son las bacterias del género *Pseudomonas* (Weller, 1988). *Pseudomonas* constituye el mayor grupo de rizobacterias presentes en el suelo, algunos de estos microorganismos son capaces de promover el crecimiento de diferentes cultivos cuando se aplican a las semillas como inoculantes en condiciones de campo. Estas PGPR promueven el crecimiento por varios mecanismos, estos incluyen: la producción de fitohormonas (Derylo y Skorupska 1993), estimulación en la captación de nutrientes (Lifshitz et al., 1987), solubilización de fósforo por liberación de fosfatasas (Ferraris y Couretot, 2004) y el biocontrol de bacterias deletéreas y hongos fitopatógenos (Weller, 1988). El efecto antagónico de *Pseudomonas* contra los hongos patógenos involucra la producción de sideróforos (Leong, 1986, Loper y Buyer 1991), antibióticos (Gurusiddaiah et al., 1986), enzimas hidrolíticas como quitinasas y  $\beta$ -1-3-glucanasas (Fridlender et al., 1993) y la generación in situ de ácido cianhídrico (Voisard et al., 1989). Estudios realizados a fines de los 70 y principio de los 80 en la Universidad de California, demostraron que algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes eran capaces de mejorar el crecimiento de la papa y de la caña de azúcar cuando eran aplicadas a las semillas (Schroth y Hancock, 1982). Los resultados de estos estudios, junto con la toma de conciencia sobre los efectos adversos de los pesticidas químicos, propiciaron el resurgimiento a escala mundial de la investigación sobre el uso de inoculantes bacterianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal. De esta manera se utilizan organismos naturales (rizobacterias) para reducir los efectos de organismos indeseables (patógenos) y así favorecer la producción de cultivos vegetales. El género *Pseudomonas* es un complejo, compuesto por muchas especies de bacilos rectos o ligeramente curvados con flagelación polar, un grupo importante de bacilos gram negativos quimiorganotróficos, aerobios que no muestran nunca un metabolismo fermentativo. Es probable que las *Pseudomonas* deriven de las bacterias fototróficas ancestrales que han dejado de ser fotosintéticas en el proceso evolutivo y que las llevó a colonizar hábitats en los que la fotosíntesis anoxigénica no presentaba ninguna ventaja (por ejemplo en el suelo o en la superficie de plantas y animales). Están implicadas en múltiples procesos biológicos tales como el deterioro de alimentos o el control biológico (Palleroni, 1984; O'Sullivan y O'Gara, 1992). Las bacterias de género *Pseudomonas* son capaces de metabolizar múltiples fuentes de carbono y tienen una velocidad de crecimiento elevada, lo cual favorece la competencia en el ambiente rizosférico, con los hongos que tienen un crecimiento más lento (Kloepper, 1992).

#### **1.5.a. Características**

Son bacilos rectos o curvados, con un tamaño de 0,5-1,0  $\mu$ m; sin esporas; Gram negativos; con múltiples flagelos o con un único flagelo polar; sin vainas, apéndices ni yemas; con un metabolismo respiratorio y nunca fermentativo, pueden producir aeróbicamente pequeñas

cantidades de ácidos procedentes de glucosa, utilizan compuestos orgánicos de bajo peso molecular, no polímeros; algunos son quimiolitotróficos y utilizan H<sub>2</sub> y CO como únicos donadores de electrones anaeróbicamente; otros utilizan arginina como fuente de energía en anaerobiosis.

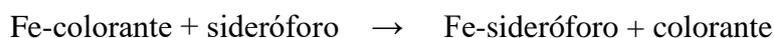
### 1.5.b. Antecedentes

*Pseudomonas aurantiaca*, cepa aislada de la rizósfera de soja, en la región de Rio Cuarto, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes especies fúngicas: *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia spp. T11*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Phytium spp.*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia rolfsi* (Altamirano et al., 1996). Ensayos in vitro indican que tal actividad está asociada a la producción de un pigmento color naranja (Rovera et al., 1998). Su expresión en los medios de cultivo está influenciada por la composición química de los mismos; no se produce en medios mínimos y sí en medios peptonados. La adición de triptona induce la síntesis del pigmento, mientras que el agregado de glucosa por encima de 5 g/l reprime su producción (Cabrera et al., 1999; Rosas et al., 2000). Los compuestos involucrados en la actividad biocontroladora de *Pseudomonas aurantiaca* son estables frente a la acción de proteasas y al tratamiento térmico (100<sup>0</sup>C; 20 min). Los primeros estudios de caracterización química demostraron que el metabolito bioactivo, aislado y separado mediante cromatografía en capa delgada es de naturaleza hidrofóbica (Rovera, 2000). *Pseudomonas aurantiaca* ha sido formulada como inoculante no convencional (BIAGRO S.A.) para el peleteo de semillas con el fin de lograr el control de hongos fitopatógenos, sin alterar el ecosistema rizosférico (Estrada et al., 2000). Ante la alternativa de utilizar la cepa formulada como inoculante o sus productos metabólicos en el biocontrol, resulta necesario profundizar la investigación a través de ensayos que permitan evaluar la influencia de factores medioambientales sobre la actividad antagonista de *Pseudomonas aurantiaca*. Es necesario además, estudiar la producción del compuesto antifúngico en el suelo, en condiciones gnotobióticas y naturales, considerando la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en el ambiente rizosférico y demostrar la actividad biocontrol in situ, en un sistema huésped-patógeno determinado. Finalmente se pretende caracterizar químicamente los compuestos bioactivos producidos por *Pseudomonas aurantiaca*, para dilucidar cuál o cuáles serían los mecanismos mediante los que las cepas rizosféricas expresan su capacidad antifúngica.

### 3.1. Estudio de las características PGPR

#### 3.1.a. Producción de sideróforos

Los sideróforos son detectables por ensayos colorimétricos. Se utilizó la técnica del Cromo Azurol S descrita por Alexander y Zuberer, 1991. La misma consiste en la utilización de un medio de cultivo sólido, que contiene un complejo de hierro insoluble ( $\text{Fe}^{+3}$ ) de color azul intenso. Cuando se libera en el medio un quelador fuerte de hierro como lo es un sideróforo, a través de una cepa productora, su acción se visualiza por un cambio de coloración del medio alrededor de las colonias de las bacterias solubilizadoras de hierro, formándose un halo de color naranja. Los sideróforos son queladores de hierro, que poseen mayor afinidad por el hierro que el colorante (Cromo Azurol S) y lo desplazan de su complejo con el hierro quedando libre el colorante.



La siembra de las bacterias a ensayar se realizó por picadura, las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días. Las colonias que exhibieron un halo color naranja en un fondo azul, fueron consideradas productoras de sideróforos. Se determinó el diámetro del halo en centímetros. La prueba se realizó por duplicado.

#### 3.1.b. Producción de ácido indol acético (AIA) y/o análogos

La determinación se realizó según el método descrito por Bric et al., 1991 con ligeras modificaciones. Se utilizaron placas que contenían agar tripteína soya (TSA), diluido al 10% y suplementado con L-triptófano 5 mM. Los discos de 5 mm de diámetro de membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro se depositaron sobre el medio de cultivo, y sobre los mismos se sembraron los microorganismos a ensayar por picadura con ansa. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 horas. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían 300  $\mu\text{l}$  del reactivo de Salkosky (Gordon y Weber, 1951).

Los microorganismos productores de AIA y/o análogos generan una coloración que va del rosa al rojo, luego de 30 minutos a 3 horas de incubación de los discos con el reactivo de Salkosky; por el contrario, un resultado negativo se expresa por un color amarillo-marrón, luego de las 3 horas posteriores al agregado del reactivo.

#### 3.1.c. Producción de ácido cianhídrico

Para evaluar la producción de ácido cianhídrico se siguió la técnica de Bakker y Schippers, 1987. Las bacterias se sembraron con ansa en anillo en estrías sobre las placas que contenían TSA al 10%, suplementado con glicina 4,4 gr/l. El interior de la tapa se cubrió totalmente con papel de filtro, impregnado con ácido pícrico 0,5% y carbonato de sodio 2 %. Las placas se incubaron a 28°C de 3 a 5 días. Un cambio de color de amarillo a naranja-marrón en el papel de filtro indica la producción de ácido cianhídrico.

### **3.1.d. Producción de exopolisacáridos**

Las bacterias fueron sembradas por estrías radiales en una placa que contenía un medio de cultivo compuesto por agar nutritivo suplementado con calcofluor 0,005%. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días. Posteriormente, las placas fueron expuestas a luz U.V de 350 nm de longitud de onda. Las bacterias productoras de exopolisacáridos emitieron fluorescencia bajo la luz U.V de 350 nm.

### **3.1.e. Solubilización de fosfato tricálcico**

Se utilizó el método descrito por Frioni, 1999. La siembra se realizó con palillos estériles sobre placas de Petri que contenían agar tripteína soya (TSA), suplementado con 2g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  por litro. La incubación se realizó a 28°C durante 5 días. Se consideraron positivas las cepas capaces de formar un halo transparente alrededor de las colonias. La prueba se realizó por duplicado, determinando el diámetro del halo en centímetros.

### **3.1.f. Solubilización de fosfato monocálcico**

Se utilizó el método descrito por Frioni, 1999. La siembra se realizó con palillos estériles sobre placas de Petri que contenían agar tripteína soya (TSA), suplementado con 2g de  $\text{PO}_4\text{HCa}$  por litro. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. Se consideraron positivas las cepas capaces de formar un halo transparente alrededor de sus colonias. La prueba se realizó por duplicado, determinando el diámetro del halo en centímetros.

## **3.2. Determinación de diversas actividades enzimáticas**

### **3.2.a. Determinación de la actividad caseinolítica**

Las bacterias fueron sembradas por picadura sobre placas que contenían el medio de Castañeda (Castañeda-Agullo, 1956), suplementado con caseína 1% y agar 2,3%. La hidrólisis de la caseína se detectó por la formación de un halo translúcido (caseína totalmente hidrolizada). En el borde externo de este halo translúcido se detectó la formación de un halo opaco (caseína coagulada). La actividad caseinolítica se determinó en base al diámetro del halo translúcido en centímetros. El ensayo se realizó por duplicado.

### **3.2.b. Determinación de lipasa**

Las bacterias fueron sembradas por picadura con ansa, en placas que contenían agar nutritivo suplementado con tributirina 1% (Thatcher y Clark., 1973). Posteriormente las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días. Las colonias positivas se evidenciaron por la formación de un halo claro alrededor de las mismas. El ensayo se realizó por duplicado.

### **3.2.c. Determinación de Lecitinasa**

Las bacterias fueron sembradas por picadura con ansa, en placas que contenían agar nutritivo suplementado con yema de huevo 5% (Thatcher y Clark., 1973).

Posteriormente las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días. Las colonias positivas se evidenciaron por la formación de un halo claro alrededor de las mismas. El ensayo se realizó por duplicado.

### **3.2.d. Determinación de celulasa**

La determinación se realizó según el método descrito por Teather y Word, 1982. Las bacterias se inocularon por picadura con ansa en placas que contenían medio YEMA (Vicent, 1970), con manitol reducido (en lugar de 1%; 0.2%) y suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) 0.1%. Posteriormente las placas se incubaron a 28°C durante 3 días. Luego, mediante la utilización de un hisopo de algodón y agua destilada las colonias bacterianas se eliminaron de la placa, y se adicionó rojo congo 0.1%. El rojo congo se descartó luego de 15 minutos. La placa se colocó boca abajo sobre papel absorbente para secarla. Luego se cubrió con cloruro de sodio 1M, se esperó 10 minutos, y la solución se descartó. La placa se secó boca abajo sobre papel de filtro. Finalmente, la placa se cubrió con ácido acético 5% durante 5 minutos. Luego la solución se descartó. Las bacterias productoras de celulasa deben presentar una zona clara de degradación en la zona donde estuvo de la colonia. La cepa *Bradyrhizobium spp C145*, inoculante para maní, se utilizó como control positivo.

### **3.2.e. Producción de amilasa**

Las bacterias fueron sembradas en agar nutritivo suplementado con almidón 2 %. La siembra se realizó con ansa en anillo trazando una línea recta de borde a borde en el medio de la placa. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas. Finalmente las placas se inundaron con una solución de yoduro de sodio 1%.

Las bacterias productoras de amilasas presentan una zona clara alrededor de la colonia, lo que indica la presencia de enzimas hidrolíticas, debido a que estas degradan el almidón contenido en el medio de cultivo.

### **3.3. Estudio “in Vitro” de la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por diferentes bacterias**

Se sembraron placas de agar tripteína soya (TSA) 25% con los siguientes hongos fitopatógenos: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium virguliforme*; para luego enfrentarlos a las bacterias: *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), *Azospirillum spp*, *Serratia marcenses wf*, y de este modo realizar la evaluación del biocontrol.

Las cepas fúngicas fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA), e incubadas durante 7 días a 28°C para su activación. Durante toda la experiencia se trabajó a 28°C debido a que es la temperatura óptima de crecimiento de los hongos.

Las pruebas de biocontrol se realizaron de dos maneras diferentes. Simultánea: bacterias + hongos expuestos al mismo tiempo. No simultánea: Las bacterias fueron sembradas en estrías sobre un tercio de la placa que contenía TSA 25%. Las placas se incubaron durante 48 hs a 28°C. Posteriormente, en el lado opuesto de la misma, se sembró un taco fúngico de un 1 cm<sup>2</sup>. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. La experiencia se realizó por duplicado y se calculó el porcentaje de inhibición en base a la reducción del

crecimiento miceliar respecto a las placas que contenían el hongo sin el inóculo bacteriano.

### **3.4. Determinación del crecimiento de los microorganismos en diferentes condiciones**

#### **3.4.a. Determinación del crecimiento de *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens pf5* y *Pseudomona fluorescens wcs 417r* utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato.**

Para la obtención de los cultivos primarios, se tomó con ansa en anillo una colonia de cada una de las bacterias de 48 hs. de crecimiento, a partir de un cultivo en placa que contenía medio King B. El inóculo se suspendió en 2 ml de solución fisiológica estéril. Se agitó con un Vortex hasta observar la desaparición total de grumos. De estos 2 ml se tomó una alícuota de 0.1 ml que se adicionó a cada uno de los ocho erlenmeyers de 50 ml. Cada uno de los erlenmeyers contenían:

- 1- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Carboximetilcelulosa 0,25 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml. A T= 0, se adicionaron 100 *ul* de inóculo de *Pseudomona aurantiaca*, de *Pseudomona pútida*, de *Pseudomona fluorescens pf5* y de *Pseudomona fluorescens wcs 417r*.
- 2- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 20 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml. A T= 0, se adicionaron 100 *ul* de inóculo de *Pseudomona aurantiaca*, de *Pseudomona pútida*, de *Pseudomona fluorescens pf5* y de *Pseudomona fluorescens wcs 417r*.

