

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

“Trabajo Final Presentado para Optar
al Grado de Ingeniero Agrónomo”

EFEECTO DE LA COINOCULACIÓN DE
Pseudomonas aurantiaca
EN SOJA DE SEGUNDA.

Ricardo Andrés Rivarola

DNI: 28.575.934

Director: Dra. Susana Rosas

Co-Director: Dra. Evelin Carlier

Río Cuarto, Córdoba

2010

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

CERTIFICADO DE APROBACION

**“Efecto de la coinoculación de *Pseudomonas aurantiaca*
SR1 en soja de segunda”**

Autor: Ricardo Andrés Rivarola

DNI: 28575934

***Director:* Dra. Susana Rosas**

***Co-Director:* Mic. Evelin Carlier**

**Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del
Jurado Evaluador:**

Fecha de Presentación: ____/____/____

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____

Secretario Académico

DEDICATORIA

Particularmente se lo dedico a mis padres, porque fueron ellos quienes me guiaron por el camino del estudio, la enseñanza, y son ellos los que hoy día siguen educándome para lograr ser un hombre de bien.

También incluyo a mis hermanos, de quienes recibí ayuda y sobre todo, mucho amor. Por supuesto que incluyo al resto de mi familia que siempre estuvieron presentes.

Por ultimo, va dedicado a mi mujer, Betina y a mi hijo Simon, las personas que hoy en día, junto con Renata que nacerá en Septiembre, son mi propia familia y a la que amo profundamente.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a todos los profesores, que por ellos estoy hoy acá terminando mis estudios. A la Dra. Susana Rosas (Directora) y a la Dra. Evelin Carlier (Codirectora), por posibilitar el desarrollo de esta tesis y estar siempre cuando necesité su ayuda.

También agradezco a mis padres que hicieron posible este logro y que en todo momento sentí su apoyo.

Por último, siendo las personas más importantes hoy en mi vida, mis mayores agradecimientos para Betina y Simon, quienes fueron los que me aguantaron, sostuvieron, levantaron durante los últimos años.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros y amigos que también son parte de esto.

ÍNDICE

1. Certificado de aprobación.....	2
2. Dedicatoria.....	3
3. Agradecimiento.....	4
4. Resumen.....	6
5. Summary.....	7
6. Introducción.....	8
7. Marco teórico.....	10
8. Hipótesis.....	19
9. Objetivos.....	19
10. Materiales y métodos.....	20
11. Resultados y discusión.....	23
12. Conclusión.....	30
13. Bibliografía.....	32

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta del cultivo de soja a la coinoculación con *Pseudomonas aurantiaca* SR1, para ello se estableció un ensayo en el campo experimental perteneciente a la Universidad Nacional de Río Cuarto, donde se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento y componentes de rendimiento.

Pseudomonas. aurantiaca SR1 mejoró la longitud radical y aérea, como así también la nodulación, en raíz principal y raíces laterales. Los valores de media reflejaron diferencias estadísticamente significativas para el tratamiento de coinoculación (T5: Semillas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y coinoculada con *Pseudomonas aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar) respecto de los demás tratamientos (T1: Semillas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E109, suelo sin fertilizar; T2: Semillas inoculadas con *Pseudomonas aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar; T3: Semillas sin inocular, suelo fertilizado con 100 kg/ha de Urea; T4: Semillas inoculadas con *Pseudomonas aurantiaca* SR1, suelo fertilizado con 100 kg/ha de Urea; T6: Semillas sin inocular, suelo sin fertilizar). Durante los primeros estadios del cultivo, la coinoculación promovió el crecimiento, sin embargo en la etapa reproductiva, no mostró diferencias estadísticamente significativas, pero aquellos tratamientos inoculados o coinoculados con *P. aurantiaca* SR1 superaron al testigo. La falta de respuesta pudo haberse debido a factores edafoclimáticos que incidieron durante el período de desarrollo del cultivo.

Palabras claves: soja, coinoculación, *Pseudomonas aurantiaca* SR1.

SUMMARY

EFFECT OF COINOCULATION BY *PSEUDOMONAS AURANTIACA* IN SOYBEAN

This study aimed to evaluate the response of the soybean crop to the coinoculation with *Pseudomonas aurantiaca* SR1, this will set a trial in the experimental field belonging to the Universidad Nacional de Rio Cuarto, where different parameters were evaluated for growth and yield components.

Pseudomonas aurantiaca SR1 root length and improved the air, as well as nodulation, in main root and lateral roots. The average values showed statistically significant differences in the treatment of coinoculación (T5: Seeds inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and coinoculada with *Pseudomonas aurantiaca* SR1, unfertilized soil) compared to other treatments (T1: Seeds inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* E109, soil without fertilize, T2: Seeds inoculated with *Pseudomonas aurantiaca* SR1, unfertilized soil, T3: uninoculated seeds, soil fertilized with 100 kg / ha of Urea and T4: Seeds inoculated with *Pseudomonas aurantiaca* SR1, soil fertilized with 100 kg / ha of Urea; T6: uninoculated seeds, unfertilized soil). During the early stages of cultivation, coinoculation fueling growth, however in the reproductive stage, the evaluations showed no statistically significant differences. The lack of response could be due to soil and climate factors that influenced the period of crop development.

Keywords: soybean, coinoculation, *Pseudomonas aurantiaca* SR1.

INTRODUCCION

La agricultura orgánica es un sistema productivo que propone disminuir el uso de fertilizantes y pesticidas sintéticos en la producción agrícola. Este sistema apunta a reemplazar fuentes externas, tales como sustancias químicas y combustibles adquiridos comercialmente por recursos que se obtienen dentro del mismo predio o en sus alrededores. Dichos recursos internos incluyen la energía solar, eólica y los microorganismos PGPR (plant growth promotion rizobacteria) (Altieri *et al.*, 1999).

Los ecosistemas agronómicos dependen directamente del uso de microorganismos benéficos, los cuales están presentes en el suelo y suelo rizosférico, que median la sanidad e incremento de la productividad de los cultivos. Los microorganismos son determinantes de la salud de las plantas y fertilidad de los suelos, ya que ellos participan como llave de muchos procesos en el ecosistema, los cuales involucran el control biológico, ciclo de nutrientes y establecimiento de la plántula (Jeffries *et al.*, 2003).

El efecto de las bacterias PGPR ha sido atribuido al incremento de la movilización de nutrientes insolubles y el subsiguiente mejoramiento de la toma de nutrientes por la planta (Lifshitz *et al.*, 1987), producción de reguladores del crecimiento de la planta, (Dubeikovsky *et al.*, 1993), supresión de bacterias de suelo deletéreas y hongos fitopatógenos (Weller, 1998; Weller y Thomashow, 1993), y mejor establecimiento y supervivencia como resultado de la producción de antibióticos (Hebbar *et al.*, 1992; Thomashow *et al.*, 1990), compuestos secuestrantes de hierro, tales como sideróforos (Loper y Buyer, 1991), enzimas líticas extracelulares (Fridlender *et al.*, 1993), otros metabolitos secundarios como el HCN (Voisard *et al.*, 1989) e inducción de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Andrade *et al.*, 1989) ó competencia por los sitios de infección y nutrientes (Bull *et al.*, 1991). Todos estos mecanismos suponen un contacto directo entre la bacteria y la superficie o interior de tejidos de la raíz y un activo estatus de la bacteria inducida (De Weber *et al.*, 1995; Höflich *et al.*, 1995). La supervivencia de las bacterias PGPR inoculadas en la rizósfera de las plantas es, en muchos casos, una precondition para un efecto potencial estimulador durante el periodo del crecimiento o durante el desarrollo de la planta joven (Höflich *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que las bacterias PGPR muestran incrementos en rendimiento entre un 5–30% en diferentes cultivos, con efectos positivos reportados en maíz (Fulchieri y Frioni, 1994), garbanzo (Del Gallo y Fabbri, 1990), algodón (Backman y Turner, 1989; Greenough y Batson, 1989), lenteja (Chanway *et al.*, 1989) y soja (Dashti *et al.*, 1998). Otros trabajos muestran los efectos de las bajas temperaturas radicales sobre estas asociaciones y

observan los mismos resultados de incremento de nodulación y fijación de N por la co-inoculación de una PGPR junto con *Bradyrhizobium* (Zhang *et al.*, 1996).

La soja (*Glycine max* L. Merr.) es considerada una de las plantas más antiguas cultivadas en el mundo, siendo citada en la literatura china y posiblemente cultivada extensivamente en este país, unos 2.500 años AC (Morse *et al.*, 1950). La importancia económica de la soja reside, principalmente, en el elevado tenor proteico de sus granos. Como el nitrógeno es un elemento clave en la síntesis de proteínas, la demanda de éste es elevada en el cultivo, acumulando cerca de 100 a 200 Kg de N/ha (Ventimiglia *et al.*, 2000), de allí la importancia de la inoculación. En Argentina las primeras plantaciones de soja se hicieron en 1862, pero no encontraron eco en el campo argentino (Piquin, A. 1968, Zeni E. R. 1971). En 1909 se comenzó a ensayar en distintas escuelas agrícolas argentinas el cultivo de la soja, pero recién para 1965 se intensificaron los trabajos de investigación sobre el tema. Si bien los resultados de los ensayos realizados fueron buenos, el cultivo no logró obtener difusión entre los productores (Pascale, A. J. 1989).

