



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

“Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

EVALUACION DEL EFECTO *Achromobacter xylooxidans* y *Bacillus pumilus* EN CULTIVO DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) EN LA LOCALIDAD DE MANFREDI

Leceta Javier Hugo
DNI: 32.802.708

Director: Dr. Ing. Agr. Sergio G. Alemano
Co-dirección: Mic. Paula Castillo

Río Cuarto – Córdoba
Diciembre / 2015.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CO-INOCULACIÓN DE *Achromobacter xylosoxidans* y *Bacillus pumilus* EN EL CULTIVO DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.) EN LA LOCALIDAD DE MANFREDI

Autor: Leceta Javier Hugo

DNI: 32.802.708

Director: Ing. (Dr.) Sergio G. Alemanno

Co-Director: Mic. Paula Castillo

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del jurado evaluador:

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Aprobado por la Secretaría Académica__/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

A mi familia fuente de apoyo constante e incondicional, siempre, y más aún en mis años de carrera profesional.

A mis amigos y compañeros, por el apoyo brindado y gran cantidad de momentos compartidos que recordare siempre.

Al director y co-directora, por sus esfuerzos y dedicación, orientaciones, paciencia y guía para el desarrollo de este trabajo.

Gracias a todos.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
Origen y características del cultivo de girasol	1
Distribución y producción del cultivo de girasol	2
Las fases fonológicas del girasol	5
El rendimiento del cultivo de girasol y sus componentes	7
Mecanismos de resistencia del cultivo de girasol	8
Acción de las bacterias promotoras del crecimiento	8
Bacterias como inoculantes	10
Hipótesis	10
Objetivo	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Ensayos de inoculación y co-inoculación a campo	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

INDICE DE GRÁFICOS Y TABLAS

	Pág.
Fig. N° 1: Dispersión geográfica en Argentina del cultivo de girasol hasta la campaña 2010/2011.	2
Fig. N° 2: Superficie implantada de girasol 1970-2013.	3
Fig. N° 3: Superficie cosechada de girasol 1970-2013.	3
Fig. N° 4: Producción de girasol 1970-2013.	4
Fig. N° 5: Rendimiento de girasol 1970-2013.	5
Fig. N° 6: Fases fenológicas del Girasol.	5
Tabla N° 1: Variables medidas en los cultivos de girasol.	12
Fig. N° 7: Caracterización climática del ciclo agrícola 2012/2013.	13
Fig. N° 8: Caracterización climática del ciclo agrícola 2013/2014.	13
Fig. N° 9A: Número de capítulos de girasol por parcelas en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	15
Fig. N° 9B: Diferencia de número de capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.	15
Fig. N° 10A: Número de semillas por capítulos de girasol en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4:	16

plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.

Fig. 10B: Diferencia de número de semillas por capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013. 16

Fig. 11A: Peso de mil semillas en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. 17

Fig. 11B: Diferencia de peso de mil semillas expresada en Kg y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013. 17

Fig. 12A: Rendimiento en grano (kg ha^{-1}) en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. 18

Fig. 12B: Diferencia de rendimiento en granos, expresada en kg ha^{-1} y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013. 18

Fig. 13A: Porcentaje de materia grasa en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. 19

Fig. 13B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.	19
Fig. 14A: Rendimiento de materia grasa (kg ha^{-1}) en el ciclo agrícola 2012/2013. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	20
Fig. 14B: Diferencia de rendimiento de materia grasa, expresada en kg ha^{-1} y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.	20
Fig. 15A: Número de capítulos de girasol por parcelas, en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	21
Fig. 15B: Diferencia de número de capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.	21
Fig. 16A: Número de semillas por capítulos de girasol en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	22
Fig. 16B: Diferencia de número de semillas por capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.	22

Fig. 17A: Peso de mil semillas en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	23
Fig. 17B: Diferencia de peso de mil semillas expresada en gr y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.	23
Fig. 18A: Rendimiento en grano (kg ha^{-1}) en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	24
Fig. 18B: Diferencia de rendimiento en granos, expresada en kg ha^{-1} y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.	24
Fig. 19A: Porcentaje de materia grasa en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.	25
Fig. 19B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.	25
Fig. 20A: Rendimiento de materia grasa (kg ha^{-1}) en el ciclo agrícola 2013/2014. T: plantas sin tratamiento, testigo; T-F: plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; SF2: plantas inoculadas con la cepa SF2; SF3: planta inoculadas con la cepa SF3, SF4: plantas inoculadas con la cepa SF4; SF2+SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4.	26

con SF3 y SF4; SF2+SF3+SF4: plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4.