El desarrollo de los microorganismos se realizó a 30°C en baño temostatizado con agitación a 120 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos, a las 0 hs. (T=0), 3 hs., 5 hs., 7 hs., 24 hs. y 48 hs. Finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm.

#### **3.4.b. Determinación del crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417r* con diferentes fuentes de carbono**

Para la obtención de los cultivos primarios, se tomó con ansa en anillo una colonia de la bacteria de 48 hs. de crecimiento, a partir de un cultivo en placa que contenía medio King B. El inóculo de *Pseudomona fluorescens wcs 417r* se suspendió en 2 ml de solución fisiológica estéril. Se agitó con un Vortex hasta observar la desaparición total de grumos. De estos 2 ml se tomó una alícuota de 0.1 ml que se adicionó a cada uno de los ocho erlenmeyers de 50 ml. Cada uno de los erlenmeyers contenían:

- 1- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Celobiosa 20 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 2- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 10 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 3- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Carboximetilcelulosa 0,25 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.

- 4- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Carboximetilcelulosa 0,25 g/l, Citrato de sodio 2 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 5- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Carboximetilcelulosa 0,25 g/l, Citrato de sodio 10 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 6- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Celulosa 2,5 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 7- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Celulosa 2,5 g/l, Citrato de sodio 2 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.
- 8- Solución salina 3 ml (Solución 10X), Celulosa 2,5 g/l, Citrato de sodio 10 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 30 ml.

El desarrollo de los microorganismos se realizó a 30°C en baño temostatizado con agitación a 120 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos, a las 0 hs. (T=0), 3 hs., 5 hs., 7 hs., 24 hs. y 48 hs. Finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm.

### **3.4.c. Determinación del crecimiento de *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona fluorescens chao* y *Bradyrhizobium spp. C145*, utilizando diferentes fuentes de carbono.**

Para la obtención de los cultivos primarios, se tomó con ansa en anillo una colonia de cada una de las bacterias de 48 hs. de crecimiento, a partir de un cultivo en placa que contenía medio King B. El inóculo de *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Bradyrhizobium spp. C145* se suspendió en 2 ml de solución fisiológica estéril. Se agitó con un Vortex hasta observar la desaparición total de grumos. De estos 2 ml se tomó una alícuota de 0,1 ml que se adicionó a cada uno de los seis erlenmeyers de 50 ml. Cada uno de los erlenmeyers contenían:

- 1- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 20 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 22,5 ml.
- 2- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Carboximetilcelulosa 2,5 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM en un volumen final de 22,5 ml.
- 3- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 2 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 22,5 ml.
- 4- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 6 mM, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 22,5 ml.
- 5- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 2 mM, Carboximetilcelulosa 2,5 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 22,5 ml.
- 6- Solución salina 2,25 ml (Solución 10X), Citrato de sodio 6 mM, Carboximetilcelulosa 2,5 g/l, Cloruro de amonio 20 mM, Sulfato de magnesio 0,8 mM, en un volumen final de 22,5 ml.

El crecimiento de los microorganismos se realizó a 30°C en baño temostatizado con agitación rotatoria a 120 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos estériles, a

las 0 hs. (T=0), 3 hs., 5 hs., 7 hs., 24 hs. y 48 hs. Finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm.

### **3.5. Medios de cultivos y soluciones**

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

#### **Medios Yema**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
ClNa	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de Levadura	0,4 g
Agar	17,0 g
Agua destilada, c.s.p	1000 ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

#### **Medio de Castañeda (gr/l)**

Citrato de amonio	0,625 g
NaCl	0,250 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,375 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,125 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,375 g
Glicerol	6,5 ml

Se ajusta a pH 6,5-7 para evitar la precipitación de la caseína. Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

#### **Medio para sideróforos**

Cas-agar para 204,2 ml

#### **Solución A**

Pipes 8 buffer ácido libre, pH= 6.8	6,8 gr
Bacto agar	3,2 gr
Triptófano	0,6 gr
Triptona	0,032 gr
Agua destilada c.s.p	160 ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

Luego se adiciona la solución B estéril a la solución A.

### Solución B

Medio MM9	20ml
CAS Stock 10X	20ml
Manitol 1 M	2,0ml
MgSO <sub>4</sub>	0,1ml
Cl <sub>2</sub> Ca (50mM)	0,2ml
Vitaminas (solución stock)	0,1ml

La combinación de A y B se vierte en cajas de Petri. El medio CAS-agar debe presentar un color azul intenso.

### Soluciones Stock

#### MM9 10X

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3gr
NaCl	0,5gr
NH <sub>4</sub> Cl	1,0gr
Agua destilada c.s.p	100ml

#### Solución de vitaminas

Rivoflavina	20mg/100ml
Ác. P-aminobenzoico	20mg/100ml
Ác. Nicotínico	20mg/100ml
D-pantotenato de calcio	20mg/100ml
Pirodoxal CIH	20mg/100ml

Se esteriliza por filtración.

### CAS

a)- CAS (chromo azurol S): 60,5 mg disueltos en 50 ml agua bidestilada; agregar 10 ml de FeCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O 1mM (disuelto en HCl 10 mM).

b)- Disolver 72,9 mg de HDTMA (Hexadecyl trimetil amonio bromoide) en 40 ml de agua bidestilada.

Agregar suavemente y con ligera agitación la solución “b” a la “a”. Debe observarse un color azul intenso.

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### Solución Salina (10 X)

ClNa	8,5mM
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	17mM
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K anhidro	22mM
Cl <sub>3</sub> Fe . 6H <sub>2</sub> O	0,15 mM (disolver previamente en HCl 0,1M)
Cl <sub>2</sub> Ca . 2H <sub>2</sub> O	2 mM
pH= 7,4	

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### **Medio para determinar la solubilización del fosfato tricálcico**

Extracto de levadura	2gr
Glucosa	10gr
Fosfato tricálcico	2gr
Actidiona	0,06gr
Agar	15gr
Agua destilada c.s.p	1000ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### **Medio para la determinación de la solubilización de fosfato monocálcico**

Extracto de levadura	2gr
Glucosa	10gr
Fosfato monocálcico	2gr
Actidiona	0,06gr
Agar	15gr
Agua destilada c.s.p	1000ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### **Medio para la determinación de la hidrólisis de almidón**

Extracto de carne	3gr
Peptona	5gr
Almidón soluble	2gr
Agar	15gr
Agua destilada c.s.p	1000ml
pH: 7,2	

Disolver hasta ebullición, luego agregar el almidón y calentar de 3 a 4 minutos hasta observar disolución del mismo. Enfriar.

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### **Medio de cultivo para la determinación de lipasa**

#### Agar Nutritivo:

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada, c.s.p.	1000 ml
pH = 7	
Tributirina	1%

Esterilizar el agar nutritivo durante 20 minutos a 1 atmósfera. Agregar la tributirina estéril. Agitar con Vortex, para que se forme la emulsión. El medio debe presentar un aspecto opaco.

### **Medio para la determinación de lecitinasa**

#### Agar nutritivo:

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada, c.s.p.	1000 ml
pH = 7	
Yema de huevo estéril	5%

Desinfectar la cáscara del huevo por lavado con detergente y sumergir el huevo 10 minutos en etanol 96°. Separar la yema de la clara y diluir la yema con igual volumen de solución fisiológica estéril (yema procesada). Agitar para homogenizar. Agregar un volumen de la yema procesada al agar nutritivo para que la concentración sea del 10 %, a no más de 45 °C para que no coagule.

### **Medio agar papa dextroza (PDA)**

Papas en cubos	200gr
Agua destilada	1000ml

Se lleva a ebullición durante 30 minutos. Se toma el líquido residual del hervor de la papa filtrando por gasa, y se agrega:

Glucosa	20gr
Agar	20gr
Agua destilada c.s.p	1000ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

### **Medio agar tripteina soya (TSA)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 gr
Glucosa	2,5gr
NaCl	5gr
Triptona	17gr
Peptona de soya	3gr
Agar	15gr
Agua destilada c.s.p	1000ml

Se autoclava durante 20 minutos a 1 atmósfera.

#### **4.1. Determinación de las Características PGPRs**

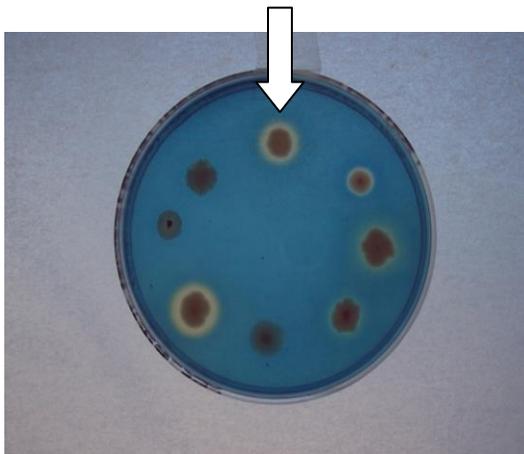
##### **4.1.a. Producción de sideróforos**

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, producidos por algunos microorganismos, actúan como quelantes del ión férrico con alta afinidad por el mismo. Los sideróforos forman complejos con el hierro insoluble en el suelo. Las bacterias incorporan el complejo sideróforo-Fe<sup>+3</sup> al interior de las mismas, donde el ión férrico se reduce a ión ferroso, quedando de este modo a disposición de la misma. De esta manera, los sideróforos disminuyen la concentración de hierro en el suelo, la que no es suficiente para el crecimiento de patógenos, pero si el de la planta. Debido a esta propiedad, la producción de sideróforos es una importante característica PGPR.

En la tabla I se observa la producción de sideróforos por diversos microorganismos. Los microorganismos productores y en orden decreciente fueron *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao* y *Pseudomona fluorescens pf5*, mientras que *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, *Azospirillum spp.* y *Serratia marcenses wf* no los produjeron.

Bacterias	Diámetro del halo en Cm ± S.D
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	1,5 ± 0,1
<i>Pseudomona pútida</i>	1,0 ± 0,1
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	0,8 ± 0,1
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	0,7 ± 0,1
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	3,0 ± 0,1
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo
<i>Serratia marcenses wf</i>	Negativo

**Tabla I:** La producción de sideróforos se pone en evidencia por la capacidad de los microorganismos para cambiar la coloración del medio de color azul intenso, con la aparición de un halo de color naranja alrededor de la colonia, debido a que los sideróforos capturarán el hierro insoluble que está ligado en el complejo hierro-colorante. Las determinaciones se realizaron por duplicado. S.D: desviación estándar.



**Foto N° 1:** Producción de sideróforos por diversos microorganismos. La colonia indicada por la flecha corresponde a *Pseudomona aurantiaca*, el resto en sentido horario corresponde a: *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos), *Azospirillum spp.* y *Serratia marcenses wf*.

**4.1.b. Producción cualitativa del ácido indol acético (AIA) y/o análogos**

El mecanismo de acción directo de las PGPRs por excelencia, es la producción de fitohormonas (Brown, 1974; Tien et al., 1979). Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus* liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas o citoquininas en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento, especialmente cuando está en el estado de plántula (Brown, 1974; Nieto y Frankenberger, 1989; Lebhun et al., 1994).

La tabla II muestra la producción de ácido indol acético (AIA) por diversas bacterias. Todas las bacterias fueron productoras de ácido indol acético (AIA).

Bacterias	Resultados
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Positivo
<i>Pseudomona pútida</i>	Positivo
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	Positivo
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	Positivo
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Positivo
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	Positivo
<i>Azospirillum spp.</i>	Positivo

**Tabla II:** Producción de ácido indol acético (AIA). Las bacterias productoras de AIA generan una coloración rosa cuando se agrega el reactivo de Salkosky sobre los discos de nitrocelulosa. La determinación del AIA se realizó de forma cualitativa y por duplicado. Los resultados del ensayo fueron coincidentes.

### 4.1.c. Producción de ácido cianhídrico

El principal mecanismo de acción del ácido cianhídrico es mediante la inhibición directa del crecimiento de los hongos (Blumer y Hass, 2000), en cuyo caso, el efecto de la bacteria podría compararse al rol del ácido cianhídrico en los mecanismos de defensa de las plantas. Su acción es la de inhibir la citocromo C oxidasa terminal de la cadena respiratoria. Los efectos inmediatos son una reducción de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos.

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos cuando se determinó la producción de ácido cianhídrico por diversas bacterias. De las siete bacterias ensayadas, solo tres de ellas, *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona fluorescens chao* y *Pseudomona fluorescens pf5* presentaron esta característica PGPR, como es la producción ácido cianhídrico.

Bacterias	Resultados
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Positivo (+++)
<i>Pseudomona pútida</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	Positivo (+)
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	Positivo (++)
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	Negativo
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo

**Tabla III:** Producción de ácido cianhídrico por diversos microorganismos. Las bacterias productoras de ácido cianhídrico generan un cambio de color en el papel de filtro del amarillo al naranja. Las determinaciones se realizaron en forma cualitativa y por duplicado. Los resultados del ensayo fueron coincidentes.



**Foto N° 2:** Producción de ácido cianhídrico (CNH) por diversos microorganismos. La placa en la parte superior y a la izquierda corresponde a *Pseudomonas pútida*, en la que no se observa producción de CNH. En la placa de la parte superior a la derecha se observa la producción CNH por *Pseudomonas aurantiaca*. La placa de la parte inferior a la izquierda corresponde a la producción de CNH por *Pseudomonas fluorescens pf5*. Abajo a la derecha producción de CNH por *Pseudomonas fluorescens chao*. La liberación de CNH, para las tres cepas positivas, en orden decreciente corresponde a *Pseudomonas aurantiaca*, *Pseudomonas fluorescens pf5* y *Pseudomonas fluorescens chao*, según se observa en la foto, y que se indica en la tabla III.