En el caso de la soja es común la inoculación con cepas de *Bradyrhizobium* para la fijación biológica del nitrógeno, lo cual disminuye la necesidad de utilización de fertilizantes nitrogenados e incrementa el rendimiento del cultivo. En soja, cepas de otros géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, tienen actividad PGPR y se establecen en la rizósfera de las plantas. Los beneficios sobre las plantas debidos a la inoculación con estas bacterias, incluyen aumentos en la tasa de germinación, crecimiento radical, rendimiento, contenido de proteínas, tolerancia a la sequía y micorrización, entre otros (Bowen y Rovira, 1999; Villegas y Fortín, 2001; Babana y Antoun 2006).

MARCO TEORICO

A) Interacción benéfica microorganismo-planta

Kloepper y Schroth, definieron en 1978 como PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), a aquellas bacterias altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. En años recientes se ha creado cierta controversia respecto de cuándo considerar a una rizobacteria como PGPR, por lo que se han establecido algunas características que definen a este grupo:

1. que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo;
2. que posean capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta;
3. que puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos patógenos del suelo capaces de infectar a las plantas (*Fusarium* sp., Nematodos, entre otros); y
4. que no produzcan daño en el hombre.

La aplicación de este tipo de rizobacterias ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa, desarrollo en sistemas radiculares e incrementos de hasta 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, jitomate, trigo y soya, entre otros (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994; Dashti *et al.*, 1997; Lucy *et al.*, 2004).

B) Mecanismos promotores del crecimiento vegetal mediados por microorganismos

A continuación se listan los mecanismos de promoción vegetal, y se hará hincapié en aquellos posiblemente relacionados con las cepas en estudio:

B1) Producción de sideróforos

B2) Solubilización de fósforo

B3) Síntesis de antibióticos

B4) Competencia en la rizósfera

B5) Síntesis de sustancias antimicrobianas

B6) Inducción de la resistencia sistémica

B7) Producción de fitohormonas

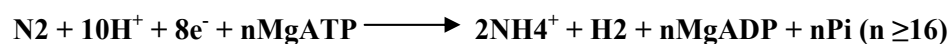
Además de las plantas, muchas bacterias pueden producir sustancias tipo fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas. Estos compuestos pueden actuar en la planta de forma diferente; las auxinas favorecen el desarrollo y alargamiento del sistema radical, la emergencia de raíces laterales y también aumentan la permeabilidad de las membranas celulares. Dentro de ellas se destaca el ácido indol acético (AIA), estimulador de la elongación, división y diferenciación celular. Por otra parte, las giberelinas provocan un mayor desarrollo de la parte aérea, incrementándose los procesos fisiológicos y la actividad enzimática (Hernández *et al.*, 1998).

Es evidente que aumentar la densidad de los pelos radiculares de las plantas inoculadas mejora el sistema de absorción de nutrientes y en este sentido numerosas experiencias en invernáculo y a campo lo han confirmado (Glick, 1995).

B8) Fijación de nitrógeno

El Nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la atmósfera el N ocupa aproximadamente el 80%, existiendo en la forma $N \equiv N$; sin embargo, el N_2 , debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetes. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004).

La FBN es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general:



Esta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H_2 producido por mol de N_2 reducido (Halbleib y Luden, 2000). La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos (Ej. alta tasa respiratoria, compartimentalización, protección conformacional) que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Ureta y

Nordlund, 2002; Lee *et al.*, 2004). Hiltner en 1904 observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical y propuso el término “rizósfera”. Los exudados radicales, conformados por sustancias diversas crean alrededor de las raíces (rizósfera) un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano. Smith (1976) y Martin y Kemp (1980) reportan la presencia de carbohidratos y aminoácidos, y señalan que la composición y cantidad de exudados varía con la especie presente y las condiciones abióticas, tales como agua y temperatura.

B8.1) Asociaciones simbióticas - *Rhizobio*-Leguminosas

El género *Rhizobium* (Frank 1889), familia *Rhizobiaceae* (Conn 1998), está representado por bacterias de forma bacilar, Gram negativas, habitantes del suelo, que tienen la capacidad de formar nódulos en varias leguminosas y en *Parasponia* spp. (e. j. *P. andersonii*, *P. rigida*). Esta relación simbiótica es controlada genéticamente tanto por la planta como por la bacteria y ocurre a través de una secuencia de estados de desarrollo que culminan en el establecimiento de una simbiosis efectiva: el nódulo fijador de nitrógeno. El primer nombre dado a las bacterias de los nódulos de las raíces de las leguminosas fue *Phytomyxa*, el cual lo propuso Schroeter en 1886, considerando la relación de estas bacterias con los hongos mucosos. Sin embargo, en 1970, la Comisión Judicial del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana (Opinión 34) aprobó como nombre genérico *Rhizobium* Frank 1889 (nombre conservado) en vez de *Phytomyxa* Schroeter 1886 (nombre prioritario). Esto se hizo en base a que el nombre *Rhizobium*, tiene la ventaja de enfatizar la importancia agronómica de las bacterias de los nódulos de las raíces (rhiza: raíz, bios: vida, *Rhizobium*: vida en las raíces) y a su vez guarda tributo a la extensa literatura publicada con ese nombre (Mayz, 1997). Actualmente, además de *Rhizobium*, existen otros géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno: *Ensifer* (Casida, 1982), *Bradyrhizobium* (Jordan 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) y *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Weir (2004) hace una revisión exhaustiva de la taxonomía actual de los rizobia.

El enigma de las leguminosas fue aclarado cuando Hellriegel y Wilfarth en 1888 probaron la fijación de nitrógeno en plantas noduladas, esto fue seguido por el aislamiento de la primera bacteria de los nódulos por Beijerinck ese mismo año. En 1932, Fred y colaboradores publicaron una monografía que ha recorrido el mundo, donde revisaron y analizaron la información existente sobre la simbiosis; sus consideraciones tuvieron una profunda influencia en la práctica y teoría subsiguientes. Para las décadas posteriores y hasta la actualidad los avances tecnológicos han permitido estudios más detallados y por lo tanto un mejor conocimiento y entendimiento de la simbiosis leguminosas-rizobia.

Para que se establezca la relación simbiótica deben ocurrir las siguientes etapas:

1. multiplicación de las bacterias en la rizósfera,
2. colonización de la rizósfera,
3. adsorción de las bacterias a la raíz,
4. ensortijamiento de los pelos radicales, ocurre en las raíces cuando la infección es vía pelos radicales y en algunas donde acontece vía unión raíces laterales-raíz principal,
5. formación de los hilos o zonas intercelulares de infección,
6. crecimiento del hilo de infección hacia las células corticales o invasión directa de las mismas, y
7. diferenciación tisular y desarrollo del nódulo (Figura 1).

Los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren a nivel de los puntos de desarrollo nodular van acompañados de señales moleculares inducidas por genes propios del proceso (genes nod) (Mayz, 1997; Perret *et al.*, 2000; González y Marketon, 2003; Gage, 2004).

El tipo y estructura nodular es dependiente de la planta hospedera, así se tienen:

- a. Nódulos determinados, en los cuales la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células. Este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos (Figura 2A), que pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar (Figura 2B) (Hirsch, 1992; Mayz, 1997).
- b. Nódulos indeterminados, los cuales presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados o coraloides, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo; de tal manera que todos los estados de desarrollo están así representados, debido a que ocurre un gradiente de formación desde la parte distal a la proximal en el punto de unión a la raíz. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos (Figura 2C) y ramificados o coraloides (Figura 2D) (Hirsch, 1992; Mayz, 1997).

La utilización del nitrógeno atmosférico en la simbiosis, requiere de la integración de las vías metabólicas de la fijación (bacteroides) y de la asimilación (planta hospedera) del nitrógeno. La bacteria emplea compuestos carbonados oxidables suplidos por la planta para su metabolismo y desarrollo y para la síntesis de ATP y del poder reductor usados en la reacción de fijación catalizada por la nitrogenasa, la cual genera el nitrógeno asimilable (NH_4^+), que es metabolizado en las células nodulares a amidas o ureídos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta, donde son usados (Mayz, 1997).

El primer producto de la reacción de fijación es NH_3^- (amoníaco), pero este es rápidamente protonado, formándose NH_4^+ , lo cual es favorecido por el pK (9,25) de la

reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los pHs fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Sprent y Sprent, 1990).