Fig. 20B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

26

RESUMEN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) ha sido desplazado en el área central hacia zonas marginales (pampa subhúmeda-semiárida) donde el cultivo sufre estrés hídrico, no sólo en estadios fenológicos avanzados, sino también en el establecimiento de las plántulas. La germinación y crecimiento temprano son estadios críticos en la mayoría de las especies cultivadas. Nuestro grupo de trabajo aisló de raíces de plantas de girasol cultivadas a campo en la localidad de Manfredi (Córdoba), las cepas bacterianas SF2 (*Achromobacter xylosoxidans*) y SF3 y SF4 (*Bacillus pumilus*). El objetivo fue evaluar en condiciones de campo, el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) sobre plantas de girasol, cuando las mismas son co-inoculadas con cepas de *Bacillus pumilus* y *Achromobacter xylosoxidans*, durante los ciclos agrícolas 2012/13 y 2013/14. Los tratamientos utilizados en ambas campañas fueron: **T**, Testigo, plantas sin inocular; **T-F**, Testigo fertilizado, plantas sin inocular y con 270 kg ha⁻¹ de urea, **SF2**, plantas inoculadas con cepa bacteriana SF2; **SF3**, plantas inoculadas con cepa bacteriana SF3; **SF4**, plantas inoculadas con cepa bacteriana SF4; **SF2-SF3** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF3; **SF2-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF4; **SF3-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF3 y SF4; **SF2-SF3-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4. En la campaña 2012/2013 el mayor rendimiento en grano lo mostró el tratamiento testigo-fertilizado mientras que las semillas tratadas con las cepas SF2+SF4 obtuvieron valores similares. En la campaña 2013/2014 la co-inoculación de cepas bacterianas SF2+SF3 evidenciaron el mayor rendimiento en grano y materia grasa. Es importante resaltar que las diferentes co-inoculaciones de cepas bacterianas mostraron un mayor efecto en los componentes del rendimiento que cuando fueron inoculadas de manera individual.

SUMMARY

The sunflower (*Helianthus annuus* L.) has been displaced in the central area into marginal areas (subhumid-semiarid pampa) where the crop water stress is suffered, not only in advanced phenological stages, but also in establishing seedlings. Germination and early growth stages are critical in most cultivated species. Our working group isolated from roots of plants cultivated in sunflower field conditions in the village of Manfredi (Cordoba), the bacterial strains SF2 (*Achromobacter xylosoxidans*) and SF3 and SF4 (*Bacillus pumilus*).

The aim was to evaluate under field conditions, the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on sunflower plants, when these are co-inoculated with strains of *Bacillus pumilus* and *Achromobacter xylosoxidans* during the agricultural cycle 2012/13 and 2013/14. Treatments used in both campaigns were: T, Control, uninoculated plants; TF, Control fertilized, uninoculated plants and 270 kg ha⁻¹ of urea, SF2, SF2 bacterial strain inoculated plants; SF3, plants inoculated with bacterial strain SF3; SF4, plants inoculated with bacterial strain SF4; SF2-SF3 plants co-inoculated bacterial strains SF2 and SF3; SF2-SF4 plants co-inoculated bacterial strains SF2 and SF4; -SF4 SF3 plants co-inoculated bacterial strains SF3 and SF4; SF2-SF3 SF4-plants co-inoculated bacterial strains SF2, SF3 and SF4. In the 2012/2013 season the greatest grain yield showed what the control-fertilized treatment while treated seeds with SF2-SF4 strains had similar values.

In the 2013/2014 season the co-inoculation of the strains bacterial SF3-SF2 showed the highest grain yield and fat. It is important to stand out that the different co-inoculations of bacterial strains showed a greater effect on yield components than when they were inoculated individually.