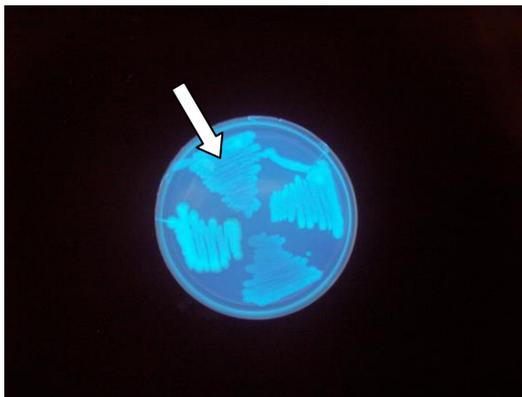
### **4.1.d. Producción de exopolisacáridos**

La producción de polisacáridos extracelulares juega un rol importante en la formación de biofilms bacterianos, por ejemplo, una cepa mutante de *Pseudomonas fluorescens chao* con una producción incrementada de polisacáridos celulares acídicos, comparada con una cepa biocontrol tipo salvaje, formó una capa bacteriana densa e irregular sobre las raíces de la zanahoria, y de las estructuras fungales correspondientes al hongo micorrítico *Glomus intraradices*. A su vez la cepa salvaje se adhirió muy poco a todas las superficies (Bianciotto et al., 2001). La producción de exopolisacáridos, conjuntamente con una amplia variedad de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos y en algunos casos sorprendentemente DNA extracelular (e-DNA), agrupados como sustancias poliméricas extracelulares (EPS), contribuyen a la formación de biofilms. Estos biopolímeros EPS, están altamente hidratados y forman una matriz, la cual le permite a las células del biofilm mantenerse juntas y retener el agua. Esta matriz interactúa con el ambiente, por ejemplo uniendo el biofilm a las superficies, y mediante sus propiedades de absorción le permite al mismo secuestrar sustancias disueltas en el ambiente, proveyendo de este modo nutrientes para los organismos del biofilm (Flemming et al., 2007). La producción de polisacáridos en *Pseudomonas aeruginosa* está relacionada con la formación de biofilms, y a su vez con la persistencia infecciosa de este patógeno (Ryder et al., 2007). La formación de biofilms, en la cual están involucrados entre otros los polisacáridos extracelulares, le permitiría a un microorganismo PGPR una mayor adhesividad y persistencia en la rizósfera, para ejercer su efecto de biocontrol y/o sobre el crecimiento.

La tabla IV muestra los resultados obtenidos con respecto a la producción de exopolisacáridos. *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) y *Serratia marcenses wf* produjeron exopolisacáridos, pero en magnitud diferente. La mayor productora fue *Serratia marcenses wf* y la menos productora fue *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial).

Bacterias	Fluorescencia a 350 nm
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Negativo
<i>Pseudomona pútida</i>	++
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	++
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	++
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	+
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo
<i>Serratia marcenses wf</i>	+++

**Tabla IV:** Producción de exopolisacáridos por diversos microorganismos. Los signos indican la intensidad de la fluorescencia a 350 nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados fueron coincidentes.



**Foto N° 3:** La placa muestra la intensidad de la fluorescencia a 350 nm, que corresponde a la producción de exopolisacáridos por diversos microorganismos. La flecha indica *Pseudomona fluorescens* (Rizofos), y en sentido horario *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens wcs 417r* y *Serratia marcenses wf*. Con la excepción de *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, las tres restantes son productoras de exopolisacáridos, aunque en distinta magnitud, según se observa en la foto y como se indica en la tabla IV.

**4.1.e. Solubilización del fosfato tricálcico**

La solubilización del fosfato se lleva a cabo mediante la producción de ácidos orgánicos tales como láctico, glucólico, cítrico, maleíco y otros (Sperber, 1958). Esta solubilización permite una mayor disponibilidad de fósforo para la planta y por lo tanto un mayor crecimiento (Chabot et al., 1993; Kucey et al., 1989).

En la tabla V se observa la capacidad de diversos microorganismos para solubilizar el fosfato tricálcico. *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens wcs 417r* presentaron una buena e igual aptitud para la solubilización del fosfato, mientras que *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) mostró una aptitud inferior. *Pseudomona aurantiaca* y *Azospirillum spp.* fueron incapaces de solubilizar el fosfato.

Bacterias	Diámetro del halo en Cm $\pm$ S.D
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Negativo
<i>Pseudomona pútida</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	1,3 $\pm$ 0,1
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo

**Tabla V:** Solubilización del fosfato tricálcico por diversos microorganismos. Las bacterias solubilizadoras presentaron un halo claro alrededor de las colonias. Las determinaciones se realizaron por duplicado. S.D: desviación estándar.

**4.1.f. Solubilización del fosfato monocálcico**

En la tabla VI se observa la capacidad de diversos microorganismos de solubilizar el fosfato monocálcico. *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomona fluorescens wcs 417r* presentaron una buena e igual aptitud para la solubilización de fosfato mientras que *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) mostró una aptitud inferior. *Pseudomona aurantiaca* y *Azospirillum spp.* fueron incapaces de solubilizar el fosfato. De este modo los resultados fueron idénticos a los obtenidos con fosfato tricálcico. En base a estos resultados resulta concluyente que para

demostrar la capacidad solubilizadora de fosfato es indistinto utilizar fosfato tricálcico o fosfato monocálcico.

Bacterias	Diámetro del halo en Cm $\pm$ S.D
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Negativo
<i>Pseudomona pútida</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	2,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	1,6 $\pm$ 0,1
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo

**Tabla VI:** Los resultados de la solubilización del fosfato monocálcico fueron idénticos a los obtenidos con fosfato tricálcico. Las determinaciones se realizaron por duplicado. S.D: desviación estándar.

#### **4.2. Determinación de diversas actividades enzimáticas**

##### **4.2.a. Determinación de la actividad caseinolítica (proteolítica)**

Muchas plantas responden al ataque de patógenos sintetizando proteínas que pueden hidrolizar las paredes celulares de algunos hongos. De manera similar, ciertas PGPR producen enzimas, incluidas quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, proteasas y lipasas, que pueden lisar células fúngicas (Chet e Inbar, 1994). La determinación de proteasas y lipasas de microorganismos es importante como característica PGPR.

En la tabla VII se observa la capacidad de diversos microorganismos para hidrolizar la caseína. *Pseudomona aurantiaca*, *Pseudomona pútida*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), *Pseudomona fluorescens wcs 417r* y *Serratia marcenses wf* la hidrolizaron. Los dos últimos microorganismos mencionados mostraron una mayor aptitud. *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens pf5* y *Azospirillum spp.* no la hidrolizaron.

Bacterias	Diámetro del halo en Cm $\pm$ S.D
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	3,3 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona pútida</i>	3,2 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	3,6 $\pm$ 0,1
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	3,2 $\pm$ 0,1
<i>Azospirillum spp.</i>	Negativo
<i>Serratia marcenses wf</i>	3,7 $\pm$ 0,1

**Tabla VII:** Actividad proteolítica de diversos microorganismos. Las bacterias que hidrolizaron la caseína produjeron un halo claro alrededor de las colonias. Las determinaciones se realizaron por duplicado. S.D: desviación estándar.

**4.2.b. Determinación de lipasa**

La tabla VIII muestra la actividad lipasa de diversas bacterias. En mayor o menor grado todas las bacterias presentaron actividad. Las de menor actividad fueron *Pseudomona fluorescens pf5*, *Pseudomoma fluorescens wcs 417 r* y *Serratia marcenses wf*. El resto presentó una importante actividad lipasa.

Bacterias	Placa 1	Placa 2
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	++	++
<i>Pseudomona pútida</i>	++	+++
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	+++	++
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	++	+
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	+	+
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	++	++
<i>Azospirillum spp.</i>	+++	+++
<i>Serratia marcenses wf</i>	+	+

**Tabla VIII:** Actividad lipasa de diversas bacterias. Se utilizó tributirina como sustrato. La actividad enzimática se visualizó por la formación de un halo claro alrededor de la colonia.

Los signos indican la magnitud del halo. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados fueron prácticamente coincidentes.

### 4.2.c. Determinación de lecitinasa

Las bacterias que producen fosfolipasa C, dependiente de Zn, hidrolizan la lecitina (fosfatidilcolina) liberando un diacilglicerido y la fosforilcolina, la que posteriormente puede liberar fosfato y colina merced a la acción de una colina fosfatasa. La producción de fosfolipasa se considera una característica PGPR, dado que permite liberar el fosfato orgánico del fosfolípido, e incorporarlo al suelo.

La tabla IX muestra la capacidad de diversos microorganismos para hidrolizar la lecitina, mediante la producción de lecitinasa. Las únicas bacterias capaces de hidrolizar la lecitina, con la formación de un halo opaco alrededor de la colonia, fueron: *Pseudomona fluorescens chao*, *Azospirillum spp.* y *Serratia marcenses wf*. A su vez esta prueba también permite la determinación de lipasa por la formación de un halo claro externo y contiguo al halo opaco. Todas las bacterias ensayadas presentaron dicho halo, lo que confirmó la presencia de lipasa en forma coincidente con los resultados obtenidos en la tabla VIII, cuando se utilizó tributirina como sustrato.

Bacterias	Placa 1	Placa 2
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	-	-
<i>Pseudomona pútida</i>	-	-
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	+	+
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	-	-
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	-	-
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	-	-
<i>Azospirillum spp.</i>	+	+
<i>Serratia marcenses wf</i>	+	+

**Tabla IX:** Actividad lecitinasa de diversos microorganismos. Las bacterias productoras formaron un halo claro alrededor de las colonias. Las determinaciones se realizaron por duplicado y fueron coincidentes.

### 4.2.d. Determinación de celulasa

En la tabla X se puede observar la capacidad de diversos microorganismos para hidrolizar la celulosa. Ninguno de los microorganismos testeados degradó la celulosa con la excepción de *Bradyrhizobium spp. C145* que se utilizó como control.

Bacterias	Resultados
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Negativo
<i>Pseudomona pútida</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens</i> (Rizofos)	Negativo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Negativo
<i>Bradyrhizobium spp. C145</i>	Positivo

**Tabla X:** Actividad celulasa de diversos microorganismos. El único microorganismo que exhibió una zona clara de degradación alrededor de la colonia y que se utilizó como control fue *Bradyrhizobium spp. C145*. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados fueron coincidentes.



**Foto N° 4:** Producción de celulasa por *Bradyrhizobium spp. C 145*. En la placa se observa una zona clara que corresponde a la actividad celulasa del microorganismo.



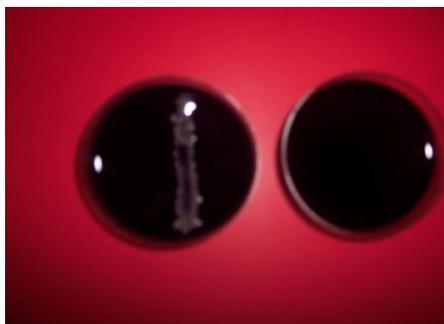
**Foto N° 5:** En la placa correspondiente a *Pseudomona aurantiaca*, no se observa la formación de un halo claro, correspondiente a la actividad celulasa.

#### **4.2.e. Producción de amilasas**

En la tabla XI se observa que ninguno de los microorganismos ensayados hidrolizó el almidón.

Bacterias	Resultados
<i>Pseudomona aurantiaca</i>	Negativo
<i>Pseudomona pútida</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens chao</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens pf5</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens wcs 417r</i>	Negativo
<i>Pseudomona fluorescens (Rizofos)</i>	Negativo

**Tabla XI:** Hidrólisis del almidón por diversas bacterias. En ningún caso se observó un halo claro alrededor de la estría sembrada en un medio suplementado con almidón y teñido con iodo. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados fueron coincidentes.



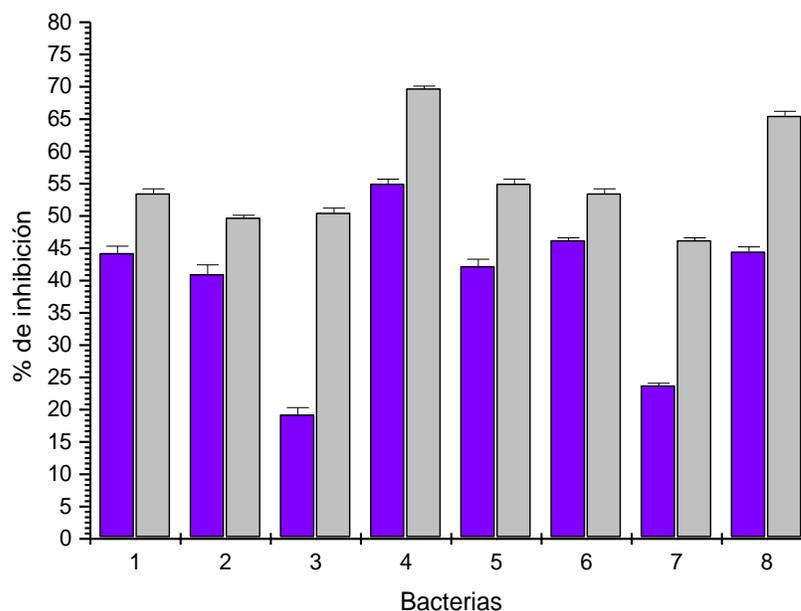
**Foto N° 6 :** En la imagen de la placa a la izquierda se observa la actividad amilasa correspondiente a *Azospirillum spp.*, la que resultó negativa. A la derecha una placa control sin inocular.

### **4.3. Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por diferentes bacterias**

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento “in vitro” de diferentes hongos causantes de diversas enfermedades en cultivos de interés agronómico, mediante bacterias diferentes. Los hongos utilizados fueron: *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium virguliforme* y *Macrophomina phaseolina*. Las pruebas de inhibición del crecimiento de los hongos se realizaron de dos maneras con respecto a la exposición bacterias-hongos. **Simultánea:** bacterias + hongos expuestos al mismo tiempo. **No Simultánea:** las bacterias se sembraron 48 hs. antes de enfrentarla a los diferentes hongos fitopatógenos. La prueba no simultánea se realizó debido a que algunos microorganismos necesitan de un tiempo prolongado de crecimiento, en ausencia del patógeno, para que se produzcan aquellos metabolitos secundarios responsables de la inhibición del crecimiento.

En el gráfico N° 1 se observa la inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por diversas bacterias, mediante las pruebas simultánea y no simultánea.