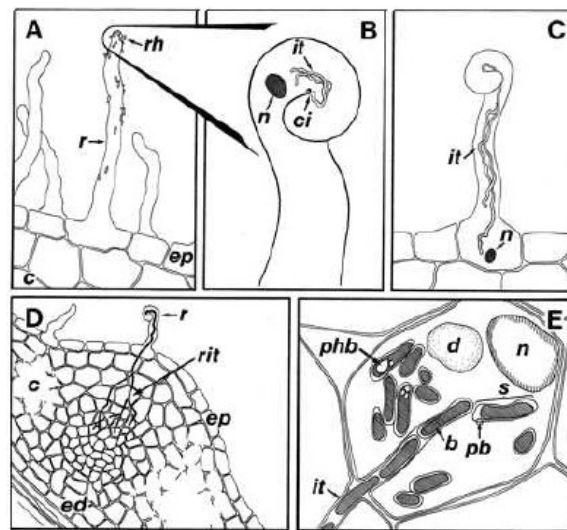


Figura 1. Invasión de pelos radicales por *Rhizobium* sp. (A) rizobia (rh) coloniza la rizósfera y se adhiere al pelo radical (r). (B) “Factores Nod” inducen el ensortijamiento del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (ci). El núcleo del pelo radical (n) precede el crecimiento del hilo de infección (it). (C) El hilo de infección alcanza la base del pelo radical (it), aún acompañado del núcleo (n). (D) El pelo radical (r) se ramifica (rit) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (b) son liberados desde el hilo de infección (it) y forman simbiosomas (s) donde se acumulan gránulos de poly-hidroxibutarato (phb) rodeados por la membrana peribacteroidal (phb). Otras abreviaturas: c, corteza; d, vacuola digestiva; ep, epidermis; ed; endodermis (Perret et al., 2000).

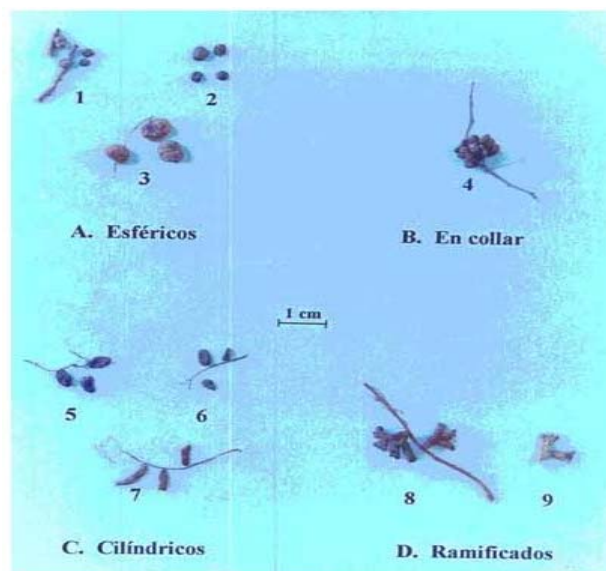


Figura 2: Formas nodulares presentes en algunas especies de leguminosas. 1. *Vigna unguiculata*, 2. *Desmodium canum*, 3. *Centrocema brasilianum*, 4. *Cannavalia ensiformis*, 5. *Indigofera hirsuta*, 6. *Cajanus cajan*, 7-8. *Crotalaria retusa*, 9. *Gliricidia sepium* (Mayz, 1997)

El amonio es un inhibidor de la síntesis de nitrogenasa, por lo que es imperativa su rápida asimilación en el citosol de las células infectadas. Éste es asimilado por el ácido

glutámico, en cuya reacción interviene la enzima glutamina sintetasa dependiente de ATP y donde se forma glutamina, la cual puede ser exportada ó utilizada para restaurar el ácido glutámico, a través de una reacción con el ácido 2-oxoglutarico (proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) catalizada por la glutamato sintasa dependiente del NADH, también denominada glutamina-2- oxoglutarato aminotransferasa o GOGAT (Sprent y Sprent, 1990; Ortega et al., 2004). Las leguminosas simbióticas pueden ser separadas en dos grupos de acuerdo a los productos exportados desde los nódulos: las exportadoras de amidas (asparragina, glutamina) y las exportadoras de ureídos (alantoína y ácido alantoico). El primer grupo incluye varias especies de regiones templadas, entre estas *Lupinus subcarnosus*, *Pisum sativum* y *Medicago sativa* y el segundo varias especies tropicales, tales como *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* (Scott et al., 1976; Mifflin y Habash, 2002; Harrison et al., 2003).

C) *Bradyrhizobium japonicum*

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria gram negativa, en forma de bastón, la cual fija nitrógeno de forma simbiótica cuando se asocia con *Glycine max*. Se localiza en la superficie de las raíces y eventualmente forma nódulos en ellas. Dentro de estos nódulos, *Bradyrhizobium japonicum* se encuentra en la planta rodeada de una membrana peribacteroidal, en este estado la bacteria se encuentra como simbiosoma. En esta relación simbiótica, la planta proporciona un entorno seguro y constante suministro de nutrientes, como carbono, que se utiliza para el crecimiento y la energía. Esas fuentes de carbono se presentan en forma de ácidos dicarboxílicos, succinato, fumarato y malato. Las bacterias a su vez, proporcionan a la planta nitrógeno fijado, el cual es fácilmente utilizable por la planta. Esto permite que la planta crezca significativamente en ausencia de fertilizantes externos. Actualmente se cuenta, con la secuenciación del genoma de *Bradyrhizobium japonicum*, el cual es de suma importancia ya que la manipulación del genoma puede mejorar la producción de cultivos de soja. Originalmente esta bacteria, fue aislada de un nódulo de soja en Florida, EE.UU., en 1957 (Kaneko et al., 2002).

D) Género *Pseudomonas*

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*, son microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales como *Pseudomonas aeruginosa* y patógenos de plantas, *Pseudomonas syringae*. Su metabolismo es respiratorio, aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones O₂) o anaerobio (algunos usan NO⁻). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados. Por otra parte, hay algunos individuos del grupo que

son quimiolitótrofas usando H₂ o CO como donadores de electrones. El metabolismo central de azúcares en este grupo se desarrolla por la vía de Etner-Doudoroff, y disponen de un ciclo de ácidos tricarbónicos normal (Holt *et al.*, 1994).

Durante los últimos 20 años, han sido numerosos los trabajos referidos a *Pseudomonas* fluorescentes que ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas, independientemente de la presencia del patógeno (Cook, 1993). De esta manera se han descrito distintas especies de *Pseudomonas* que se han mostrado muy eficaces a la hora de controlar enfermedades radiculares producidas por hongos en el suelo (O'Sullivan y O'Gara, 1992) ó en cultivo hidropónico (Gamard *et al.*, 1997), e incluso controlando otras enfermedades producidas por otras bacterias (Cronin *et al.*, 1997).

Algunas cepas de *Pseudomonas* colonizan de manera efectiva los órganos subterráneos de las plantas y promueven el crecimiento de manera consistente, reduciendo también la incidencia de enfermedades causadas por un amplio rango de hongos patógenos del suelo. Está generalmente aceptado que uno de los mecanismos más importantes, por el que las *Pseudomonas* fluorescentes promueven el crecimiento vegetal, es mediante la supresión de microorganismos patógenos (Nielsen *et al.*, 2002; Raaijmeekens *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2003ab). También se ha sugerido que las *Pseudomonas* pueden manifestar sus efectos promotores del crecimiento indirectamente, estimulando la acción beneficiosa de otros microorganismos asociados a las raíces, como las micorrizas (Andrade *et al.*, 1998; Berti *et al.*, 2007). Cuando la estimulación del crecimiento vegetal se produce en ausencia de otros microorganismos, ésta se ha atribuido al incremento de la disponibilidad de nutrientes minerales, como el fosfato o el nitrógeno, debido a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o a la degradación de precursores del etileno en la raíz por parte de estas bacterias (Glick, 1995).

La inhibición del patógeno por la producción de metabolitos antimicrobianos ó queladores de hierro son los principales mecanismos implicados en el biocontrol. Otros factores importantes son la degradación de factores de virulencia del patógeno, como toxinas, por parte de las *Pseudomonas* (Toyoda *et al.*, 1988), la inactivación de factores de germinación del patógeno, presentes en los exudados radiculares (Nelson, 1992) y la producción de enzimas extracelulares, como quitinasas, laminarasas y glucanasas, que pueden degradar las paredes de las células fúngicas (Fridlender *et al.*, 1993).

Existen trabajos en los que se ha puesto de manifiesto que algunas *Pseudomonas* que están íntimamente asociadas con la raíz pueden inducir los mecanismos de resistencia sistémica contra patógenos fúngicos, bacterianos, provocando la protección de toda la planta frente a la enfermedad, con la consecuente reducción en el uso de productos fitosanitarios (Maurhofer *et al.*, 1994).