INTRODUCCIÓN

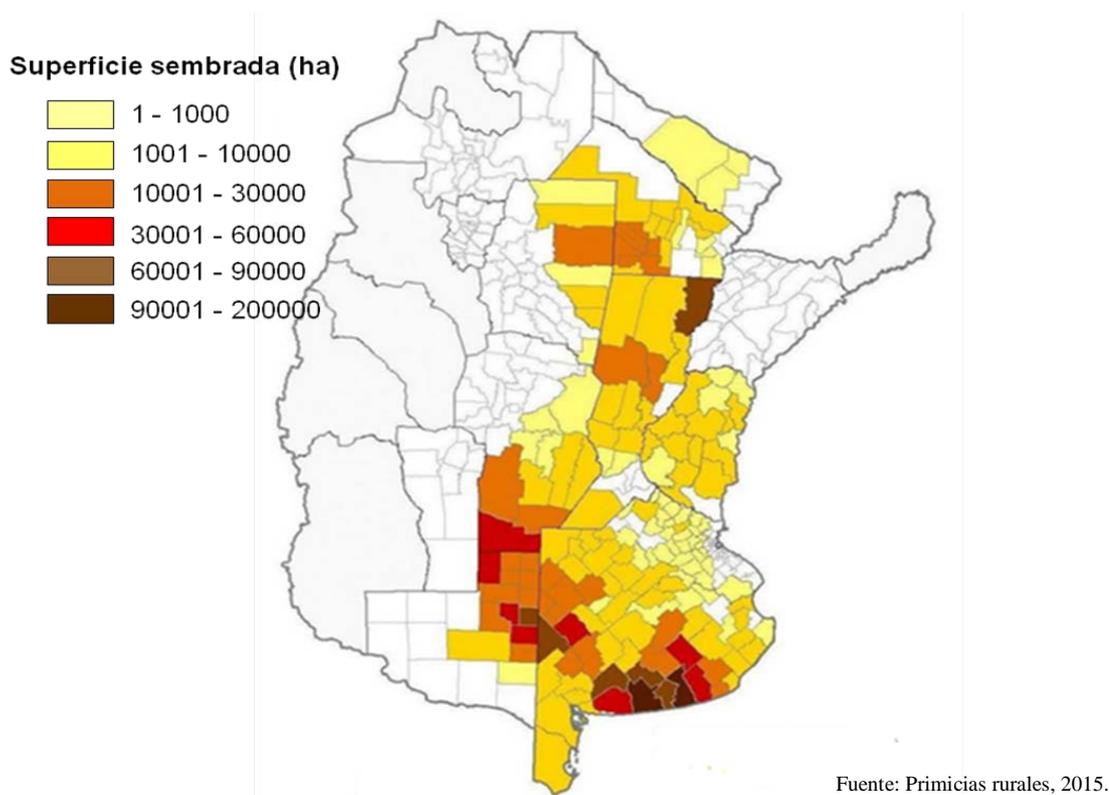
Origen y características del cultivo de girasol

El girasol pertenece a la familia *Asteraceae*, cuyo nombre científico es *Helianthus annuus* L., en griego *helios*, significa sol, y *anthos* flor; y el nombre de la especie (*annuus*) alude a la característica de anualidad del ciclo vegetativo-reproductivo de la planta (Alba-Ordóñez y Llanos-Company, 1990). El girasol tiene una antigüedad aproximada de 5.000 años y se produjo inicialmente en el norte de México y en el centro-sur de EE.UU. En la segunda mitad del siglo XIX, comenzaron en Rusia las experiencias para obtener madurez en menor tiempo y más aceite en las semillas. Las primeras referencias sobre girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizaron las primeras introducciones de semillas para su propio consumo. Su difusión como cultivo, comenzó en forma casi simultánea a partir de 1900, en el oeste de la provincia de Buenos Aires y en la provincia de Entre Ríos, por agricultores inmigrantes (ASAGIR, 2008).

El principal producto de la molienda de girasol y el que contribuye, casi excluyentemente, a su precio es el aceite. El resto, principalmente harina de proteína vegetal, se comercializa como insumo forrajero para la producción de carnes y leche. En el mercado mundial de aceite, los cinco más importantes -en lo referido a producción mundial medida en toneladas- son el de palma, soja, colza, girasol y el de palmiste (almendra de palma). El de girasol es el cuarto en orden de importancia. Todos muestran sostenidos incrementos en el consumo, a lo largo de los últimos tres años, el aceite de girasol registra incrementos de 4.6%, en el período considerado. En cuanto a la producción de aceite, en sus respectivas campañas se observa que en las campañas 2011/12; 2012/13; 2013/2014, se obtuvieron producciones del orden de 15.26, 13.14 y 16.25 millones de toneladas respectivamente. La enorme cantidad de usos que existen para estos productos alienta la esperanza de que la demanda de aceites vegetales siga creciendo en el tiempo y dé una mayor fortaleza a los precios internacionales. El crecimiento de la población mundial, los mayores ingresos per-cápita, los cambios en las dietas y un sistema más equilibrado de alimentación -sin dudas- tienen que reforzar a esta demanda de aceites en crecimiento, que a la larga terminará impactando positivamente en los precios internacionales de la soja, girasol y colza (BCR, 2015).

Distribución y producción del cultivo de girasol

El girasol se cultiva en Argentina desde el sudeste de la Región Pampeana (39 °S) hasta la Región Chaqueña (26°S) (Fig. 1), extendiendo su utilización fuera del país al sur de Bolivia, Paraguay, Brasil y Uruguay. Los cultivares utilizados en cada zona tienden a ser distintos, como así también la estación del año en que se cumple el ciclo del cultivo y los sistemas de cultivos en los que se hallan incluidos. El hecho de que se cultive la especie y se logren rendimientos comercialmente rentables en ambientes tan dispares, resulta en parte, de su plasticidad y al éxito de los fitomejoradores (Trápani *et al.*, 2003).



ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Siembra	Cosecha				Siembra						

Fuente: Esquema de siembra y cosecha en nuestro país (MAGyP, 2015).