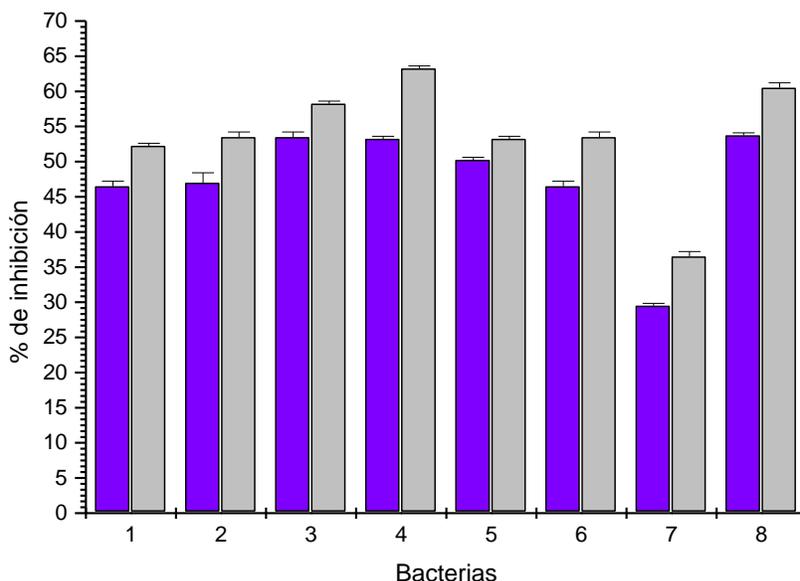
La inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* por parte de las bacterias fue variada. Se observó una mayor inhibición, en la prueba no simultánea, por *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) y por *Serratia marcenses wf*, superior al 60%. Hay una diferencia importante en los porcentajes de inhibición cuando se utilizó la prueba simultánea y la prueba no simultánea, con respecto a las bacterias *Pseudomona fluorescens chao*, *Azospirillum spp.* y *Serratia marcenses wf*, siendo los mismos superiores en la prueba no simultánea.



**Gráfico N° 1:** porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium solani* en la prueba simultánea ■ y en la prueba no simultánea ■ correspondiente a: 1- *Pseudomona aurantiaca*, 2- *Pseudomona pútida*, 3- *Pseudomona fluorescens chao*, 4- *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), 5- *Pseudomona fluorescens pf5*, 6- *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, 7- *Azospirillum spp.* y 8- *Serratia marcenses wf.* Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las barras corresponden a la desviación estándar.

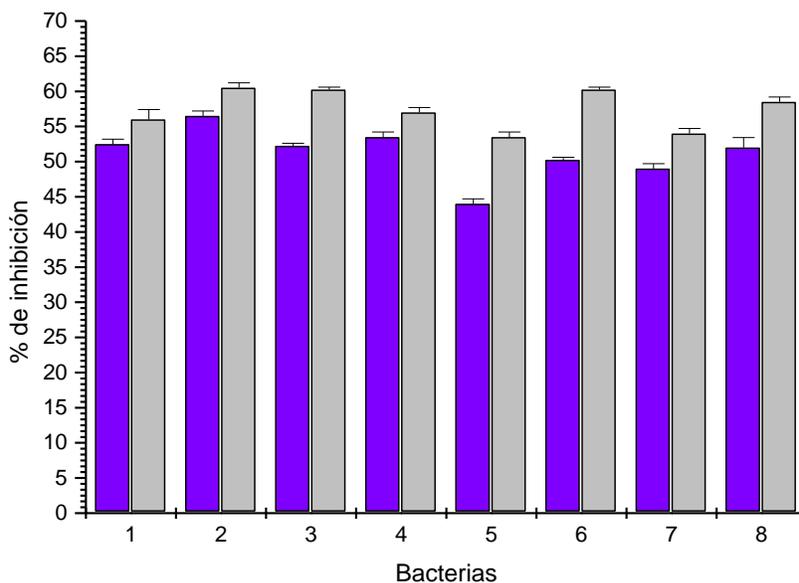
En el gráfico N° 2 se observa la inhibición del crecimiento de *Fusarium verticilloides* mediante diversos microorganismos, con respecto a las pruebas simultánea y no simultánea.

Se observa una importante inhibición del crecimiento de *Fusarium verticilloides* por parte de las diferentes bacterias. Los mayores porcentaje de inhibición tanto en la prueba simultánea como en la no simultánea fueron significativamente superiores cuando el hongo fue enfrentado a *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) y *Serratia marcenses wf.* Los mayores porcentajes de inhibición con respecto a la prueba simultánea fueron generados por las bacterias *Pseudomona fluorescens chao*, *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) y *Serratia marcenses wf.*, superando el 50% de inhibición. Con respecto a la prueba no simultánea, los mayores porcentajes de inhibición correspondieron a las bacterias *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial) y *Serratia marcenses wf.* que superaron el 60%.

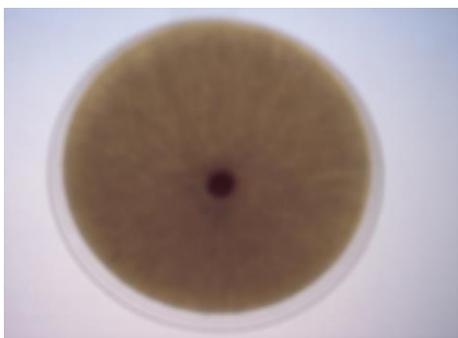


**Gráfico N° 2:** porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticilloides* en la prueba simultánea (■) y en la prueba no simultánea (■) correspondiente a: 1- *Pseudomona aurantiaca*, 2- *Pseudomona pútida*, 3- *Pseudomona fluorescens chao*, 4- *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), 5- *Pseudomona fluorescens pf5*, 6- *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, 7- *Azospirillum spp.* y 8- *Serratia marcenses wf*. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las barras corresponden a la desviación estándar.

En el gráfico N° 3 se observa la inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* mediante diversos microorganismos, utilizando las pruebas simultánea y no simultánea. Todas las bacterias produjeron porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum* que superaron el 50%. En todos los casos los porcentajes de inhibición en la prueba no simultánea superaron a los de la prueba simultánea.



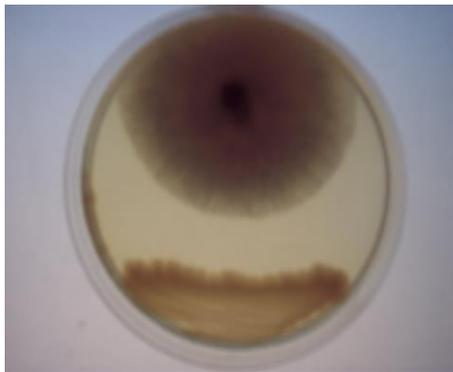
**Gráfico N° 3:** porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* en la prueba simultánea  y en la prueba no simultánea  correspondiente a: 1- *Pseudomona aurantiaca*, 2- *Pseudomona pútida*, 3- *Pseudomona fluorescens chao*, 4- *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), 5- *Pseudomona fluorescens pf5*, 6- *Pseudomona fluorescens wcs 417r*, 7- *Azospirillum spp.*, 8- *Serratia marcenses wf*. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las barras corresponden a la desviación estándar.



**Foto N° 7 :** Control de crecimiento de *Fusarium graminearum*

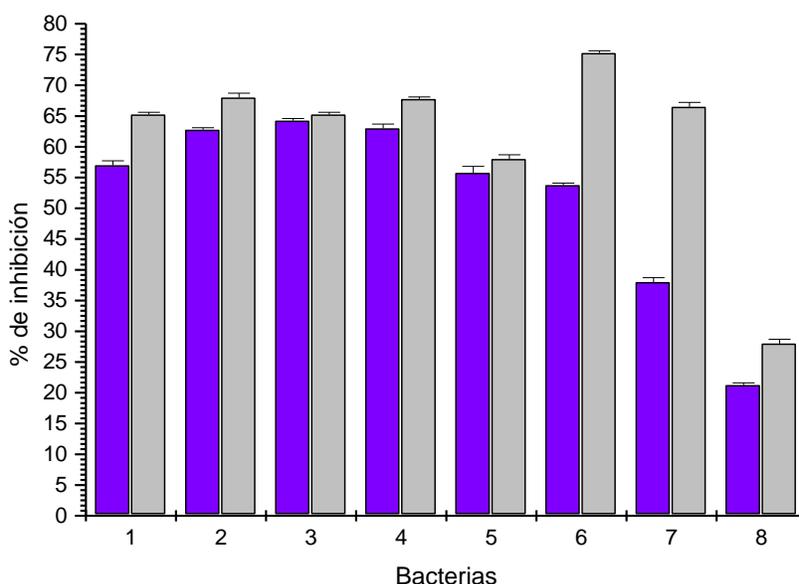


**Foto N° 8:** Inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* por *Pseudomonas fluorescens wcs 417 r*. Prueba no simultánea.



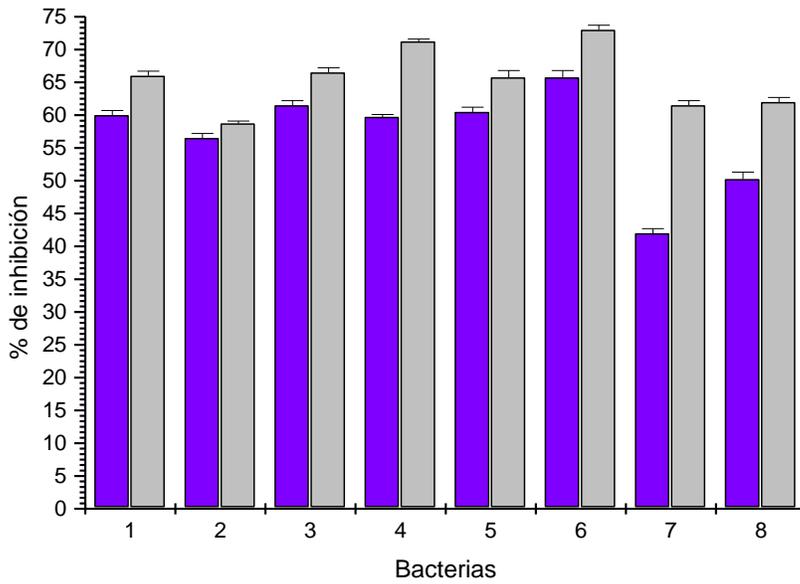
**Foto N° 9:** Inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* por *Pseudomonas fluorescens wcs 417 r*. Prueba simultánea.

En el gráfico N° 4 se observa la inhibición del crecimiento de *Fusarium virguliformes* mediante diversos microorganismos, utilizando las pruebas simultánea y no simultánea. Todas las bacterias generaron porcentajes de inhibición superiores al 50% en la prueba simultánea, con la excepción de *Azospirillum spp.* y *Serratia marcescens wf*. En todos los casos los porcentajes de inhibición de la prueba no simultánea fueron superiores a los de la prueba simultánea y en particular en el caso de *Pseudomonas fluorescens wcs 417 r* y *Azospirillum spp.* fueron muy superiores.

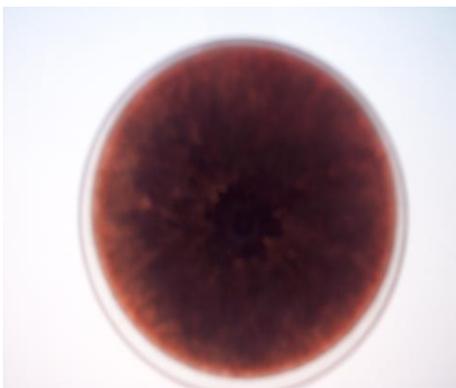


**Gráfico N° 4:** porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium virguliforme* en la prueba simultánea (■) y en la prueba no simultánea (■) correspondiente a: 1- *Pseudomona aurantiaca*, 2- *Pseudomona pútida*, 3- *Pseudomona fluorescens* chao, 4- *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), 5- *Pseudomona fluorescens* pf5, 6- *Pseudomona fluorescens* wcs 417r, 7- *Azospirillum* spp., 8- *Serratia marcenses* wf. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las barras indican la desviación estándar.

En el gráfico N° 5 se observa la inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* mediante diversos microorganismos, utilizando las pruebas simultánea y no simultánea. Los porcentajes de inhibición en la prueba simultánea superaron en todos los casos el 55%, con la excepción de *Azospirillum* spp. y *Serratia marcenses* wf. En todos los casos, los porcentajes de inhibición de la prueba no simultánea fueron superiores que los de la prueba simultánea.



**Gráfico N° 5:** porcentajes de inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* en la prueba simultánea (■) y en la prueba no simultánea (■) correspondiente a: 1- *Pseudomona aurantiaca*, 2- *Pseudomona pútida*, 3- *Pseudomona fluorescens* chao, 4- *Pseudomona fluorescens* (Rizofos, producto comercial), 5- *Pseudomona fluorescens* pf5, 6- *Pseudomona fluorescens* wcs 417r, 7- *Azospirillum* spp., 8- *Serratia marcenses* wf. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Las barras corresponden a la desviación estándar.



**Foto N° 10:** Control de crecimiento de *Macrophomina phaseolina*.



**Foto N° 11:** Inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* por *Pseudomonas fluorescens* (Rizofos, producto comercial). Prueba simultánea.

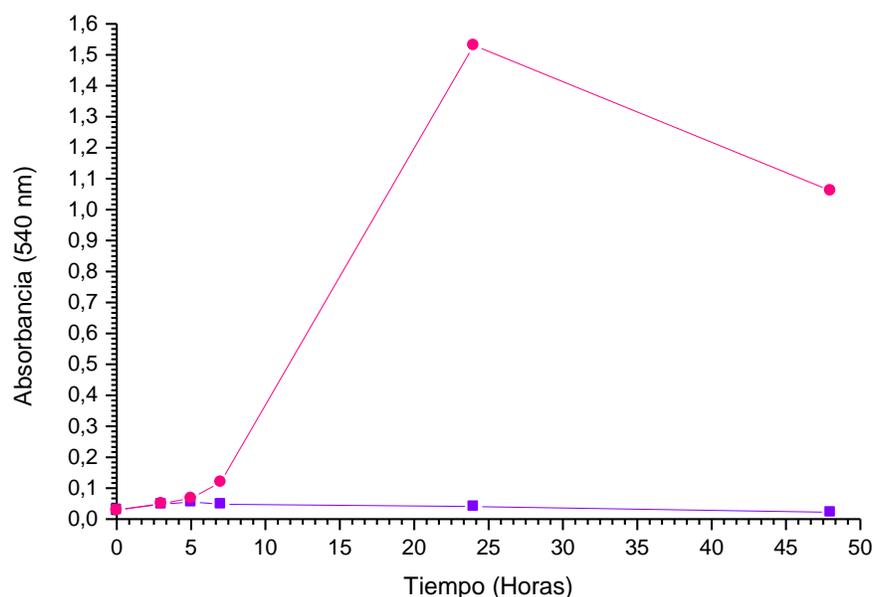


**Foto N° 12:** Inhibición del crecimiento de *Macrophomina phaseolina* por *Pseudomonas fluorescens* (Rizofos, producto comercial). Prueba no simultánea.