Pseudomonas benéficas han logrado un incremento en la productividad de los cultivos y una reducción de las poblaciones de microorganismos deletéreos bajo condiciones de campo, como así también en invernáculo (Bakker *et al.*, 1991; Loper y Buyer, 1991). Por estas características el Género *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiado (Sastry *et al.*, 2000, Vazquez *et al.*, 2000). Bajo condiciones de campo algunas PGPR incrementan la nodulación y fijación de nitrógeno, que resulta en un aumento del nitrógeno total y nitrógeno obtenido en el rendimiento (Dashti *et al.*, 1998).

D1) *Pseudomonas aurantiaca*

Cepa aislada de la rizósfera de soja (*Glycine max*), en Argentina, tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Altamirano y col., 1996). Ensayos “in vitro” indican que tales actividades están asociadas a la producción de un pigmento color naranja. 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 la misma es inhibida por el agregado de glucosa por encima de 5 g/l (Rosas *et al.*, 2000). El/los compuestos involucrados en la actividad biocontroladora de *P. aurantiaca* SR1 son estables frente a la acción de proteasas y al tratamiento térmico (100°C, 20 min). Los primeros estudios de caracterización química demostraron que el metabolito bioactivo es de naturaleza hidrofóbica y presenta características químicas similares al 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Rovera, M. *et al.*, 2000, *et al.*, 2004). *P. aurantiaca* SR1 ha sido evaluada como promotora de crecimiento bajo condiciones de invernáculo y campo, en cultivos como maíz, alfalfa y trigo (Rovera *et al.*, 2008; Carlier *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2008).

E) Importancia de la co-inoculación

La necesidad de productos agrícolas de máxima producción y de excelente calidad, presentan a la inoculación como una herramienta útil que puede complementar el sistema productivo. Si esta alternativa pudiera reemplazar, aunque sea en parte, la fertilización química, el productor y el país se verían beneficiados, no sólo en términos de márgenes de producción, sino que evitarían los peligros de la contaminación de aguas por infiltración de nutrientes, como nitratos, beneficiando de esta manera a la población (Flores y Ferraris, 2001). La combinación de una reducción gradual en el uso de fertilizantes químicos y pesticidas por un lado y el gran uso del potencial biológico y genético de las plantas y especies microbianas por otro lado, ofrecen la posibilidad de una ecología sustentable (Flores y Ferraris, 2001; Bashan y de-Bashan, 2005). El uso a gran escala de estos microorganismos como biofertilizantes en cualquier sistema de producción agrícola traería grandes beneficios, puesto que son más baratos que los de origen inorgánico, tienen efectos positivos en las

plantas (similares a los de un fertilizante químico) y no ejercen un impacto ecológico perjudicial en el ambiente ni en la salud humana. Adoptar este tipo de innovación tecnológica que se inclina hacia la conservación del ambiente, incrementará la productividad de los cultivos y bajará los costos de producción, contribuyendo, en suma, a una agricultura sustentable que trata de usar los recursos naturales sin comprometer a nuestras generaciones futuras (Hernández y Aguilar, 2003).

Estudios de coinoculación con PGPR y *Rhizobium/Bradyrhizobium* spp. han demostrado un incremento en el peso aéreo y radical, vigor de la planta, fijación biológica de N y rendimiento de grano en varias leguminosas, como alfalfa (Knight y Langston-Unkefer, 1988), frijol común (Grimes y Mount, 1984), *Vigna radiata* (Sindhu *et al.*, 1999), guisante (Bolton *et al.*, 1990) y soja (Dashti *et al.*, 1998). A veces, las rizobacterias aisladas desde cultivos, muestran una cierta variedad en la promoción del crecimiento de las plantas con otros cultivos de leguminosas, y esto puede deberse a diferentes potenciales de colonización (Anderson *et al.*, 1988), su respuesta a diferentes cantidades y composición de los exudados radicales (Miller *et al.*, 1989; Phillips y Streit, 1997), variación en la temperatura (Seong *et al.*, 1991) y los diferentes tipos de interacciones con las cepas rizobiales/ bradyrhizobiales predominantes en la rizósfera de las leguminosas (Parmar y Dadarwal, 1999; Sindhu *et al.*, 1999).

HIPÓTESIS

La co-inoculación con *Pseudomonas aurantiaca* incrementa la nodulación y promueve el crecimiento de plantas de soja.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto promotor del crecimiento de *Pseudomonas aurantiaca* SR1, en plantas de soja, co-inoculadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar biomasa aérea y radical de soja.
- Evaluar número de nódulos en raíces primarias y en raíces secundarias.
- Determinar biomasa nodular.
- Cuantificar rendimiento.

MATERIALES Y METODOS

1. Área de estudio

El ensayo se realizó en una parcela perteneciente al campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina (35° 07' S y 64° 14' O, 421 m.s.n.m), situado sobre la Ruta Provincial N° 36, Km. 601. El clima de la región es templado con un régimen anual de precipitaciones de 800 mm y una temperatura media anual de 16-17 °C. Las principales características físico-químicas del suelo son: pH (en agua), 6.30; conductividad eléctrica (dS/m), 0,28; materia orgánica, 2.56%; N total, 0.132 %; P disponible, 19.7 ppm.

La implantación del cultivo de soja se llevó a cabo en el mes de Diciembre de 2006, posterior a la cosecha de trigo ubicado en la misma parcela. Se utilizó el sistema de siembra directa, perteneciente a la UNRC y se realizaron monitoreos semanales de plagas, malezas y enfermedades, con el objetivo de que el cultivo se desarrolle en su máximo potencial.

Previo a la siembra se realizó un barbecho con Glifosato (48%) a una dosis de 2,5 lt/ha, para que el cultivo se implante en un medio sin competencia. En cuanto a plagas, en ningún estado fenológico alcanzó el umbral de daño, por lo que no se realizaron controles.

2. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo con un diseño experimental en bloques aleatorizados con 3 repeticiones para cada tratamiento. Cada tratamiento midió 15,6 m² (15 de largo, 1,04 m de ancho), separados entre ellos por 1m. Se sembraron 3 hileras por tratamiento, separadas entre sí por 0.52 m.

Seis tratamientos fueron establecidos para la evaluación del efecto promotor de *P. aurantiaca* SR1:

Tratamiento 1: Semillas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* E109, suelo sin fertilizar

Tratamiento 2: Semillas inoculadas con *Pseudomonas aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar

Tratamiento 3: Semillas sin inocular, suelo fertilizado con urea (N)

Tratamiento 4: Semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1, suelo fertilizado con Urea

Tratamiento 5: Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y *P. aurantiaca* SR1(Coinóculo), suelo sin fertilizar.

Tratamiento 6: Semillas sin inocular, suelo sin fertilizar (control)

Las dosis de fertilizante aplicada fue de 100 Kg/ha de urea (aplicada al voleo posterior a la siembra) y no se incluyeron tratamientos fertilizados con fosfato diamónico, debido al alto contenido de P disponible, que se desprende como resultado de los análisis previos a la implantación del cultivo.

3. Cepas bacterianas:

Pseudomonas aurantiaca SR1 (cepa experimental) y *Bradyrhizobium japonicum* E109 (cepa comercial), ambos formulados en soporte base turba (Laboratorios Biagro S.A).

4. Inoculación de las semillas:

La inoculación de las semillas se realizó de la siguiente manera, dependiendo del tratamiento:

a- 5.3 g de *P. aurantiaca* + 2.7 g de turba estéril + 17.3 g de S2 + 4 g de S1 + 40 ml. de agua.

b- 2.7 g de *B. japonicum* + 5.3 g de turba estéril + 17.3 g de S2 + 4 g de S1 + 40 ml. de agua.

c- 2.7 g de *B. japonicum* + 5.3 g de *P. aurantiaca* + 17.3 g de S2 + 4 g de S1 + 40 ml. de agua.

De todas las mezclas se colocaron 20.8 g de alícuota cada 2 Kg de semillas de soja. S1 corresponde al adherente y S2 al protector celular, ambos provistos por Laboratorios BIAGRO S.A..

5. Determinaciones sobre el cultivo:

1) Densidad de plantas por metro cuadrado en emergencia. Se evaluó el número de plantas en 1 m²., para ello se contaron el número de las mismas en 1.92 m lineales (equivalente a 1m².) y se expresó el valor promedio de cada tratamiento.

2) En estado de V6, se extrajeron al azar 5 plantas de cada unidad de muestreo y se evaluaron los siguientes parámetros:

-Altura de la planta: longitud desde la base del tallo hasta el extremo apical, con regla milimetrada.

-Longitud radical: longitud de la raíz principal, con regla milimetrada.

-Número de nódulos: en la raíz principal y en las raíces laterales.

-Peso seco de la biomasa aérea y radical: Se separó la parte aérea de la radical y se colocaron en estufa de secado, a 60 °C por 72 hs. Finalizado este tiempo se procedió al pesaje de las mismas, con balanza analítica. Los resultados se expresaron en gramos.

-Peso seco de nódulos de raíz principal y de raíces laterales: Los nódulos se separaron cuidadosamente de la raíz utilizando un bisturí, se colocaron en estufa de secado, a 60 °C por 72 hs. Finalizado este tiempo se procedió al pesaje de las mismas, con balanza analítica. Los resultados se expresaron en miligramos.