Fig. 1. Dispersión geográfica en Argentina del cultivo de girasol hasta la campaña 2010/2011

El girasol se cultiva con facilidad, principalmente en condiciones de secano en una amplia gama de suelos (Shehata y El- Khawas, 2003).

En nuestro país, en el ciclo agrícola 12/13 la superficie implantada fue de 1.657.071, en la campaña 13/14 fue de 1.313.195 hectáreas (Fig. 2), mientras que en la última campaña 2014/15 la superficie implanta fue de 1.5 millones de hectáreas, con un volumen total recolectado de 3.16 millones de toneladas (SIIA, 2015).

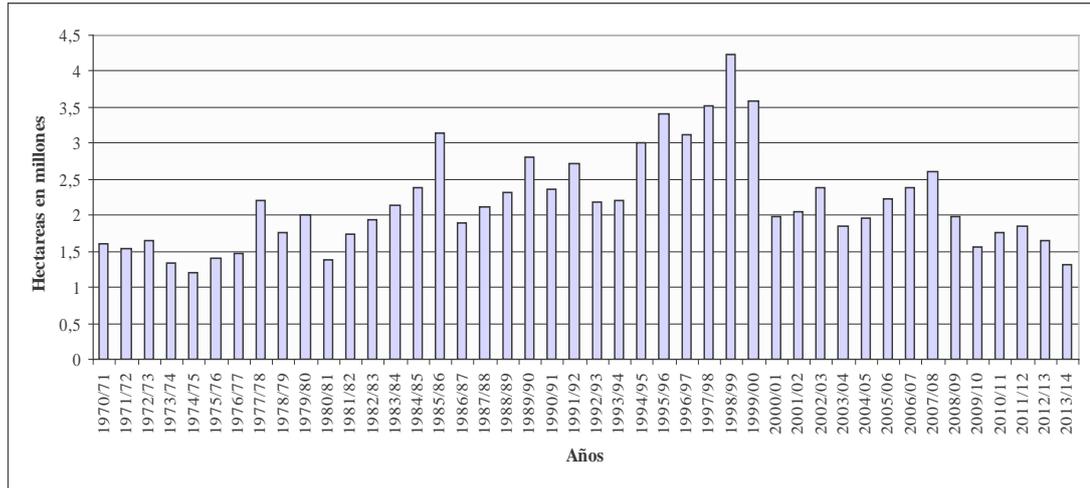


Fig. 2: Superficie implantada de girasol desde el año 1970 hasta el 2013. (SIIA, 2015)

Analizando la totalidad de las campañas que van de la de 1998 hasta el 2008, pueden distinguirse dos etapas muy claras, la primera que incluye desde 1998 hasta el 2000, y la segunda que incluye desde el 2001 hasta la actualidad. En la primera etapa, hubo un fuerte entusiasmo por el cultivo, que se reflejó en el ciclo agrícola 1998/1999, alcanzando los 4,24 millones de hectáreas cosechadas (Fig. 3), con una producción de 7,1 millones de toneladas ése año (Fig. 4), lo cual superó al rendimiento histórico en 1762 kg ha^{-1} . En la campaña 1999/2000, se produjeron más de 6 millones de toneladas, ambas ofertas fueron volcadas a un mercado mundial debilitado en materia de precios, a raíz de la irrupción de la oferta del aceite de palma.

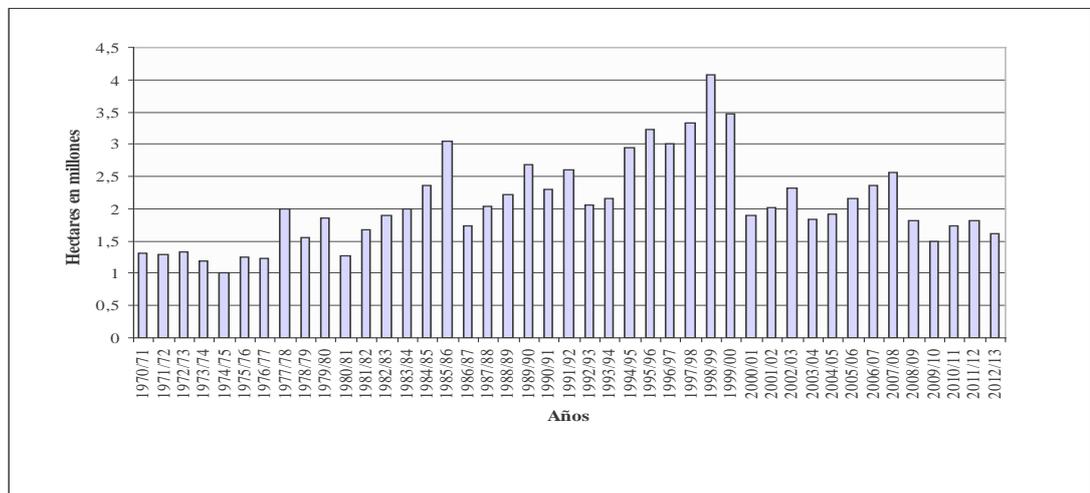


Fig. 3: Superficie cosechada de girasol desde el año 1970 hasta el año 2013. (SIIA,2015)