#### **4.4. Crecimiento de los microorganismos en diferentes condiciones**

##### **4.4.a. Crecimiento de *Pseudomonas aurantiaca* utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio.**

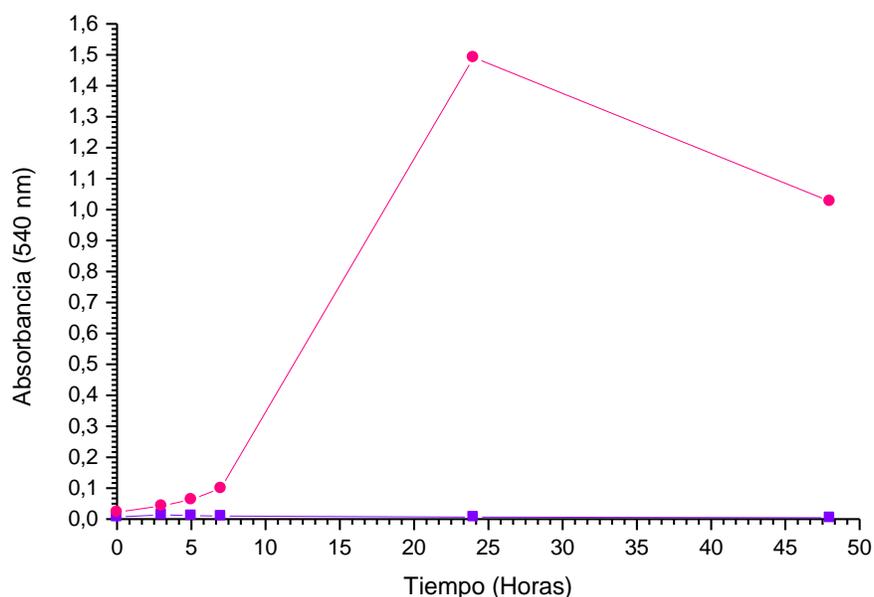
En el gráfico N° 6 se puede observar el crecimiento de *Pseudomonas aurantiaca* en función del tiempo cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio como única fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó citrato de sodio como única fuente de carbono, se puede observar un fase de latencia de aproximadamente 5 horas, seguida por una fase exponencial. En cambio cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono, la bacteria permaneció en fase de latencia. En este último caso es evidente que la bacteria no puede utilizar la carboximetilcelulosa como fuente de carbono.



**Gráfico N° 6:** crecimiento de *Pseudomonas aurantiaca* en función del tiempo. Las bacterias se incubaron en un medio líquido que contenía cloruro de amonio 20 mM y citrato de sodio 20 mM —●— o cloruro de amonio 20 mM y carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 gr/l —■—.

#### **4.4.b. Crecimiento de *Pseudomonas pútida* utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio.**

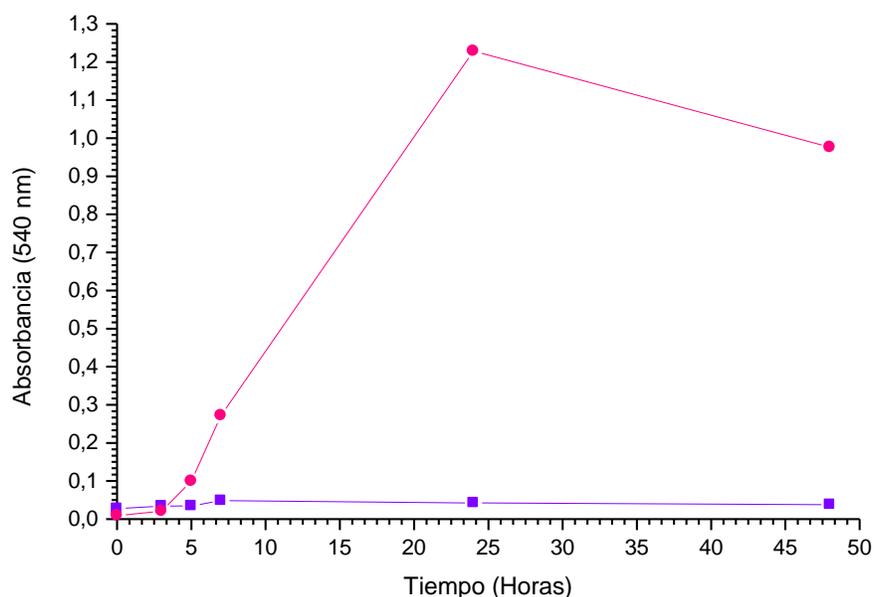
En el gráfico N° 7 se puede observar el crecimiento de *Pseudomonas pútida* en función del tiempo cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio como única fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó citrato de sodio como única fuente de carbono, se puede observar un fase de latencia de aproximadamente 5 horas, seguida por una fase exponencial. En cambio cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono la bacteria no se multiplicó.



**Gráfico N° 7:** crecimiento de *Pseudomona putida* en función del tiempo. Las bacterias se incubaron en un medio líquido que contenía cloruro de amonio 20 mM y citrato de sodio 20 mM —●— o cloruro de amonio 20 mM y carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 gr/l —■—.

**4.4.c. Crecimiento de *Pseudomona fluorescens pf5* utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio.**

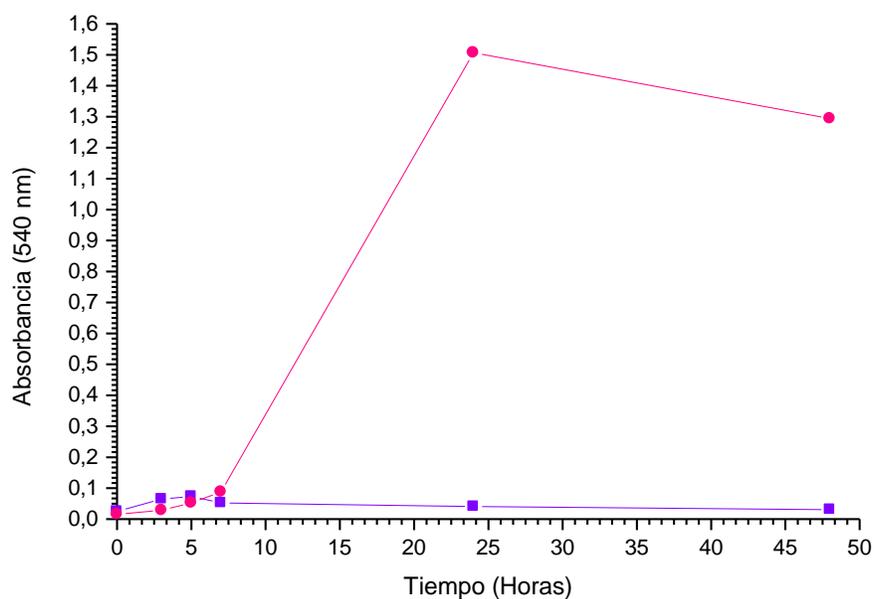
En el gráfico N° 8 se puede observar el crecimiento de *Pseudomona fluorescens pf5* en función del tiempo cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio como única fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó citrato de sodio como única fuente de carbono, se puede observar un fase de latencia de aproximadamente 5 horas, seguida por una fase exponencial. En cambio cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono la bacteria permaneció en fase de latencia, y por lo tanto no se multiplicó.



**Gráfico N° 8:** crecimiento de *Pseudomona fluorescens pf5* en función del tiempo. Las bacterias se incubaron en un medio líquido que contenía cloruro de amonio 20 mM y citrato de sodio 20 mM —●— o cloruro de amonio 20 mM y carboximetilcelulosa (CMC) 0,25gr/l —■—.

**4.4.d. Crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417r* utilizando como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio.**

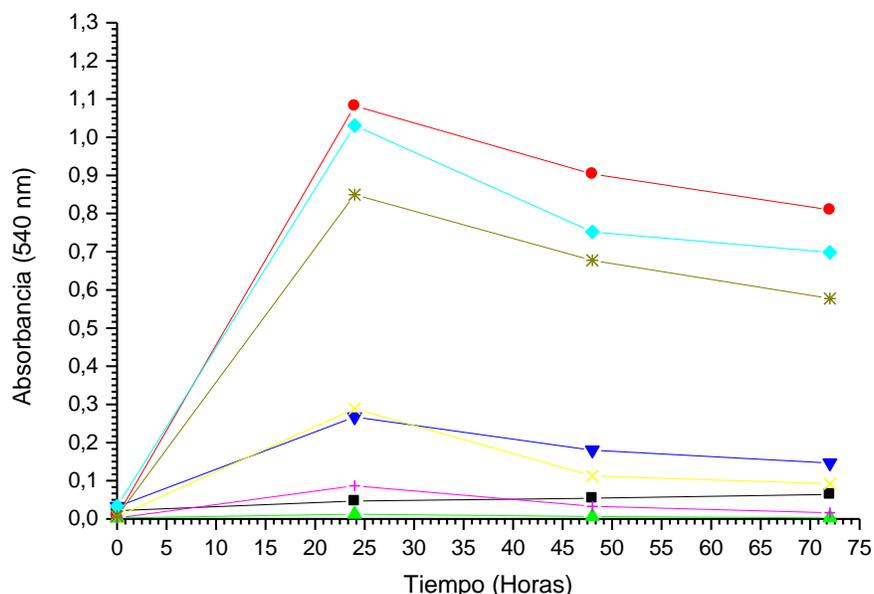
En el gráfico N° 9 se puede observar el crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417r* en función del tiempo cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) o citrato de sodio como única fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó citrato de sodio como única fuente de carbono, se puede observar una fase de latencia corta, seguida por una fase exponencial. En cambio cuando se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono la bacteria no se multiplicó.



**Gráfico N° 9:** crecimiento de *Pseudomonas fluorescens wcs 417 r* en función del tiempo. Las bacterias se incubaron en un medio líquido que contenía cloruro de amonio 20 mM y citrato de sodio 20 mM —●— o cloruro de amonio 20 mM y carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 gr/l —■—.

De manera coincidente y según los gráficos 6, 7, 8 y 9, *Pseudomonas aurantiaca*, *Pseudomonas pútida*, *Pseudomonas fluorescens pf5* y *Pseudomonas wcs 417r* pueden utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono, pero no la carboximetilcelulosa, lo que indicaría que estas bacterias carecen de celulasa. Estos resultados son coincidentes con los de la tabla X, que corresponden a los de la actividad celulasa en placa.

**4.4.e. Crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417r* con diferentes fuentes de carbono.**

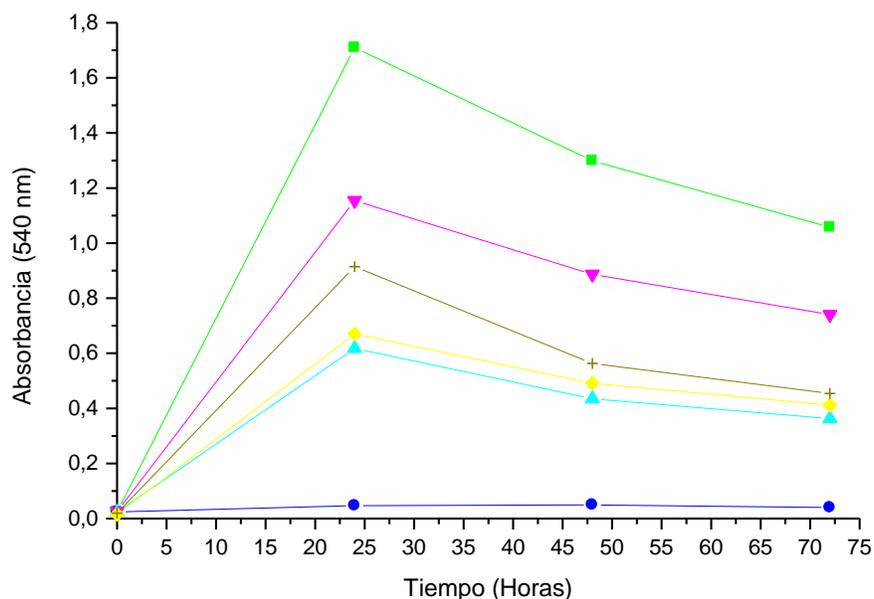


**Gráfico N° 10:** crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417 r*, en medio líquido y en presencia de citrato de sodio 20 mM y cloruro de amonio 20 mM —●—; citrato de sodio 10 mM, celulosa 2,5 g/l y cloruro de amonio 20 mM —◆—; citrato de sodio 10mM, carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20mM —\*—; citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM —▼—; citrato de sodio 2 mM, celulosa 2,5 g/l y cloruro de amonio 20 mM —×—; citrato de sodio 2 mM, carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20 mM —+—; celobiosa 20 mM y cloruro de amonio 20 mM —■—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20mM —▲—.

En el gráfico número 10 se puede observar el crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417 r* en un medio líquido, manteniendo constante la fuente de nitrógeno y variando el tipo y concentración de las diferentes fuentes de carbono. Cuando se utilizó citrato de sodio 20 mM como única fuente de carbono y cloruro de amonio 20 mM como única fuente de nitrógeno, el gráfico muestra una fase exponencial que alcanza un máximo a las 24 horas, mientras que cuando la concentración de citrato de sodio se redujo a la mitad (10 mM) y se adicionó celulosa (2,5 g/l) como fuente de carbono alternativa, el crecimiento fue inferior al caso anterior debido a que la concentración del citrato de sodio disminuyó de 20 mM a 10 mM. En base a este resultado se puede inferir que la bacteria no puede utilizar la celulosa como fuente de carbono. Cuando se determinó el crecimiento en condiciones similares al caso anterior, pero se utilizó como fuente de carbono alternativa carboximetilcelulosa, el resultado fue similar, indicando que la bacteria no puede utilizar la carboximetilcelulosa

como fuente de carbono. Cuando se utilizó citrato de sodio 2 mM como fuente de carbono el crecimiento fue inferior, mientras que cuando a dicha concentración de citrato de sodio se le adicionó celulosa 2,5 g/l como fuente alternativa de carbono, no hubo incremento del crecimiento, lo que confirma que la bacteria no puede utilizar la celulosa como fuente de carbono. Cuando al medio contenía citrato de sodio 2 mM se le adicionó carboximetilcelulosa (0,25 g/l), el crecimiento tal como se indica en el gráfico 10, no superó al control que contenía únicamente citrato de sodio 2 mM, lo que confirma que la bacteria no utiliza la carboximetilcelulosa como fuente de carbono. Cuando se determinó el crecimiento bacteriano tanto en un medio que contenía como única fuente de carbono carboximetilcelulosa (0,25 g/l), o celobiosa (20 mM) no hubo crecimiento, lo que indicaría que la bacteria tampoco puede utilizar la celobiosa como fuente de carbono.