3) En el estadio R6 se tomaron 5 plantas de cada unidad de muestreo y se determinó: número de frutos por planta, número de granos por fruto y número de granos por planta.

4) En el estadio R8 se determinó el rendimiento del cultivo: se cosecharon dos réplicas de 1m². por cada unidad de muestreo, y se determinó el peso por unidad de superficie (kg/ha) y el peso de mil semillas (grs./1000 semillas).

6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Se verificó el cumplimiento de los supuestos necesarios para la validez del análisis estadístico. Se consideró diferencias estadísticamente significativas para $p < 0.05$. Cuando se detectó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se aplicó el test a posteriori LSD ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la coinoculación en soja, con *Bradyrhizobium japonicum* E109 - *Pseudomonas aurantiaca* SR1, siendo el mismo uno de los primeros informes sobre el tema.

Durante la emergencia del cultivo (Tabla 1), no se evidenciaron problemas de Damping off, pero la densidad de plantas/ha se vio disminuido, esto debido a que la semilla se colocó a una gran profundidad y posteriormente sobrevinieron precipitaciones abundantes, lo que produjo la muerte de varios simientes por la excesiva humedad. De todas maneras, el cultivó mostró un óptimo crecimiento.

1) Tabla 1: Emergencia de soja (plantas por metro cuadrado – 1,92 m de surco).

TRATAMIENTOS	EMERGENCIA (PLANTAS/METRO)
1. Inoculado <i>B. japonicum</i> E 109	15,00 ns
2. Inoculado <i>P. aurantiaca</i> SR1	15,50 ns
3. Fertilizado con Urea (100 kg/ha.)	18,00 ns
4. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1 y fertilizado con Urea (100 kg/ha.)	16,25 ns
5. Coinoculado	16,50 ns
6. Control	18,25 ns

Ref.: 1.semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar; 2. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo sin fertilizar; 3. suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 4. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y 100 Kg/ha de urea 5. semillas coinoculadas (*B. japonicum* E109 + *P. aurantiaca* SR1) y suelo sin fertilizar; 6. control: semillas sin inocular y suelo sin fertilizar.

Posteriormente, cuando el cultivo entró en su fase fenológica V5-6, se evaluaron parámetros de crecimiento: longitud aérea y radical, pesos frescos y secos (Tabla 2). Los resultados de longitud aérea fue mayor en el tratamiento co-inoculado y las diferencias fueron significativas según el análisis estadístico aplicado. Además cabe aclarar que todos los tratamientos superaron al control, siendo los más representativos: Tratamiento 4 (inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100 Kg/ha de urea) 19.46%; Tratamiento 2 (inoculado con *P. aurantiaca* SR1)-15.11%; Tratamiento 3 (Fertilizado con 100Kg/ha de urea) 7.1%;

Tratamiento 5 (coinoculado con *P. aurantiaca* SR1 + *B. japonicum* E109) 9.56%, de los cuales tres contenían *P. aurantiaca* SR1 (inoculada, coinoculada, inoculada + urea).

De la misma manera, la longitud de la raíz principal aumentó considerablemente, comparada con el control (Tratamiento 6: Semillas sin inocular y suelo sin fertilizar), en aquellos tratamientos que incluían a *P. aurantiaca* SR1 sola o bien como coinóculo, con o sin fertilización (Tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1: 44%; Tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100 Kg/ha de urea: 24%; Tratamiento coinoculado con *P. aurantiaca* SR1 y *B. japonicum* E109: 23,5%), encontrándose diferencias estadísticamente significativas (Tabla N°2). Este efecto se ha observado además en trigo y otros cultivos inoculados o co-inoculados con la misma bacteria, tanto en ensayos bajo condiciones de invernáculo (Guiñazú *et al.*, 2007) como a campo (Pasluosta *et al.*, 2007b; Avanzini *et al.*, 2007).

Las variables peso fresco aéreo y radical, resultaron similares a las anteriores, mostrando diferencias significativas entre tratamientos. Aquellos inoculados con *P. aurantiaca* SR1 (inoculada, coinoculada y/o fertilizada) fueron superiores al resto. Cabe mencionar que si bien el peso seco aéreo no mostró diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los tratamientos, el Control (Tratamiento 6. Semillas sin inocular y suelo sin fertilizar) arrojó valores mas bajos que los tratamientos que estaban inoculados o coinoculados con *P. aurantiaca* SR1.

Por ultimo, la variable Peso Seco Aéreo no revelo diferencias estadísticamente significativas, sin embargo los tratamientos que incluyeron *P. aurantiaca* SR1 superaron a los demás. Lo contrario ocurrió con el Peso Seco Radical, donde el estadístico mostro diferencias significativas entre los tratamientos Coinoculado con *B. japonicum* E109 y *P. aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar; Semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar, y el Tratamiento Control. El que mayor respuesta mostró fue el Tratamiento coinoculado con *B. japonicum* E109 y *P. aurantiaca* SR1, suelo sin fertilizar, superando al Tratamiento Control en un 76,9%.

Tabla 2: Parámetros de crecimiento en estado fenológico V5-6.

TRATAMIENTOS	ALTURA DE LA PARTE AÉREA (CM)	LONGITUD DE LA RAÍZ PRINCIPAL (CM)	PESO FRESCO AÉREO (G)	PESO FRESCO RADICAL (G)	PESO SECO AÉREO (G)	PESO SECO RADICAL (G)
1. Inoculado <i>B. japonicum</i> E109	52,20 ^{bc}	20,63 ^{ab}	27,08 ^b	5,24 ^b	8,12 ^a	1,57 ^{ab}
2. Inoculado <i>P. aurantiaca</i> SR1	57,20 ^{ab}	22,83 ^a	37,24 ^{ab}	5,83 ^{ab}	10,95 ^a	2,42 ^a
3. Fertilizado con urea (N)	54,44 ^{abc}	19,13 ^{ab}	29,06 ^{ab}	4,33 ^b	9,16 ^a	2,24 ^{ab}
4. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1 y fertilizado con N	53,22 ^{abc}	23,32 ^a	42,66 ^{ab}	7,97 ^a	12,80 ^a	2,39 ^{ab}
5. Coinoculado	59,36 ^a	19,60 ^{ab}	47,58 ^a	5,96 ^a	9,48 ^a	2,53 ^a
6. Control	49,69 ^c	15,87 ^b	25,74 ^b	4,80 ^b	8,32 ^a	1,43 ^b

Ref.: 1. semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar; 2. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo sin fertilizar; 3. suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 4. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 5. semillas coinoculadas (*B. japonicum* E109 + *P. aurantiaca* SR1) y suelo sin fertilizar; 6. control: semillas sin inocular y suelo sin fertilizar.

En cuanto a los nódulos, se observaron en todos los tratamientos, incluyendo el control, tanto en raíces principales como laterales. Los tratamientos que contenían *B. japonicum* E109 ya sea inoculado o coinoculado, presentaron el mayor número de nódulos (Tabla N° 3), superando ampliamente a los demás tratamientos, estos resultados se correlacionaron con los obtenidos en el peso seco de los nódulos. Los nódulos observados en las plantas no inoculadas con *B. japonicum* E109 no presentaron la morfología típica de un nódulo efectivo (Frioni, 1999), lo cual nos indicaría una baja tasa de FBN por rizobios nativos. Se ha informado que la coinoculación en leguminosas con rizobacterias aumentó la nodulación, la actividad nitrogenasa, materia seca de la planta, y rendimiento de granos (Singh y Subba Rao 1979; Polonenko *et al.*, 1987; Nishijima *et al.*, 1988; Dashti *et al.*, 1998; Tilak *et al.*, 2006). Este efecto favorable sobre la nodulación ha sido ampliamente descrito por otros autores utilizando a *P. aurantiaca* SR1 y *Sinorhizobium melliloti* (Pasluosta *et al.*, 2005.; Guiñazú *et al.*, 2007).

Tabla 3: Año 2006. Parámetros nodulares en estadio V5-6.

TRATAMIENTOS	Nº NOD. RAIZ 1º	Nº NOD. RAICES 2º	PESO SECO (MG) NOD. RAIZ 1º	PESO SECO (MG) NOD. RAIZ 2º
1. Inoculado con <i>B. japonicum</i> E 109	13,25 a	16,50 b	86,42 a	45,30 a
2. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1	3,92 b	4,75 c	9,50 c	10,50 b
3. Fertilizado	4,17 b	5,92 c	8,25 c	9,16 b
4. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1 y fertilizado con Urea.	3,58 b	4,75 c	9,75 c	10,58 b
5. Coinoculado	14,25 a	23,67 a	68,42 b	47,42 a
6. Control	2,92 b	5,33 c	7,08 c	9,83 b

Ref.: 1.semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar; 2. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo sin fertilizar; 3. suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 4. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 5. semillas coinoculadas (*B. japonicum* E109 + *P. aurantiaca* SR1) y suelo sin fertilizar; 6. Control: semillas sin inocular y suelo sin fertilizar.