La segunda etapa se inicia con una abrupta caída del área sembrada y cosechada como consecuencia del quebranto económico inducido por los magros precios internacionales. La superficie cosechada cayó un 45% en 2000/2001 y la producción apenas llegó a 3,18 millones de toneladas (Figs. 3 y 4). Luego de dicho periodo, hubo una recuperación gradual en el área sembrada, que alcanzó las 2,7 millones de hectáreas en 2007/2008 (36,6% más que el valor piso), con una producción que alcanzó los 4,51 millones de toneladas (Fig. 4). (SIIA, 2015).

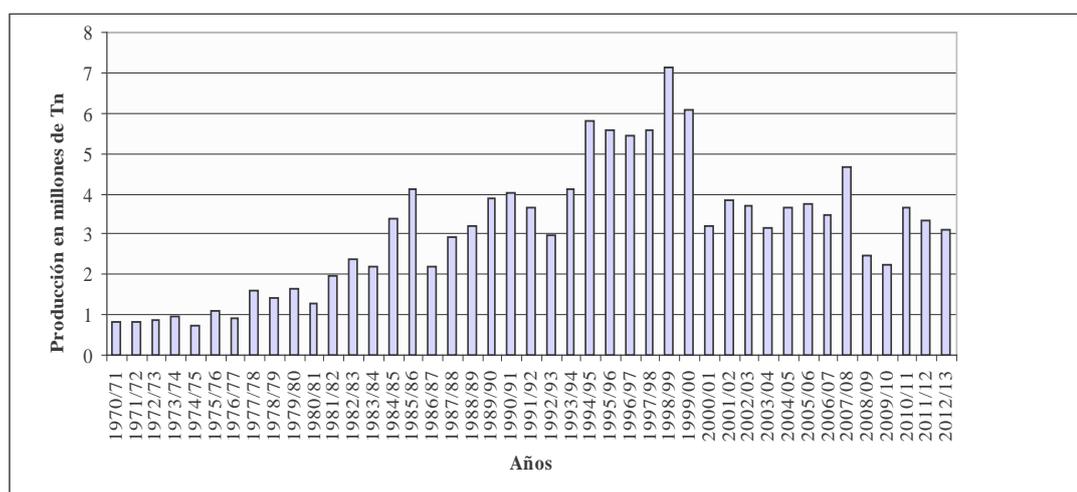


Fig. 4: Producción de girasol desde el año 1970 hasta el año 2013 Fuente: (SIIA,2015)

La traslación del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad, ha hecho que los rendimientos se hayan mantenido a partir de los cambios tecnológicos incorporados. En los últimos ocho años, el rango de rendimiento osciló entre 1493 kg ha⁻¹ y 2107 kg ha⁻¹ (Fig. 5).

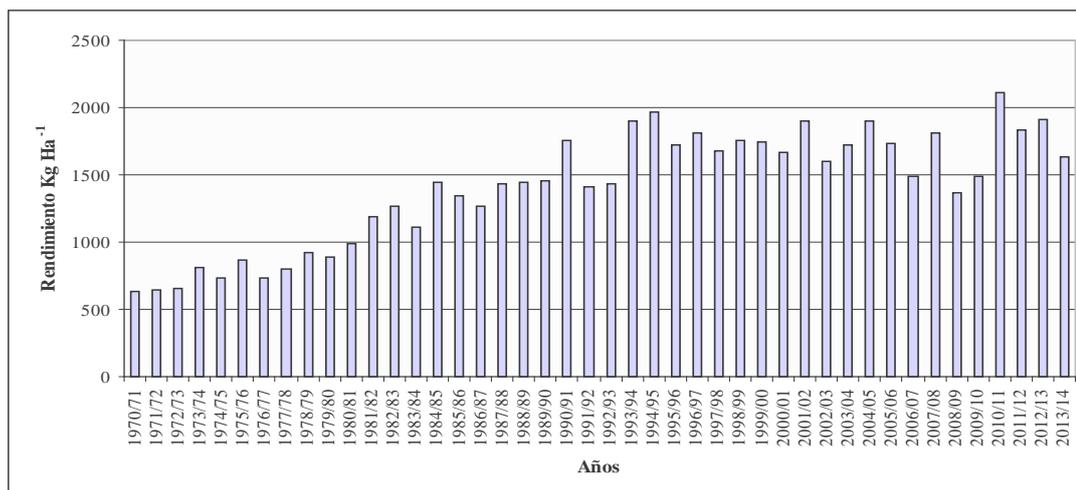


Fig. 5: Rendimiento de girasol desde el año 1970 hasta el año 2013 Fuente: (SIIA,2015)

Luego de la caída evidenciada en el área sembrada y en la producción de girasol, a fines de los años '90 y principios del 2000, ambas variables se mantuvieron relativamente estables, en el caso de la superficie sembrada en 2 millones de hectáreas y la producción, en los 3,5 millones de toneladas. La estabilidad relativa de los últimos años se explica, en gran medida, por la sustitución en el mercado interno por aceites más baratos (soja), especialmente a partir de la crisis económica del 2001 y también mayores facilidades y menores costos en el cultivo de la soja frente a los problemas técnicos asociados al girasol (MECON, 2011).