#### 4.4.f. Crecimiento de *Pseudomona aurantiaca* con diferentes fuentes de carbono

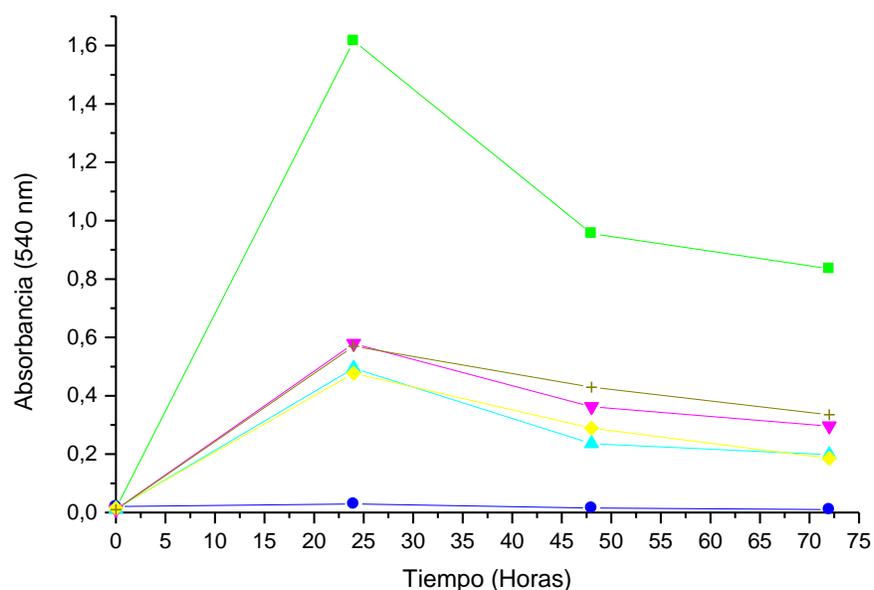


**Gráfico N° 11:** citrato de sodio 20 mM y cloruro de amonio 20 mM —■— ; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20 mM —●—; citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM—▲—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —+—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM —◆— ; citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —▼—.

En el gráfico número 11 se puede observar el crecimiento de *Pseudomona aurantiaca* en diferentes condiciones con respecto a la fuente de carbono. Se puede observar que con una concentración de citrato de sodio 20 mM, la bacteria alcanza un crecimiento máximo a las

24 horas. Cuando la concentración de citrato de sodio disminuyó a 6 mM el crecimiento fue menor. Cuando al medio que contenía citrato de sodio 6 mM se le adicionó carboximetilcelulosa (0,25 g/l) no se observó incremento del crecimiento, lo que indica que la bacteria no puede utilizar la carboximetilcelulosa como fuente de carbono. Cuando la concentración de citrato disminuyó a 2 mM el crecimiento obviamente fue menor. Un resultado similar se obtuvo cuando además de citrato de sodio 2 mM se adicionó carboximetilcelulosa (0,25 g/l). Cuando la bacteria creció con carboximetilcelulosa (0,25g/l) como única fuente de carbono no se observó crecimiento.

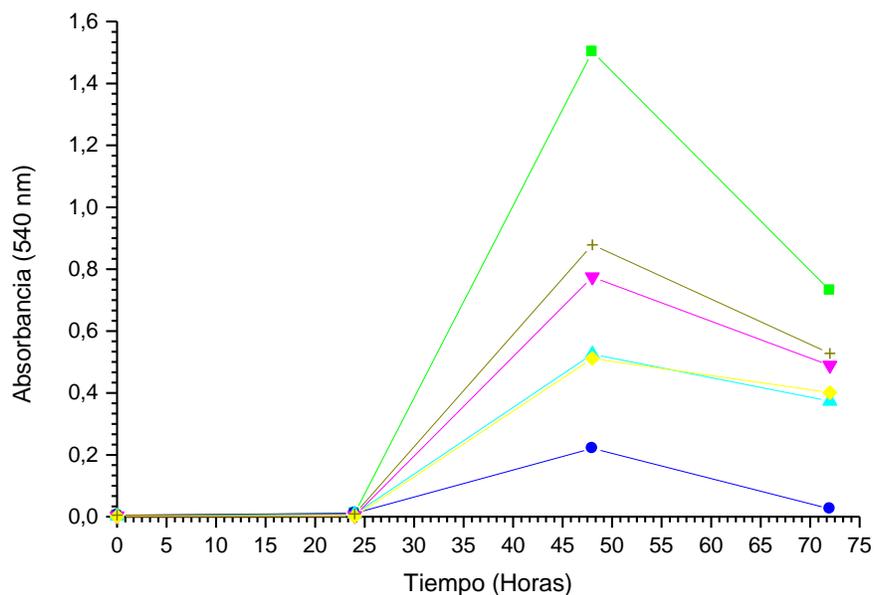
#### 4.4.g. Crecimiento de *Pseudomona fluorescens chao* con diferentes fuentes de carbono



**Gráfico N° 12:** citrato de sodio 20 mM y cloruro de amonio 20 mM —■— ; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20 mM —●—; citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM—▲—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —+—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM—▼—; citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —▽—.

Los resultados del crecimiento obtenidos según se muestra en el gráfico número 12 utilizando *Pseudomona fluorescens chao*, fueron similares a los obtenidos con *Pseudomona fluorescens wcs 417 r* (gráfico N° 10) y con *Pseudomona aurantiaca* (gráfico N° 11). En base a los resultados del crecimiento de *Pseudomona fluorescens wcs 417 r*, de *Pseudomona aurantiaca* y de *Pseudomona fluorescens chao*, con diferentes fuentes de carbono, podemos concluir que las tres bacterias se comportaron de forma similar.

4.4.h. Crecimiento de *Bradyrhizobium spp. C145* con diferentes fuentes de carbono



**Gráfico N° 13:** citrato de sodio 20 mM y cloruro de amonio 20 mM —■— ; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l y cloruro de amonio 20 mM —●—; citrato de sodio 2 mM y cloruro de amonio 20 mM —▲—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —+—; carboximetilcelulosa (CMC) 0,25 g/l, citrato de sodio 2mM y cloruro de amonio 20 mM —◆— ; citrato de sodio 6 mM y cloruro de amonio 20 mM —▼—.

Cuando se determinó el crecimiento de *Bradyrhizobium spp. C 145* en diferentes condiciones, en lo que respecta a la fuente de carbono, se observó un período de latencia de 24 horas en todos los casos (gráfico N° 13). Cuando el crecimiento de dicha bacteria se determinó en presencia de citrato de sodio 20 mM, se observó un crecimiento máximo a las 48 horas. Se observó una disminución del crecimiento cuando la concentración de citrato de sodio se redujo a 6 mM. No se observó un incremento significativo del crecimiento cuando la determinación se realizó con citrato de sodio 6 mM y carboximetilcelulosa (0,25 g/l), o sea que *Bradyrhizobium spp. C 145* que expresa actividad celulasa (tabla 10), no puede utilizar la carboximetilcelulosa como única fuente de carbono. Cuando la concentración de citrato de sodio se redujo a 2 mM el crecimiento fue mucho menor, siendo similar cuando además del citrato de sodio 2 mM se le adicionó carboximetilcelulosa (0,25 g/l). No se

observó un aumento significativo del crecimiento cuando la bacteria se incubó en presencia de carboximetilcelulosa (0,25 g/l) como única fuente de carbono.

**7. Bibliografía**

Abeles, F.B. 1973. Ethylene in Plant Biology. Academic Press. New York.

Abeles, F.B, Morgan, P.W and Saltveit, M.E, Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology, 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press. New York.

Abrosimova, L.N and Revut, I.B. 1964. Biological activity and the composition of soil air in the plow layer. Sov. Soil Sci. 7:682-691.

Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. Wiley & Sons. New York. pp. 467.

Alexander, B.D and Zuberer, A.D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fert. Soils. 12:39-45.

Almeida, A.M.R, Abdelnoor, R.V, Arias, C.A.A, Carialho, V.P, Jacoud Filho, D.S, Marin, S.R.R. 2003. Genotypic Diversity among Brazilian isolate *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. Fitopatologia Brasileira. 28:279-285.

Altamirano, F, Correa, N, Schroder, E y Rosas, S. 1996. Actividad biocontrol de *Pseudomonas aurantiaca* bajo condiciones in vitro. XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Bolivia. 173-175 b.

Alvarez, M.C, Olguin, C and Perez, A. 1989. Incorporación de suelos delgados de lomereos a la producción agrícola a través de abono orgánico, evaluación del proceso mediante cultivos y cultivos asociados. Investigación en el colegio de postgraduados y sus perspectivas. XXX Aniversario Colegio de Postgraduados. Montecillos. México. 76.

Antoun, H and Kloepper, J.W. 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Encyclopedia of Genetics (eds. S. Brenner and J.H. Miller), Academic Press. New York. 1477-1480.

Aoki T, O'Donnell, K, Homma, Y and Lattanzi, A. 2003. Sudden death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the the *Fusarium solani* species complex, *Fusarium virguliforme* in North America and *Fusarium tucumaniae* in South America. Mycologia. 95:660-684.

Aoki, T, O'Donnell, K, Homma, Y, Lattanzi, A, Yorinori, J. 2004. Four *Fusarium* species cause soybean sudden death syndrome. En: Procc. VII World Soybean Research Conference. 615-618.

Asanuma, S, Tanaka, H and Yatazawa, M. 1979. Rhizoplane microorganisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy. Soil Sci. Plant Nutr. 25:539-551.

- Asea, P.E.A, Kucey R.M.N and Stewart J.W.B. 1988. Inorganic phosphate solubilization by to *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.* 20(4):459-464.
- Atlas, R.M and Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* Pearson educación, S.A. (Madrid). Cap. 4.
- Atzorn, R, Crozier, A, Wheeler, C.T and Sandberg, G.1988. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* root. *Planta.* 175:532-538.
- Babana, H and Antoun, A .2006. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum L.*) in Mali. *Plant and Soil.* 287:51-58.
- Bagnasco, P, De La Fuente, L, Gualtieri, G, Noya, F and Arias, A. 1998. *Fluorescent Pseudomonas spp.* as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30:1317-1322.
- Baker, K.S and Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens.* San Francisco: Freeman. Reprinted 1982. St. Paul, MN. Am. Phytopathol. Soc.USA. 433.
- Bakker, A.W and Schippers, B. 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19(4):451-457.
- Balandreau, J and Knowles, R. 1978. The Rhizosphere. En Y. R. Dommergues y S.V. Krupa (eds). *Interaction Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants.* Elsevier, Amsterdam. 243-268.
- Bangera, M.G and Thomashow, L.S. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens Q2-87.* *Mol. Plant Microbe Int.* 9:83-90.
- Bar,T and Okon,Y. 1992. Induction of indole 3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasiliense sp7.* *Symbiosis.* 13:191-198.
- Bar, T and Okon, Y. 1995. Conversion of tryptophan indole-3-piruvic acid, indole-3-lactic acid and indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasiliense Sp7.* In *Azospirillum VI* and related microorganism, genetic-physiology-ecology. Berlin. Heidelberg. Germany. Springer Verlang. 637:347-359.
- Bashan, Y and Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608
- Bashan, Y and Holguin, G. 1998. Proporsal for the division of plant growth promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB and PGPB. *Soil Biology Biochemistry.* 30:1225-1228.

- Bender, C.L, Rangaswamy, V and Loper, J.1999. Polyketide production by plant associated *Pseudomonads*. Annu. Rev. Phytopathol. 37:175-196.
- Bengera, M.G and Thomashow, L.S. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of de antibiotic 2,4-diacetylphoroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens Q2-87*. Mol. Plant Microbe Int. 9:83-90.
- Bianciotto, V, Andreotti, S, Balestrini, R, Bonfante, P and Perotto, S. 2001. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomona fluorescens chao* show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. The American Phytopathological Society. 14:255-260.
- Blamey, F.P.C, Edmeades, D.C, Asher, C. J, Edwards, D.C, Wheeler, D.M. 1991. Evaluation of solution culture technique for studying aluminum toxicity in plants. In: Wright RJ, Baligar VC, Murrmann RP (eds.), Plant-Soil Interactions at Low pH. 905-912. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. The Netherlands.
- Bloemberg, G.V and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promoting and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biology. 4:343-350.
- Blumer, C and Hass, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiol. 173:170-177.
- Bowen, G.D and Rovira, A.D. 1976. Microbial colonization of plant roots. Ann. Rev. Phytopatol. 14:121-144.
- Bowen, G.D. 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In contempory microbial ecology, eds. D.C. Elwood, J.N. Hedger, M.J. Latham, J.M. Lynch and J.H. Slater. London Acedemic Press. 283-304.
- Brian, P.E, Wrigth, J.M, Stubbs, J and Way, A.W. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plant. Nature. 167:347-349.
- Briat, J. F. 1992. Irion assimilation and storage in prokaryotes. J. Gen. Microbiol. 138: 2475-2483.
- Bric, J.M, Bostock, R.M and Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbiol. 57:535-538.
- Brown, M.E. 1974. Seed and root bacterization. Annual Rev. of Phytopathology. 12:181-197.
- Burd, G.I, Dixon, D.G and Glick, B.R.1998. A plant growth promoting bacterium that decreases niquel toxicity in plant seedlings. Applied and Environmental Microbiology. 64:3663-3668.
- Burr, T.J and Caesar, A. 1984. Beneficial plant bacteria critical. Rev. Plant Sci. 2:1-20.