Con respecto a los parámetros evaluados durante el estadio fenológico R6, el estadístico aplicado no reveló diferencias significativas, pero cabe aclarar que en las tres variables analizadas (Nº Frutos/Pl., Nº Semillas/Fruto y Nº Semillas/Pl.) los tratamientos inoculados o coinoculados con *P. aurantiaca* SR1 superaron al tratamiento control (Tabla 4). Haciendo referencia a la variable Frutos/planta, el tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100 kg/ha de Urea superó al control en un 19%, mientras que el tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1 y el tratamiento coinoculado con *P. aurantiaca* SR1 + *B. japonicum* E109 lo superaron en un 14,5% y 12% respectivamente. Como fue discutido, el número de nódulos evaluados en el estadio V5-6 fue superior en aquellos tratamientos inoculados con *B. japonicum* E109, pero también en aquellos coinoculados, por lo que este aumento probablemente favorecería el crecimiento del cultivo. Se ha informado que el nitrógeno biológico aumenta en proporción al crecimiento del cultivo en las fases críticas (entre R2 y R6), que son determinantes del rendimiento (Egli y Zhen-Wen, 1991; Andrade, 2000).

Tabla 4: Número de frutos y semillas por planta;
número de semillas por fruto en R6.

TRATAMIENTOS	Nº FRUTOS/PL.	Nº SEMILLAS/FRUTO	Nº SEMILLAS/PL.
1. Inoculado <i>B. japonicum</i> E109	41,50 ns	2,87 ns	117,75 ns
2. Inoculado <i>P. aurantiaca</i> SR1	47,33 ns	2,81 ns	133,42 ns
3. Fertilizado con urea (N)	43,83 ns	2,74 ns	120,33 ns
4. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1 y fertilizado con N	49,33 ns	2,83 ns	139,42 ns
5. Coinoculado	46,25 ns	2,81 ns	130,08 ns
6. Control	41,33 ns	2,77 ns	115,17 ns

Ref.: 1.semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar; 2. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo sin fertilizar; 3. suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 4. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 5. semillas coinoculadas (*B. japonicum* E109 + *P. aurantiaca* SR1) y suelo sin fertilizar; 6. control: semillas sin inocular y suelo sin fertilizar.

Además, fueron evaluados los parámetros: rendimiento en grano (kg/ha) y peso de mil granos en el estadio R8 (Madurez de cosecha). En cuanto al rendimiento en grano, los resultados obtenidos fueron alentadores, porque se demostró que la bacteria actuó positivamente (Tabla N° 5). Si bien el Tratamiento inoculado con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar fue el que mayor valor arrojó (5158,8 kg/ha), el tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100kg/ha de Urea (4748,85 kg/ha) fue el de mayor respuesta entre los tratamientos que incluían *P. aurantiaca* SR1 inoculada o coinoculada, superando al control (3902,85 kg/ha) en un 22%, en tanto el tratamiento coinoculado con *P. aurantiaca* SR1 + *B. japonicum* E109 (4478,79 kg/ha), lo hizo pero en un 15%. Estas diferencias de 846 y 575,94 kg/ha respectivamente, fueron suficientes para que el análisis estadístico las considerara significativas, con una probabilidad de error menor al 5 % ($p= 0,05$). En pocas palabras, la capacidad de esta bacteria para solubilizar fosforo, producir fitohormonas, y demás cualidades (que la catalogan como un organismo PGPR), serian responsables de la respuesta del cultivo en estudio. De todas maneras, como se observó en otros cultivos, como ser trigo, la inoculación con *P. aurantiaca* SR1 no mostró diferencias en cuanto a rendimiento, debido a que el cultivo en su etapa reproductiva se estabiliza (Carlier E. *et al.*, 2008). Esto podría ser una de las causas de porque en los primeros estadios (vegetativo), los Tratamientos con *P. aurantiaca* SR1 inoculada o coinoculada fueron los de mayor respuesta, no manifestando lo mismo en la etapa reproductiva del cultivo.

El peso de mil semillas no mostró diferencias significativas. Generalmente este parámetro está controlado genéticamente por parte de la planta y no se ve afectado aparentemente por la inoculación, estos resultados también han sido observados en otros cultivos como trigo (Carlier *et al.*, 2008).

Berti *et al.* (2007) reportaron que la coinoculación de soja con *P. fluorescens* BNM233 favoreció el rendimiento en grano, aunque no de manera significativa. Estos autores lograron con la coinoculación un aumento de 1,3% respecto de los ensayos con *B. japonicum* E109. Numerosos trabajos muestran el beneficio de la inoculación con *P. putida* o *P. fluorescens* sobre el crecimiento y rendimiento en diferentes cultivos (Grimes y Mount, 1987; Polonenko, 1987).

El mejoramiento de los cultivos por estimulación del crecimiento y la actividad de microorganismos benéficos aparece como una alternativa promisoría para las prácticas agrícolas que involucran extensiva aplicación de pesticidas y fertilizantes (Kohler *et al.*, 2006). Un prerrequisito de los efectos de promoción de crecimiento por las bacterias es el cercano contacto entre la planta y el organismo fitoefectivo (Höflich *et al.*, 1994); en estos y otros ensayos previos realizados en invernáculo y campo con *P. aurantiaca* SR1 quedó demostrada su estabilidad poblacional en rizósfera y presencia endófito, en diferentes cultivos (Rosas, 2005; Pasluosta, *et al.*, 2007a-b).

El aumento en la calidad de la microflora de suelos agrícolas a partir de la incorporación de organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos que contribuyen con la implantación, desarrollo y producción de cultivos, es una alternativa que contribuye a la sustentabilidad de los agroecosistemas (Caballero-Mellado *et al.*, 1992).

Tabla 5: Componentes de rendimiento en estadio R8.

TRATAMIENTOS	RENDIMIENTO (KG./HA)	PESO DE MIL GRANOS (G)
1. Inoculado <i>B. japonicum</i> E109	5158,80 a	169,83 ns
2. Inoculado <i>P. aurantiaca</i> SR1	3953,00 e	170,65 ns
3. Fertilizado con urea (N)	4162,68 d	170,25 ns
4. Inoculado con <i>P. aurantiaca</i> SR1 y fertilizado con N.	4748,85 b	171,58 ns
5. Coinoculado.	4478,79 c	169,91 ns
6. Control	3902,85 e	168,47 ns

Ref.: 1.semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y suelo sin fertilizar; 2. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo sin fertilizar; 3. suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 4. semillas inoculadas con *P. aurantiaca* SR1 y suelo fertilizado con 100 Kg/ha de urea; 5. semillas coinoculadas (*B. japonicum* E109 + *P. aurantiaca* SR1) y suelo sin fertilizar; 6. control: semillas sin inocular y suelo sin fertilizar.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que la coinoculación (previa inoculación con *B. japonicum* E109) con *P. aurantiaca* SR1 tiene una influencia benéfica potencial sobre soja, favoreciendo su productividad, la cual permitiría reducir la dosis de fertilización, lo que evitaría el exceso de la misma en las raíces y contaminaciones de napas debido a que los nitratos son fácilmente lixiviables. Se destaca la longitud de las raíces, esta fue mayor en aquellos tratamientos inoculados o coinoculados con *P. aurantiaca* SR1 respecto del control (Tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1: 44%; Tratamiento inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100 Kg/ha de urea: 24%; Tratamiento coinoculado con *P. aurantiaca* SR1 y *B. japonicum* E109: 23,5%), lo cual permitiría a la planta contar con una mayor área de exploración ante un estrés hídrico. En cuanto al rendimiento en grano (kg/ha), una de las variables más importantes analizadas, los tratamientos inoculados como coinoculados con *P. aurantiaca* SR1 se vieron incrementados con respecto al control en un 22% para el tratamiento Inoculado con *P. aurantiaca* SR1 + 100 kg/ha de Urea y un 15% para el tratamiento coinoculado, donde además el estadístico aplicado reflejó estas diferencias como significativas.

Cabe destacar que la cepa mostró variabilidad de respuesta, la cual puede asociarse a condiciones ambientales y edáficas, sin embargo sus cualidades como bacteria PGPR actuaron de forma positiva en varias de las variables analizadas.

En los últimos años nuestro país ha pasado a ser prácticamente productor de commodities, mayormente de oleaginosas y cereales. Con esto, ya sea por cuestiones de rentabilidad, políticas gubernamentales, precios internacionales, la producción de carne (bovina, porcina, aviar) ha disminuido y se ha confinado, lo que ha provocado una baja importante en la implantación de pasturas y verdeos para la alimentación de los mismos y con ello una caída en la fertilidad de los suelos. Como consecuencia de esto, las dietas pasaron a ser a base de maíz (grano) y derivados de oleaginosas, por lo que se debió aumentar la producción de estos cultivos.