Fases fenológicas del Girasol

El desarrollo del cultivo es la sucesión progresiva de cambios fisiológicos y morfológicos que dan lugar a distintos estados de las plantas. El mismo se encuentra bajo control genético y es modulado en mayor o menor medida por los factores del ambiente. La identificación de los estados puede hacerse utilizando escalas que se basan en cambios visibles, por ejemplo, la floración (Fig. 6). Se considera que el cultivo alcanzó un determinado estado fenológico cuando una proporción mayoritaria de la población de las plantas alcanzó dicho estado (Trápani *et al.*, 2003).

Los principales factores ambientales que controlan la duración de las fases son la temperatura y el fotoperíodo; la importancia relativa de cada uno de ellos varía según la fase que se considere, el ambiente en el que crece el cultivo y el genotipo.

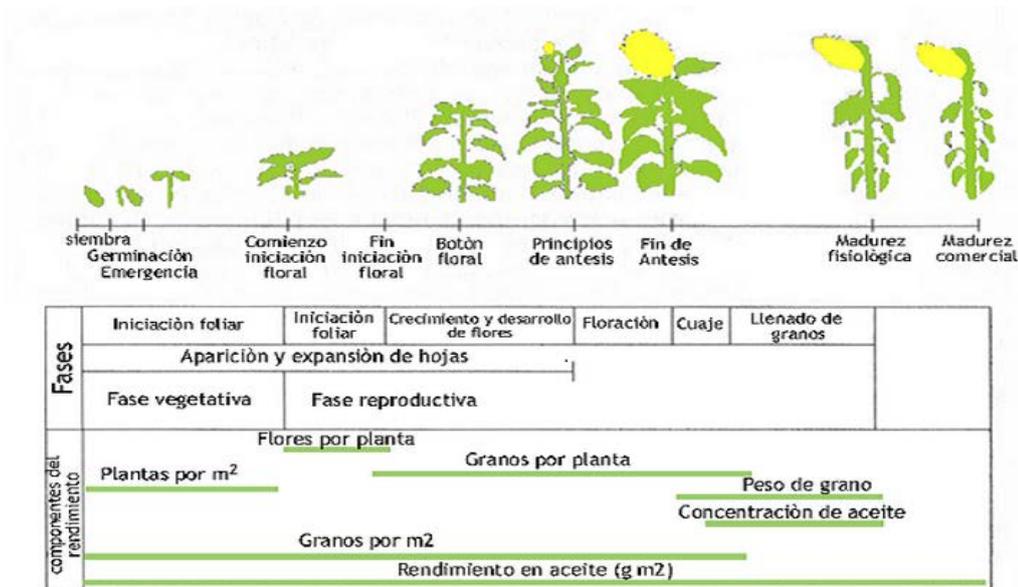


Fig. 6 Fases fenológicas del Girasol (Trápani *et al.*, 2003).

La planta de girasol sufre cambios durante su desarrollo y es de acuerdo a los mismos que se diferencian las fases: siembra-emergencia, iniciación floral, primera antesis y madurez fisiológica

Durante la fase de **siembra-emergencia**, tienen lugar los procesos de imbibición de la semilla, emergencia de la radícula, crecimiento de la plántula y su emergencia, abriéndose el gancho plúmular sobre la superficie del suelo. Se cumple así la fase de establecimiento del cultivo. La temperatura es el factor más importante en el control de la germinación de semillas no dormidas en suelos no compactados y con adecuada provisión hídrica. La temperatura óptima para la germinación de las semillas de girasol es cercana a los 26 °C, con máximas de 40 °C y mínimas de 3 °C.

El agua también afecta la emergencia, por una parte actúa sobre la imbibición de la semilla y el crecimiento posterior de la plántula, y por otro actúa condicionando la temperatura y la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa del suelo. Con el aumento de la humedad, la amplitud térmica del suelo es menor y el oxígeno difunde más lentamente. El potencial agua del sustrato puede tener efectos importantes sobre la tasa de germinación, el exceso de agua durante esta fase tiene efectos negativos importantes sobre el establecimiento del cultivo ya que el girasol es una especie susceptible al anegamiento (Trápani *et al.*, 2003).