- Buyanovsky, G.A and Wagner, G.H. 1983. Annual Cycles of Carbon Dioxide Level in Soil Air. Soil Sci. Soc. Am. J. 47:1139-1145.
- Buysens, S, Heungens, K, Poppe, J and Höfte, M. 1996. Involvement of Pyochelin and Pyoverdine in suppression of *Pythium* induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Appl. Environ. Microbiol. 62:365-871.
- Cabrera, M.G, Gutierrez, S.S, Alvarez, R.E, Raimondo, M.R y Gomez, D.E. 2001. Podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*) en soja sometida a estrés hídrico en el Nordeste de Argentina. En acta de resúmenes en el XXXIV Congreso Brasileiro y XI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. San Pedro, SP.Brasil.
- Cabrera, S, Rovera, M, Correa, N y Rosas, S. 1999. Actividad del biocontrol en *Pseudomonas aurantiaca*: Sustratos que inducen la producción de compuestos antifúngicos. Biología del suelo. 2:279-281.
- Campbell, R and Rovira, A.1985. A study of the rhizosphere by scanning electron microscopy. Soil Biol. Biochem. 5:747-752.
- Castañeda-Agulló, M. 1956. Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. J. Gen. Physiol. 89:369-373.
- Castric, K.F, Devitt, D.A and Castric, P. 1981. Influence of aeration on cyanide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Microbiol. 5:223-226.
- Chabot, R, Antoun, H and Cesca, M.P.1993. Simulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvent le phosphore inorganique. Can. J. Microbiol. 39:941-947.
- Chanway, C.P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil and pea. Soil Biol. Biochem. 21:511-517.
- Chet, I and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48:37-43.
- Compant, S, Duffy, B, Novak, J, Clement, C and Ait Barka, E. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles mechanisms of action and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71(9):4951-4959.
- Conrath, U, Pieterse, C.M.J and Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant pathogen interactions. Trends in Plant Science. 7:210-216.
- Cook, R.J and Baker, K.R. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, MN. Am. Phytopathol. Soc. USA. 539.
- Curl, E.A. and Truelove, B. 1986. The Rhizosphere. Advanced series in Agricultural Sciences, vol.15 (eds. D.F.R. Bommer, B. R. Sabey, Y. Vaadia, G.W. Thomas and L. D. Van Vleck), Springer-Verlag, Berlin. 286.

- Davison, J. 1988. Plant beneficial bacteria (Review). *Biotechnology*. 6:282-286
- De Freitas, J.R, Gupta, V.V.S.R and Germida, J.J. 1993. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *Pseudomonas putida* R105 on the growth and N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Boil. Fertil. Soils*. 16:215-220.
- Derylo, M and Skorupska, A. 1993. Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Soil*. 154:211-217.
- Devliegher, W, Syamsul, Arif, M.A and Rerstraete, W. 1995. Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11):3865-3871.
- Dommerges, Y.R and Krupa, S.V. 1978. Interaction Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants. Elsevier, Amsterdam. 243-268.
- Dowling, D.N and O’Gara F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant diseases. *Trends Biotechnol.* 12:133-141.
- Duchaufour, P. 1976. Dynamics of organic matter in soil of temperate regions: Its action on pedogenesis. *Geoderma*. 15:31-40.
- Duffy, B and Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2429-2438.
- Duijff, J, Petler, A, Bakker, M and Schippers, B. 1993. Suppression of *Fusarium* wilt carnation by *Pseudomonas putida* wcs 358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology*. 4:279-288.
- Ekschmitt, K and Griffiths, B. S. 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Applied Soil Ecology*. 10:201-205.
- Esashi, Y.1991. Ethylene and seed germination. In: *The Plant Hormone Ethylene*, (A.K. Matoo, J.C. Suttle, eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. 133-157.
- Estrada, J, Rossi, M, Andres, J, Rovera, M, Correa, N and Rosas, S. 2000. Greenhouse evaluation of *Pseudomonas aurantiaca* formulated as inoculant for phytopathogenic fungi biocontrol. Fifth International PGPR Workshop (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).
- Evans, H, Stracey, G and Burris, R.H. 1991. Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall. New York. Growth enhancement and development modifications of in vitro nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96:928-929.
- Ferraris, G y Couretot, T. 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp.) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria*. EEA INTA Pergamino. IX 25:137-139.

- Flaishman, M.A, Eyal, Z, Zilberstein, A, Voisard, C and Hass, D. 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch of leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. Mol. Plant Microbe Int. 9:642-645.
- Flemming, H.C, Neu, T.R and Wozniak, D.J. 2007. Guest commentary. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. Journal of bacteriology. 189:7945-7947.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 26:75-91.
- Fredrickson, J.K and Elliot, L.F. 1985 (a). Colonization of winter wheat root by inhibitory Rhizobacteria. Soil Sci. Soc. Am. J. 49:1172-1177.
- Fridlender, M, Inbar, J and Chet, I. 1993. Biological control of soil borne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biol. Biochem. 25: 27-30.
- Frioni, L, 1999. Procesos Microbianos. Tomo I y II. Ed. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. 282-286.
- Gallagher, L and Manoil, C. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. J. bacteriol. 183:6207-6214.
- Gaskins, M.H, Albrech, S.L, Hubbell, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. Agric. Ecosyst. Environ. 12:99-116.
- Glick, B.R, Jacobson, C.B, Schwarze, M.M.K and Pasternak, J.J. 1994. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomona putida* GR12-2. Canadian Journal of Microbiology. 40:911-915.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant grown by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41:109-117.
- Glick, G.R, Jacobson, C.B, Schwarze, M.M.K and Pastenak, J.J. 1995. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant Growth Promoting Rhizobacterium *Pseudomona putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Canadian Journal of Microbiology. 40:911-915.
- Glick, B.R and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. Biotechnology Advances. 15:353-378.
- Glick, B.R, Liu, C.P, Ghosh, S and Dumbroff, E.B. 1997. The effects of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomona putida* GR12-2 on the development of canola seedlings subjected to various stresses. Soil Biology and Biochemistry. 29:1233-1239.

- Glick, B.R, Penrose, D.M and Li, J.1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 190:63-68.
- Goldstein, A.H and Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Bio/Technology*. 5:72-74.
- Goldstein, A.H, Rogers, R.D and Mead, G. 1993. Mining the microbe. *Bio/Technology*. 11:1250-1254.
- Gordon, S.A and Weber, R.P. 1951. Colorimetric stimation of indole acetic acid. *Plant Physiol*. 26:192-195.
- Granato, T.C and Raper Jr, C.D. 1989. Proliferation of maize (*Zea mays L*) roots in response to localized supply of nitrate. *J. Exp. Bot*. 40:263-275.
- Gray, J.X and Rolfe, B.G. 1990. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol. Microbiol*. 4:1425-1431.
- Gray, E.J and Smith, D.I. 2005. Intracellular and extracellular PGPR commonalities and distinction and the plant bacterium signalling processes. *Soil Biology Biochemistry*. 37:395-412.
- Grichko, V.P and Glick, B.R. 2001. Ethylene and fooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:11-17.
- Gurusiddaiah, S, Weller, D.M, Sarkar, A and Cook, R.J. 1986. Characterization of an antibiotic produced by strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibiting *Gaeumannomyces granibis var. tritici* and *Phytium spp*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 16:27-30.
- Gutierrez Mañero, F.J, Acero, N, Lucas, J.A and Probanza, A.1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa (L) Gaertn*) on characterization and biological assays of metabolites from growth inhibiting bacteria. *Plant and Soil*.182:67-74.
- Gutierrez Mañero, F.J, Ramos, B, Probanza, A, Mehouchi, J, Tadeo, F.R and Talón, M. 2001. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumillus licheniformis* produce high amounts of fhsiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 111:206-211.
- Gyaneshwar, P, Kurmar, G and Parekh, L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 14:669-673.
- Gyaneshwar, P, Kurmar, G, Parekh, L and Jand Poole, P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245 (1):83-93.
- Hammer, P.E, Hill, S, Lam, S.T, Van Pée, K.H and Ligon, J.M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pirrolnitrin. *Appl. Environ*.63: 2147-2154.

- Hancock, R.E.W and Chapple, D.S. 1999. Peptide antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-1323.
- Harley, J and Russell, R. 1979. *The soil root interface.* Academic Press. New York.
- Harman, G.E and Lumsden, R.D. 1990. Biological disease control. *The Rhizosphere.* Eds. Lynch, M., Wiley, J, Sons, C. U. K. 259-279.
- Hayes, P.R. 1963. Studies on marines flavobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 30:1-19.
- Hernandez, Y. 1998. Fijación Biológica del Nitrógeno. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 32:233-245.
- Hointink, H.A.J, Stone, A.G and Han, D.Y. 1997. Supresion of plant diseases by compost. *Hort. Sci.* 32:184-197.
- Holguin, G and Glick, B.R. 2000. Inoculation of tomato plants with *Azospirillum brasilense* transformed with the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4. Ausburn University.
- Hollstein, U and Marshall, L.G. 1972. Biosynthesis of Fhenazines. *J. Org. Chem.* 37: 3510-3514.
- Howell, W.J and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacteria. *Phytopathol.* 69:480-482.
- Howell, W.J and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Phyitium ultimun* induced Damping-Off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology.* 70:712-715.
- Howie, W.J, Cook, R.J and Weller, D.M. 1987. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by *fluorescent pseudomonads* suppressive to take-all. *Phytopatology.* 77:286-292.
- Ivancovich, A, Botta, G y Annone, J. 1992. Síndrome de la muerte repentina en cultivo de soja en el área de EEA. INTA, Pergamino. Carpeta de Producción Vegetal. Tomo XI. Información N° 94.
- Jackson, A.O and Taylor, C.B. 1996. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* 78:1697-1700.
- Jacobson, C.B. 1993. Isolation and characterization of ACC deaminase from *Pseudomona pútida* GR 12-2. Msc. Thesis Dept. Biol. University of Waterloo. Waterloo. Ontario. Canada.
- Jacobson, C.B, Pasternak, J.J and Glick, B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane 1-carboxilate deaminase from plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas pútida.* GR 12-2. *Can. J. Microbiol.* 40:1019-1025.

Jensen, B, Knudsen, D and Jensen, J. 1996. Hockenhull Application of antagonistic microorganism to seeds to control Fungal plant pathogens. Combined Proceeding Plant Propagator's Society. Vol. 46.

Jimenez-Delgado, R., Virgen-Calleros, G, Tabares-Franco, S and Olalde-Portugal, V. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: Agrobiotecnología. Avance y Perspectiva. 20:395-400.

Johnson, J.F, Allan, D.L, Vance, C.P, Weiblem, G. 1996. Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus* contribution to organic acid exudation by proteoid roots. Plant Physiol. 112:19-30.

Jones, D.L, Glashauser, C, De Swiniarski, R, Baker, F, Carey, T.J. R. Comfort, W. Cornelius, J. L. Escudí, M. Gazzaly, A. Green, M. Haji-Saeid, N. Hintz, G. Igo, J. B. McClelland, J. M. Moss, S. Nanda C. A. Whitten. 1994. Energy dependence of the  $^{12}\text{C}(\text{p},\text{p}')^{12}\text{C}^*$  reaction from 200 to 800 MeV. Phys. Rev.50:1982-1990.

Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere. Review Plant Soil. 205:25-44.

Kamensky, M, Ovadis, M, Chet, I and Chernin, L. 2003. Soilborne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotium* diseases. Soil Biol. Biochem. 35:323-331.

Katsy, E. 1997. Participation of auxins in regulation of bacterial and plant gene expression. Russian Journal of Genetics. 33:301-306.

Kauffmann, S, Legrand, M, Geofroy, P and Fritig, B. 1987. Biological function of Pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have  $\beta$ -1,3-glucanase activity. EMBO J. 6:3209-3212.

Keel, C, Schnider, U, Maurhofer, M, Voisard, C, Laville, J, Buger, U, Wirtner, P, Haas, D and Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant Microbe Interact. 5:4-13.

Kim, D.H and Misaghi, I.J. 1996. Biocontrol performance of two isolates of *Pseudomonas fluorescens* in modified soil atmospheres. Phytopathology. 86:1238-1241.

Kim, J.T, Giapintzakis, J and Ginsberg, D.M. 1996. Sign reversal of the Hall effect in superconducting  $\text{YBa}_2(\text{Cu}_{1-x}\text{Ni}_x)_3\text{O}_{7-\delta}$  single crystals. Phys. Rev. B. 53:5922-5926.

Kloepper, J. W and Schroth, M.N. 1978. Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Station Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie, Angers. 2:879-882.

Kloepper, J.W, Leong, J, Teintze, M and Schroth, M.N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. Curr. Microbiol. 4: 317-320.

- Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and Schroth, M. N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci. 60-64.
- Kloepper, J. W. 1992. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology, Eds. F. Blaine Hetting Jr. Marcel Dekker Inc. 255-274.
- Knoester, M, Van Loon, L.C, Van den Heuvel, J, Hennig, J, Bol, J.F and Linthorst, H.J.M. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95:1933-1937.
- Kremer, R.J and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Curr. Microbiol. 43:182-186.
- Kucey, R.M.N, Janzen, H.H and Leggett, M.E.1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. Adv. Agon. 42:199-228.
- Lang, A. 1956. Bolthing and flowering in biennial *Hyoscyannus niger* induced by giberellic acid. Plant physiology. 31 (suppl.) XXXV.
- Laville, J, Blumer, C, Von Schroetter, C, Gaia, V, Défago, G, Keel, C and Hass, D. 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens chao*. J. Bacteriol. 180:3187-3196.
- Lawton, K.A, Friedrich, L, Hunt, M, Weymann, K, Delaney, T, Kessmann, H, Staub, T and Rayls, J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resitence in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant Journal. 10:71-82.
- Lebuhn, M, Heilmann, B and Hartmann, A. 1994. Effects of drying rewetting stress on microbial auxin production and L- Tryptophan catabolism in soils. Boil. Fertile Soils. 18:302-310.
- Legrand, M, Kauffmann, S, Geoffroy, P and Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 84:6750-6754.
- Leigh, J.A and Coplin, D.L. 1992. Exopolisacarides in plant-bacterail intetactions. Annu. Rev. Microbiol. 46:307-346.
- Leong, J. 1986. Siderophore: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogen. Annu. Rev. Phytopathol. 24:187-209.
- Lifshitz, R, Kloepper, J.W, Kozlowski, M, Simonson, C, Carlson, J. Tipping, E.M and Zaleska, I. 1987. Growth promotion of canola seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotics condition. Canadian Journal of Microbiology. 33:390-395.
- Lim, H.S, Kim, Y.S and Kim, S.D. 1991. *Pseudomona stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani* an agent of plant root rot. Applied and Enviromental Microbiology. 57:510-516.