Todo esto llevó a incorporar nuevas tecnologías, las cuales se fueron empleando con más frecuencia y en algunos casos desmesuradamente, como es el caso de los fertilizantes, ocasionando graves problemas al medio ambiente.

Una solución a este problema fue el descubrimiento de los organismos PGPR y de los efectos que provocaban en interacción con las plantas. Gracias a esto el uso de fertilizantes disminuyó en algunos cultivos repercutiendo positivamente en el medio ambiente.

Sin embargo no teniendo esta tecnología una claridad en sus resultados, hace difícil su aplicación, por lo que sería muy interesante llevar a cabo este trabajo en distintos

ambientes para evaluar cómo se comportan estas bacterias en diferentes condiciones edafoclimáticas.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrade, F.H., Aguirrezábal, L.A.N., Rizzalli, R.H. 2000. Crecimiento y rendimiento comparados. *In*: Bases para el Manejo del Maíz, el Girasol y la Soja. Andrade F.H. y Sadras V.O. (eds.). Editorial Médica Panamericana. Balcarce, Argentina. 61-96.
2. Allan, D. Graham P. 2002. Symbiotic Nitrogen Fixation, other N₂-fixing symbiosis. Department of Soil Water and Climate. University of Minnesota. [In:http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/symbioticnitrogenfixation/other.htm](http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/symbioticnitrogenfixation/other.htm).
3. Altamirano, F., Correa, N., Schroeder, E., Rosas, S. 1996. Actividad Biocontrol de *Pseudomonass aurantiaca* bajo condiciones in vitro. XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Bolivia, 173-175.
4. Altieri, M.A. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74 (1-3) 19-31.
5. Anderson, A.J., Habibzadegah-Tari, P., Tepper, C.S., 1988. Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 375–380.
6. Andrade, G., De Leij, F.A.A.M., Lynch, J.M. 1998. Plant mediated interactions between *Pseudomonass fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 311-316.
7. Backman P.A. and Turner J.T. Jr 1989 Plant response and disease control following seed inoculation with *Bacillus subtilis*. *In*: Brown JM (ed.) Proceedings of the Beltwide Cotton Products Research Conference [Book 2]. National Cotton Council of America, Memphis. pp 61–71.
8. Bakker, P.A.H.M., Van Peer, R., Schippers, B. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent *Pseudomonass*: mechanisms and prospects, *In*: Beemster, A.B.R., Bollen, M., Gerirch, M., Ruissen, M.A., Schippers, B., Tempel, A. (eds.), *Biotic Interactions and Soil-Borne Diseases*. Elsevier, Amsterdam, 221–230.

9. Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. 2005. Bacteria. Plant Growth Promoting. In: Encyclopedia of soils environment. (Ed) Hiller, D., Elsevier (1): 103-115.
10. Bashan, Y. and Levanony, H. 1990. Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology 36: 591-608.
11. Berti, M., Faggioli, V., Cazorla, C., Montecchia, M., Vigna, A., Maglione, C, Correa, O. 2007. La inoculación con *Pseudomonas fluorescens* estimula la micorrización natural del cultivo de soja. VI Encuentro nacional científico técnico de biología del suelo. IV Encuentro sobre fijación biológica de nitrógeno. Carmen Olmedo, Alicia Thuar y Estela Castro (compiladoras). Versión CD-ROM. 8p. ISBN 978-950-665-438-2.
12. Bolter CJ 1990 Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse wer mitochondria using the respiratoring inhibitor phosphine, mixothiazol and antimycin and spectral analysis of inhibite cytochromes. Archives of biochemistry and biophysics 278: 65-72.
13. Bowen, G. and Rovira, A. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. Sparks, D. (ed.). Advances in Agronomy 66: 1-103.
14. Bull, C.T., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathology 81: 954-959.
15. Caballero-Mellado, J., Carcano Montiel, M.G., and Mascarua Esparza, M.A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13: 243-253.
16. Carlier, E., Rovera, M., Rossi Jaume, A. and Rosas, S.B. 2008. Improvement of growth, under field conditions, of wheat inoculated with *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1. World Journal Microbiology and Biotechnology 24: 2653-2658.
17. Casida, L.E. Jr 1982. *Enfiser adhaerens* gen. nov, sp nov a bacterial predator of bacteria in soil. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 339-345.

18. Chanway, C.P., Hynes, R.K., Nelson, L.M. 1989. Plant growth-promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 21: 511-517.
19. Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N., O'Gara, F. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonass fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology* 23: 95-106.
20. Dashti, N., Zhang, F., Hynes R., Smith, D.L. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant and Soil* 188, 33-41.
21. Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R., Smith, D.L. 1998 Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant and Soil* 200:205–213.
22. De Souza, J.T., Weller, D.M., Raaijmakers, J.M. 2003b. Frequency, diversity and activity of 2,4 diacetylfluoroglucinol-producing fluorescents *Pseudomonass* spp. in dutch take-all decline soils. *Phytopathology* 93:54-64.
23. De Weber, L.A., Van Der Bjj, A.J., Dekkers, L.C., Simons, M., Wilffelman, G., Lugtemberg, B.J. 1995. Colonization of rhizosphere of crop plants by plant beneficial *Pseudomonass*. *FEMS Microbiology Ecology* 17: 221-228.
24. Del Gallo, M. and Fabbri, P. 1990. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chickpea (*Cicer arietinum*). *Symbiosis* 9: 283–287.
25. Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen nov sp nov a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 89-98.

26. Dubeikovsky, A.N., Mordukhova, E.A., Kochetkov, V.V., Polikarpova, F.Y., Boronin, A.M., 1993. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1277-1281.
27. Egli, D.B., and Zhen-Wen, Y. 1991. Crop growth rate and seeds per unit area in soybean. *Crop Science* 31:439-442.
28. Flores, M., Ferraris, O. 2001. INTA. Fertilización biológica. Experiencias en Trigo 17p.
29. Fred EB, Baldwin IL, McCoy E. 1932. Root nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison. USA: The University of Wisconsin Press.
30. Fridlender, M., Inbar, J., Chet, I., 1993. Biological control of soil borne plant pathogens by β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1211-1221.
31. Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Tomo I y II. Ed. de la Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto Córdoba. ISBN 950-665-109-4. Cap. 15
32. Fulchieri, M., Frioni, L. 1994 *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 921-923.
33. Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Journal* 68: 280-300.
34. Gamard P, Sauriol F, Benhamou N, Bélanger RR, Paulitz T.C. 1997. Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *Journal Antibiotics (Tokyo)* 50:742-749.
35. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.

36. Gonzalez, J.E., Marketon, M.M. 2003. Quorum sensing in nitrogen fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Journal* 64: 574-592.
37. Greenough, D.R. and Batson, W.E. 1989. Potential for *Bacillus subtilis* as a bioprotectant of cotton seedlings in soil infested with *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 79: 373.
38. Grimes, H.D. and Mount, M.S. 1984. Influence of *Pseudomonass putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 27-30.
39. Guiñazú, L., Pastor, N., Bergesse, J., Andrés, J., Rosas, S. 2007. Evaluación de la promoción del crecimiento de alfalfa (*Medicago Sativa*) por bacterias solubilizadoras de Fe y P. VI Encuentro nacional científico técnico de biología del suelo. IV Encuentro sobre fijación biológica de nitrógeno. Carmen Olmedo, Alicia Thuar y Estela Castro (compiladoras). Version CD-ROM. 13p. ISBN 978-950-665-438-2.
40. Halbleib, CM, Ludden PW 2000. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Journal of Nutrition* 130: 1081-1084.
41. Harrison J, Pou de Crescenzo MA, Sené O, Hirel, B. 2003. Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicum*? *Plant Physiology* 133: 253-262.
42. Hebbar, KP; Atkinson, D; Tucker, W; Dart, PJ. 1992. Suppression of *Fusarium moliniforme* by maize root-associated *Pseudomonass cepacia*. *Soil Biologogy and Biochemistry* 24 (10):1009-1020.
43. Hellriegel H, Wilfarth H 1988. Untersuchungen ubre die aticckstoff-nahrung der Gramineen und Leguminosen. *Zeitschrift fur der verschiedene Rubenzucker der Deutsches Reichs, Beilagehet*.
44. Hernández Montiel L.G. and Escalona Aguilar M.A., 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *La Ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana*. Vol. XVI, núm. 1.

45. Hernández, Y. 1998. La fijación biológica del nitrógeno. *Revista Cubana Ciencias Agrícolas*. 32: 233-245.
46. Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft* 98: 59-78.
47. Hirsch AM. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122: 211-237.
48. Höflich, G., Wiehe, W., Hecht-Buchholz, C. H. 1995. Rhizosphere colonization of different growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiology Research* 150: 139-147.
49. Höflich, G., Wiehe, W., Kuhn, G. 1994. Plant growth stimulation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50: 597-905.
50. Holt, J.G, Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (Editors). 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Maryland USA.
51. Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mezorhizobium* gen nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 895-898.
52. Jeffries. P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 1-16.
53. Jordan, D. C., and O. N. Allen. 1974. Family 111. *Rhizobiaceae* Conn, 1938, p. 261-264. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

54. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M., Tabata S. 2002. "Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, DNA Res. 9:189-197

55. Kloepper, J. and Schroth, M. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, Angers, France 2: 879-882.

56. Knight, T.J., Langston-Unkefer, P.J., 1988. Enhancement of symbiotic dinitrogen fixation by a toxin-releasing plant pathogen. *Science* 241: 951–994.

57. Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., Roldán, A. 2006. Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilisation and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil use and Management*. *Soil Use and Management*. 22: 298-304.

58. Lee, S, Flores-Encarnacion, M, Contreras-Zentella, M, Garcia-Flores, L., Escamilla, JE., Kennedy C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis in deficient *Gluconoacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology* 186: 5384-5391.

59. Lifshitz, R. Kloepper, J.W., Kozlowsky, M., Simonson, C., Carlson, J., Tipping, E.M., Zaleska, I., 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 390-395.

60. Loper, J.E. and Buyer, J.S. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4: 5-13.

61. Lucy, M., Reed E., Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.

62. Martin JK, Kemp JR 1980. Carbon loss from roots of wheat cultivars. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 551-554.

63. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. DeFago, G. 1994. Pyoluteorin production by *Pseudomonass fluorescens* strain CHAO is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100: 221-232.
64. Mays, J. 1997. *Simbiosis Leguminosas/Rizobia*. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad del Oriente. Nucleo de Monagas. Maturin. Venezuela, 113 p.
65. Miflin, BJ, Habash DZ 2002. The role of glutamine syntetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53: 979-987.
66. Miller, H.J., Henken, G., Van Veen, J.A., 1989. Variation and composition of bacterial population in the rhizospheres of maize, wheat and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 656–660.
67. Morse WJ 1950. History of soybean production. In: *Soybeans and soybean products*. Interscience Publishers. New York, p 3-59.
68. Nelson. 1992. Biological control of plant diseases, progress and challenges for the future. Tjamos, E.C., Papavizas G.C. yCook, R.J. (eds.). Plenum Press, New York pp. 353-357.
69. Nielsen, T.H., Sorensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christephersen, C., Givskov, M., Sorensen, J. 2002. Antibiotic and biosurfactant proprieties of cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonass spp.* from sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3416-3423.
70. Nishijima, F., Evans, W.R., Vesper S.J. 1988. Enhanced nodulation of soybean by *Bradyrhizobium* in the presence of *Pseudomonass fluorescens*. *Plant Soil* 111: 149–150.
71. O’Sullivan, D.J. and O’Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonass spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews* 56: 662-676.

72. Okon, Y. and Labandera-González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1591-1601.
73. Parmar, N., Dadarwal, K.R., 1999. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 86: 36-44.
74. Pascale, A.J. 1989. Evolucion del cultivo de la soja en Argentina. *Revista de la Asociación Argentina de la Soja*. Vol IX (1-2): 9-17.
75. Pasluosta, C., Andrés, J., Rovera, M., Guiñazú, L., Carlier, E., Rosas, S. 2005. Promotion of Alfalfa Growth by *Pseudomonas aurantiaca* in coinoculation with *Sinorhizobium meliloti*. *Biocell*. ISSN 0327-9547 (print), ISBN 1667-5746 (electronic) 29 (2): 52.
76. Perret X, Staeheling C, Broughton WJ 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 574:592.
77. Phillips, D.A., Streit, W.R., 1997. Applying plant-microbe signaling concepts to alfalfa: roles for secondary metabolites. In: Mckersie, B.D., Brown, D.C.W. (Eds), *Biotechnology and Improvement of Forage Legumes*, CAB International, University Press, Cambridge, pp. 319–342.
78. Piquin, A. 1968. Soja: cultivo del futuro argentino. *Revista Bolsa de Cereales* 2811: 38-43.
79. Polonenko D.R., Scher F.M., Kloepper J.W., Singleton C.A., Laliberte M., and Zaleska I. 1987. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 498–503.
80. Raaijmakers, J.M., Bonsall, R F., Weller, D.M. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*. 89: 470-475.
81. Raaijmakers, J.M., Vlami, M., De Souza, J. 2002. Antibiotic production by bacterial Biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 537-547.

82. Rosas S B, Avanzini G, Carlier E, Pasluosta C, Pastor N, Rovera M (2008) Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. Soil Biology and Biochemistry. ISBN: 0038-0717. doi: 10.1016/J.soilbio.2008.10.009.
83. Rosas, S., Altamirano F., Schroder, E., Correa, N. 2001. In vitro biocontrol activity of *Pseudomonass aurantiaca*. Phyton. International Journal of Experimental Botany 203-209.
84. Rosas, S.B., Rovera, M., Andrés, J.A., Pastor, N.A., Guiñazú, L.B., Carlier, E., Avanzini, G., Correa, N.S. 2005. Characterization of *Pseudomonass aurantiaca* as biocontrol and PGPR agent. Endophytic proprieties. In: Plant Microbe Interactions: Endophytes and Biocontrol Agents. Editors: Seppo Sorvari and Otto Toldi. pp. 91-99.
85. Rovera M., Carlier E., Pasluosta C., Avanzini G., Andres J., Rosas S. (2008) *Pseudomonas aurantiaca*: Plant Growth promoting traits, secondary metabolites and inoculation response In: Ahmad, I, Pichtel, J, Hayat, S (eds) Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to promote Plant growth. Wiley –VCH, Germany, pp 155-164.
86. Rovera, M., Cabrera, S., Rosas, S., Correa N. 2000. Characterization of antifungal agent produced by *Pseudomonass aurantiaca* for the use as biocontrol inoculant. In: Pedrosa FO, Hungría M, Yates MG, Newton WE (eds) Nitrogen Fixation: From Molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers: pp 602.
87. Sastry, M.S.R., Sharma, A.K., Johri, B.N. 2000. Effect of an AM fungal consortium and *Pseudomonass* on the growth and nutrient uptake of Eucalyptus hybrid. Micorrhiza 10: 55-61.
88. Schroeter, J. 1886. Die Pilze Schlesiens, p. 131-256. In F. Cohn, Kryptogamenflora von Schlesien. Band 3, Heft 3. J. U. Kern's Verlag, Breslau.
89. Scott DB, Farnden KJF, Roberts JG 1976. Ammonia assimilation in Lupin nodules. 263: 705-707.

90. Seong, K.-Y., Hofte, M., Boelens, J., Verstraete, W., 1991. Growth, survival and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 423– 428.
91. Shroyer P.J., Mikesell E.M. and Paulsen M.G. Spring Freeze Injury to Kansas Wheat. 1995. Agr. Exp. Station and Coop. Extension Service. KSU, Manhattan.
92. Sindhu S. S., Gupta, S. K., Dadarwal, K. R. 1999. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of growth of green gram (*Vigna radiata*). *Biology and Fertility of Soils* 29: 62–68.
93. Singh, C.S. and Subba Rao, N.S. 1979. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). *Plant Soil* 53: 387–392.
94. Smith, WH. 1976. Character and significance of forest tree root exudates. *Ecology* 57: 324-331.
95. Sprent JI, Sprent P 1990. Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects. London, UK: Chapman-Hall 256 p.
96. Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F., Pierson, L.S. III. 1990. Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* Species in the Rhizosphere of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 908-912.
97. Tilak, K.V., Ranganayaki, N, Manoharachari, C. 2006. Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by piogenpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of Soil Science* 57: 67-71.
98. Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H., Ouchi, S. 1988. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 78:1307-1311.

99. Ureta A, Nordlunds S 2003. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconoacetobacter diazotrophicus* by putative FeSII protein. *Journal of Bacteriology* 184: 5805-5809.
100. Vázquez, M.M., César, S., Azcón, R., Barea, J.M. 2000. Interactions between arbuscular micorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonass*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Biology* 15: 261-272
101. Ventimiglia L, H. Carta y S Rillo. 2000. Soja: Mejorando el rendimiento con la estimulación. En: Resultados de experiencias en Cosecha Gruesa. Campaña 1999/2000. INTA 9 de Julio. pp 114-121.
102. 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 NH_4^+ as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany* 79: 865-870.
103. Voisard, C., Keel, C., Hass, D., Defago, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonass fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal* 8, pp. 351-358.
104. Weir B 2004. Rhizobia taxonomy: The current taxonomy of rhizobia. Available in http://www.rhizobia.co.nz/Rhizobia_Taxonomy.html.
105. Weller, D.M. and Thomashow, L.S. 1993. Advances in rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opinion Biotechnology* 4: 306-311.
106. Weller, D.M., 1998. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathology* 26: 379-407.
107. Zeni, E. R. 1971. El cultivo sagrado. *Revista Bolsa de Cereales* 2845: 3-7.
108. Zhang F, Dashti N, Hynes R K and Smith D L 1997. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology at suboptimal root zone temperatures. *Annual Botany* 79: 243-249.