Los distintos factores que provocan fallas en la germinación o en la emergencia de plántulas afectan el establecimiento del cultivo con la obtención de canopeos poco uniformes y/o con densidades poblacionales sub-óptimas. Sin embargo, la plasticidad del crecimiento de hojas y raíces del girasol compensan dicho efecto negativo (Trápani *et al.*, 2003).

La fase de **iniciación floral** comienza con la emergencia de la plántula y finaliza cuando el ápice del vástago, cambia su forma y pasa a diferenciar la inflorescencia y sus flores. Es durante esta fase cuando se define la capacidad del cultivo de producir área foliar, pues queda fijado el número de hojas por planta. En paralelo, comienza el proceso de establecimiento del canopeo, asociado a la expansión de hojas emergidas (Trápani *et al.*, 2003).

La fase de **primera antesis** comienza con la aparición de los primeros primordios florales en el ápice y finaliza con el comienzo de la antesis de las flores de la periferia de la inflorescencia. Durante esta fase se diferencian los primordios florales y las flores crecen y maduran. Al mismo tiempo continúan el desarrollo de los primordios foliares ya iniciados y no emergidos, y la emergencia y despliegue de hojas. Una vez finalizada la diferenciación floral y hasta la antesis las flores crecen y adquieren funcionalidad: los estigmas adquieren receptividad y el polen, viabilidad.

Durante la sub-fase iniciación floral-primera antesis, la expansión foliar finaliza y el índice de área foliar del cultivo alcanza normalmente su valor máximo. El tamaño de las flores y su número también alcanzan sus valores máximos; éstos serán iguales o menores a los valores potenciales para cada cultivar y sitio, según hayan sido las condiciones ambientales imperantes (Trápani *et al.*, 2003).

La **madurez fisiológica** comienza con la antesis de las flores periféricas del capítulo y finaliza con la madurez fisiológica. La madurez comercial se determina según el contenido hídrico del fruto requerido para la cosecha mecánica. La duración de la floración en una inflorescencia es de unos 7-10 días; unos 4 círculos de flores por día entran en antesis dependiendo de la temperatura. La duración de la fase antesis-madurez fisiológica depende principalmente del cultivar y de la temperatura (Trápani *et al.*, 2003).

El rendimiento del cultivo de girasol y sus componentes

El rendimiento del girasol (peso de frutos por unidad de superficie) puede ser dividido en diferentes componentes. Estos componentes son: el número de capítulos por unidad de superficie, el número de frutos llenos por capítulo y el peso individual de esos frutos. El número de capítulos por unidad de superficie depende principalmente de la densidad del cultivo (plantas por hectárea), mientras que el número de frutos llenos por capítulo es el resultado del número de flores producidas que son fecundadas y del número de flores fecundadas que cuajan y producen frutos. (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

Los distintos componentes del rendimiento son determinados en diferentes estadíos del cultivo. Así por ejemplo, el número de primordios florales por capítulo se determinan en estadíos tempranos del cultivo (entre 30 y 50 días después de la siembra). El número de flores que son fecundadas es determinado durante la floración. El número de frutos que

cuajan y se transforman en un fruto lleno comienza a fijarse poco tiempo después de la floración. El período durante el cual se determina el peso individual de los frutos comienza después del cuajado de los mismos y se extiende hasta la madurez fisiológica. También durante este período se determina el porcentaje de aceite (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

El número de capítulos por unidad de superficie resulta del número de plantas capaces de desarrollar una inflorescencia. Dicho componente del rendimiento depende por lo tanto del número de semillas por unidad de superficie que son sembradas y de la proporción de éstas que germinan, emergen, crecen y se desarrollan. Las pérdidas de plantas o de capítulos son poco frecuentes, produciéndose en casos de ataques por microorganismos patógenos (por ejemplo de *Sclerotinia* sp.) o por quebrado o vuelco (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

Mecanismos de resistencia del cultivo de girasol

Debido al avance de la soja, el cultivo de girasol ha sumado áreas marginales al sistema agrícola argentino (Adreani, 2004). Estas zonas se caracterizan por un régimen hídrico con ciertas particularidades tales como deficiencia hídrica durante el ciclo del cultivo e irregularidad en la distribución de las precipitaciones. El girasol posee mecanismos de adaptación a los déficits hídricos, tanto a corto como a largo plazo. Por ejemplo, una reducción de la apertura de los estomas de la planta de girasol afecta más la transpiración que la fotosíntesis, debido a que transpira menos y el CO₂ fluye igualmente al cloroplasto. El efecto de un déficit hídrico en la etapa vegetativa del cultivo puede reducir en forma importante la superficie transpiratoria, disminuyendo el área foliar principalmente a través de una disminución en la tasa de expansión de las hojas, y en menor medida, en la tasa de aparición de las mismas. Un déficit hídrico en la etapa de post-floración reduce la superficie transpiratoria a través de una aceleración de la senescencia de las hojas. Existe variabilidad genética intraespecífica en algunas de las características ligadas con la adaptación a los déficits hídricos. Así por ejemplo, se encontró que el efecto de un déficit hídrico sobre la resistencia estomática es diferente en distintos genotipos (Aguirrezábal *et al.*, 2001).