- Lindbergh, G.D. 1981. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease*. 65:680-683.
- Lippmann, B, Leinhos, V and Bergmann, H. 1995. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays L.*) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* y *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. *Angew Bot.* 69:31-36.
- Liu, S.T, Lee, L.Y, Tai, C, Hung, C.H, Chang, Y.S, Wolfram, J, Rogers, R and Goldstein, A.H. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli HB101*: Nuclotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*. Vol 174, N. 18. pp. 5814-5819.
- Loper, J. E and Buyer, J.S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 4:5-13.
- Lynch, J. M.1976. products of soil microorganisms in relation to plant growth. *CRC Critical Rev. in Microbiology*. 5:67-107.
- Lynch, J. M. 1982a. The Rhizosphere. En R. G. Burns y J. H. Slater (eds.). *Experimental Microbiol Ecology*. Blackwell, Oxford, Inglaterra. 395-411.
- Lynch, J. M. 1982b. *Soil Biotechnology. Microbiological Factors in Crop Productivity*. Blackwell, Oxford, Inglaterra.
- Lynch, J.M. 1990. *The Rhizosphere* (ed. J.M. Lynch), Jhon Wiler And Sons, Ltd, Chichester. 458.
- Machado, C.C. 1987. *Macrophomine phaseoline*: biological behavior of isolates spatial pattern of microesclerotia in the soil and incidence on soybeans (PhD Thesis). University of Illinois. Urbana Champaign.
- Marschaner, H. 1986. Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions mineral nutrition of higher plants. *Acedemic Press London*. 195-268.
- Maurhofer, M, Keel, C, Schnider, U, Voisard, C, Haas, D and Défago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity. *Phythopathol*. 82:190-195.
- Mayek Perez, N, Lopez Castaneda, C, Lopez Salina, E, Cumpion Gutierrez, J and Acosta Gallego, J. 2001. Resistencia a *M. phaseolina* en frijol común en condiciones de campo de México. *Agrociencia*. 35,006, 649-661.
- Mazzola, M, Cook, R.J, Thomashow, L.S, Weller, D.M and Pierson III, L.S. 1992. Contribution of fhenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of *fluorescent Pseudomonas* in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol*. 58:2616-2624.
- Mc Sppaden Gardener, B.B, Schreoder, K.L, Kalloger, S.E, Raaijmakers, J.M, Thomashow, L.S and Weller, D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of phtD

containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1939-1946.

Métraux, J. P, Signer, H, Ryals, J, Ward, E, Wyss-Benz, M., Gaudin, J, Raschdorf, K, Schmid, E, Blum, W and Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 250:1004-1006.

Meuwley, P and Pilet, P.E. 1991. Local treatment with indol-3-acetic acid induces differential growth responses in *Zea mays L.* roots. *Planta.*185:58-64.

Mok, D.W.S and Mok, M.C. 2001. Cytokinin metabolism acid action. *Annual Review of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 52:89-118.

Morgan, P.W and Drew, C.D. 1997. Ethylene and plant response to stress. *Physiol. Plantarum.* 100:620-630.

Neilands, J. B and Leong, S. A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu. Rev.Plant Physiol.* 37:187-208.

Newman, E. I. 1978. Root microorganisms. Their significance in the ecosystem. *Biological Rev.* 53:511-554.

Nielsen, N.M, Sorensen, F, Johannes, F. and Pedersen, H.C. 1998. Secondary metabolite and endoquitinase-dependent antagonism toward plant pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolate from sugar beet rhizosphere. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64:3563-3569.

Nieto, F and Frankenberger, W.T. 1989. Biosynthesis of cytokinins in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53:735-740.

O´ Sullivan, D.J and O´ Gara, F. 1992. Traits of *fluorescens Pseudomonas spp.* Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56:662-676.

Palleroni, N. J. 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci: family I. *Pseudomonadaceae*. Genus I *Pseudomonas*. In *Bergey´s Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. I. Krieg N.R and Hold J.G. (eds.) William and Wilkins Co. Baltimore Md. 141-199.

Palti, J. 1981. Cultural practices and infectious crop diseases. *Advanced Series in Agricultural Sciences*. (eds.) Yaron, B. New York, Springer-Verlag. 9:243.

Peck, S.C and Kende, H. 1995. Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indol-3-acetic acid in etiolated peas. *Plant and Molecular Biology*, 28:293-301.

Pharis, R.P and King, R.W. 1985. Gibberellins and Reproductive Development in Seed Plants. *Annual Review of Plant Physiology.* 36:517-568.

Phinney, B.O. 1956. Growth responses of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 42:185-9.

- Picard, C and Bosco, M. 2005. Maize heterosis affects the structure and dynamic of indigenous rhizospheric auxins producing *Pseudomonas* populations. FEMS Microbiology Ecology. 53:349-357.
- Pierson III, L.S and Pierson, E.A. 1996. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aerofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. FEMS Microbiol. Let. 136:101-108.
- Pierson, L.S. III, Wood, D.W, Pierson, E.A and Chancey, S.T. 1998. N-acyl-homoserine lactone mediated gene regulation in biological control by *fluorescent pseudomonads*. J. Plant Pathol. 104:1-9.
- Pilet, P.E and Saugy, M. 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. A critical re-examination. Plant Physiology 83:33-38.
- Radjacommare, R, Kandan, A, Nandakumar, R, Ramanathan and Samiyappan, R. 2003. Influence of root colonizing bacteria on chitinase production against *Rhizoctonia Solani* in rice. 6 International PGPR Workshop, Calicut, India.
- Radman, R, Saez, T, Bucke, C and Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnology and Applied Biochemistry. 37:91-102.
- Raisman, J. 2006. Comunicación Personal. Universidad Nacional del Nordeste. Chaco. Argentina. 29:11-2006.
- Richardson, A.E.1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In soil biota. Management in Sustainable Systems. Eds. C.E. Pankhurst. pp. 50-62.
- Rodriguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances. 17: 319-339.
- Rojas Avelizapa, L.I, Cruz Camarillo, R, Guerrero, M.I, Rodriguez Vazquez, R, Ibarra, J.E. 1999. Selection and Characterization of a proteochitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis* able to grow in shrimp waste media. World J. Microbiol. Biotechnol. 15: 299-308.
- Rollan, M, Monaco, C, Lampugnani, G, Arteta, N. 1998. Variación de la población de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotium* en el suelo por la aplicación de agroquímicos. En el Primer Congreso Argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina. 27.
- Rosas, S, Rovera, M, Cabrera, S, Correa, M, Reta, M, Andres, J y Correa, N. 2000. Aislamiento e identificación de pigmento de *Pseudomonas aurantiaca* para su aplicación en biocontrol. En Anales Científicos de XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y Defensa del Medio Ambiente. 18-27.
- Rovera, M, Cabrera, S, Correa, N. y Rosas, S. 1998. Producción y caracterización de un pigmento antifúngico de *Pseudomonas aurantiaca*. In Memorias de XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Matirín, Venezuela. 134-135.

- Rovera, M. 2000. Biocontrol de Hongos Fitopatógenos por *Pseudomonas aurantiaca*. Tesis de Magister en Biotecnología.
- Rovira, A. D and Campbell, R. 1974. Scanning electron microscopy of microorganisms on roots of wheat. *Microbiol. Ecology*. 1:15-23.
- Rupe, J.C. 1995. Effect of the plant age maturity group and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*. 79:139-143.
- Ryals, J.A, Neuenschwander, U.H, Willits, M.G, Molina, A, Steiner, H and Hunt, M.D. 1996. Systems Acquired Resistance. *Plant Cell*. 8:1809-1819.
- Ryder, C, Byrd, M and Wozniak, D.J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*. 10:644-648.
- Salisbury, F.B. 1994. The role of plant hormones. *Plant-Environment Interactions* (ed. R.E. Wilkinson). Marcel Dekker. New York, USA. 39-81.
- Sarathchandra, S.U, Watson, N, Coxn, R, Dimenna, M.E., Brown, J.A, Burch, G.,Neville, F.J. 1996. Effects of chitin of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens L.*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne L.*). *Biology and Fertility of Soils* 22: 221-226
- Scandiani, M, Ruberti, D, Pioli, R, Luque, A and Giorda, L. 2003. First Report of Koch's Postulates Completion on Soybean Sudden Death Syndrome in Argentina. ISSN-0191-2917. *Plant Disease Note*. 87(4):447.
- Scandiani, M, O'Donnell, K, Aoki, T, Luque, A, Biasoli, M, Pioli, R, Giorda, L and Ruberti, D. 2004. Morphological, molecular and pathogenic analysis of soybean sudden-death syndrome isolates in Argentina. En *Documentos: Abstracts of Contributed papers and posters del VII° World Soybean Research Conference*. Page 70. ISSN 1516-781X.
- Schippers, B, Bakker, A.W and Bakker, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 339-358.
- Schroth, M.N and Hancock, J.G. 1981. Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- Schroth, M.N and Hancock, J.G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*. 216:1376-1381.
- Shanahan, P, Glennon, J.D, Crowley, J.J, Donnelly, D.F and O'Gara, F. 1993. Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production and the factors affecting their regulation. *Anal. Chem.* 272:271-277.
- Shanahan, P, O'Sullivan, D, Simpson, P, Glennon, J and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a *fluorescent pseudomonad* and investigation of

physiological parameters influencing its production. *Appl. and Environ. Microbiol.* 58:353-358.

Siddiqui, Z.A and Mahmood, I. 1999. Role of bacteria in the managements of plant parasitic nematodes. *Bioresource Technology.* 69:167-179.

Simons, M, Van der Bij, A.J, Brand, L, De weger, L.A, Wijffelman, C.A and Lugtenberg, B.J.J. 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacterias. *Mol. Plant-Microbie Interact.* 97:600-607.

Smith, E, Leeflang, P and Wernars, K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology.* 23:249-261.

Somers, E, Ptacek, D, Gyseman, P, Srinivasam, M. and Vanderleyden, J. 2005. *Azospirillum brasilienses* produces the auxin-like phenilacetic acid by using the key enzyme for indole-3- acetic acid biosynthesis. *Appl. Envir. Microbiol.*71:1803-1810.

Sperber, J.I.1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Aust. J. Agrc. Res.* 9:778-781.

Steenhoudt, O and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects.*FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.

Teather, R.M and Word, P.J. 1982. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:777-780.

Thatcher, F.S y Clark, D.S (Eds.). 1973. Análisis microbiológico de alimentos. ICMSF. Editorial Acribia. Zaragoza. España. ISBN 84-200-0308-5. Traducido por el Dr. B. Moreno García.

Thoms, K and Sattelmachers, B. 1990. Influence of nitrate placement on morphology and physiology of maize (*Zea mays*) root systems. In plant nutrition-physiology and applications, M.L. Van Beusichem, ed. Kluwer Academic. Dordrecht. The Netherlands. 29-32.

Tien, T.M, Gaskins, M.H and Hubell, D.H.1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Penissetum americanum L.*). *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1016-1024.

Timmusk, S, Nicander, B, Granhall, U and Tillberg, E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology Biochemistry.* 31:1847-1852.

Tomashow, L.S and Weller, D.M. 1988. Role of fhenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritiae*. *J. Bacteriol.*170:3499-3508.

- Tomashow, L.S, Weller, D.M, Bonsall, R.F and Pierson, L.S. 1990. Production of antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by *fluorescent Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:908-912.
- Toyoda, H and Utsumi, R. 1991. Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same us patent. 4:986-988.
- Uknes, S, Winter, A.M, Delaney, T.P, Vy, B, Morse, A, Friedrich, L, Nye, G, Potter, S, Ward, E and Ryals, J.1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 6:692-698.
- Van Loon, L.C, Bakker, P.A.H.M and Pieterse, C.M.J. 1998. Sistemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology.* 36:453-483.
- Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria in PGPR: Biocontrol and Biofertilization (ed. Z.A. Siddiqui). Springer, Dordrecht. The Netherlans. 67-109.
- Van Pée, K.H. 1996. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*50:375-399.
- Van Peer, R, Nieman, G.J and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas sp* strain wcs417r. *Phytopathology.* 91:728-734.
- Wees, S.C.M, De Swart, E.A.M, Van Loon, L.C and Pieterse, C.M.J. 2000. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97.
- Villegas, J and Fortin, J.A. 2001. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing  $\text{NH}_4^+$  as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany.* 79:865-870.
- Vincent, J. M.1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific. 8711-8716.
- Voisard, C, Keel, C, Haas, D and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic condition. *EMBO Journal.* 8:351-358.
- Vorster, P.W and Jooste, J.H. 1986. Traslocation of potassium and phosphate from ordinary and proteoid roots to shoots in the proteaceae. *S. Afr. J. Bot.* 52:282-285.
- Wei, G., Klopper, J.W. and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to colletotricum arbusculares by selected strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology.* 81:1508-1512.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.

Whipps, J.M. 1990. Carbon economy, in the rizosphere (ed. J. M. Lynch), John Wiley & Sons, Ltd. 59-97.

Woldendorp, J. W. 1978. The rizosphere as part of the plant-soil system. In Structure and Functioning of Plant Population. Verhandelingender Koninklijke, Nederland Akademie van Wetenschappen, Afdeling Natuurkunde, Twede Reeks, deel 70.

Wood, R.D, Keller, C.K and Johnstone, D.L. 1993. In situ measurement of microbial activity and controls on microbial CO<sub>2</sub> production in the unsaturated zone water. Resourc. Res. 29:647-659.

Yamaguchi, H, Yamada, A, Uwe, H, and Sakudo, T. 1991. Effect of uniaxial pressure on the 222-K structural phase transition of hexagonal BaTiO<sub>3</sub>. Phys. Rev. B. 43:4473-4480.

Yoshikawa, M, Hirai, N, Wakabayashi, K, Sugizaki, H, Iwanura, H. 1993. Succinic and latic acid as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomona pútida*. Can. J. microbiol. 39:1150-1154.

Zakhia, F and de Lajudie, P. 2006. Modern bacterial taxonomy: Techniques review application to bacteria that nodulate leguminous plat (BNL). Canadian Journal of Microbiology. 52:169-181.