Acción de las bacterias promotoras del crecimiento

La interfase constituida por las raíces de las plantas y el suelo adherido a las mismas se denomina rizósfera (Babalola, 2010). Ngoma *et al.*, (2012) la definen como el volumen de suelo cercano a la raíz, donde se producen interacciones entre microorganismos y la planta para el aprovechamiento de diferentes nutrientes (Jeffries *et al.*, 2003). Los compuestos liberados por las raíces de las plantas como azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos alifáticos, proteínas y ácidos grasos, crean un medioambiente único en la rizósfera (Badri *et*

al., 2009) y podrían actuar como moléculas señal para atraer microorganismos específicos o ser usados como fuentes de carbono para la nutrición microbiana (Antoun y Prevost, 2006).

Bacterias de diferentes clases taxonómicas se encuentran en el suelo, y muchas de ellas pueden aumentar el crecimiento y productividad de las plantas, las mismas son denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB. Los intentos de introducir las mismas en la rizosfera de cultivos agrícolas, a arrojado diversos grados de fracaso debido a la dificultades de incorporar especies bacterianas no residentes en las comunidades microbianas establecidas. Cepas aisladas de una planta, pueden resultar altamente eficientes para promover el crecimiento vegetal y realizar esta función más eficientemente que cepas exóticas o no nativas. Dentro de las PGPB se encuentran: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, y *Rhizobium*.

Las PGPB tienen mecanismos de acción directos e indirectos. Uno de los mecanismos de acción directos es la producción de hormonas tipo fitohormonas. Algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus*, producen y liberan ácido indol-acético (AIA), giberelinas (GAs), citoquininas, entre otras, en la rizósfera de las plantas, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente marcado cuando se encuentran en estado de plántula (Lugtenberg *et al.*, 2009).

Dentro de los mecanismos de acción indirectos se incluye el biocontrol frente a otros organismos fitopatógenos. El control biológico y su utilización como herramienta biotecnológica resulta interesante ya que reducirá el impacto de agroquímicos, y permitirá una gestión razonable y sostenible (Antoun y Prevost, 2006).

En girasol se caracterizaron e identificaron cepas bacterianas a partir de raíces de plantas cultivadas en irrigación y sequía, obteniendo 8 aislamientos con propiedades promotoras del crecimiento, las cuales fueron denominadas SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7 y SF8. La caracterización genotípica mediante secuenciamiento 16s rRNA arrojó 99.9% de homología con *Bacillus pumilus* para las cepas SF1, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7 y SF8, y 99.9% de homología con *Achromobacter xylosoxidans* para la cepa SF2 (Forchetti *et al.*, 2007).

Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* son bacterias Gram-positiva, formadoras de esporas, y con alta tolerancia a condiciones ambientales adversas. Debido a su capacidad de esporular, las cepas de *Bacillus* se adaptan fácilmente a formulaciones comerciales para aplicar a campo (Liu y Sinclair, 1993). *Bacillus* spp. induce el crecimiento de las plantas a través de la absorción de nutrientes tales como N, P, K y Fe (Biswas *et al.*, 2000).

Las bacterias del genero *Achromobacter* son bacilos Gram-negativo, aerobios, no fermentativos (Forchetti *et al.*, 2010). Este género fue citado por Koch y Oya (1974) como

fijador de nitrógeno de vida libre y ha sido citado también por Jha y Kumar (2009) como bacterias endofíticas promotoras del crecimiento vegetal de trigo.

Nuestro grupo de trabajo determinó que las cepas SF2, SF3, SF4 y SF5, inhibieron el crecimiento de hongos específicos de girasol, principalmente de *Verticillium dahliae* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta capacidad biocontroladora mejoraría indirectamente el crecimiento de las plantas en condiciones ambientales normales y de estrés (Forchetti *et al.*, 2010).

Bacterias como inoculantes

Debido a las características de las bacterias nativas de girasol y a su capacidad para desarrollarse en medios de cultivo sintéticos, aún en condiciones de estrés, es que se podrían utilizar para inocular semillas, brindando beneficios a la planta durante todo su desarrollo.

Bashan (1998) definió como inoculante a la formulación que contiene una o más cepas (o especies) bacterianas beneficiosas en un material de soporte económico y fácil de usar, ya sea orgánico o inorgánico, o sintetizado a partir de moléculas definidas. Según Vessey (2003), todas las PGPRs que ejercen un efecto positivo en el estado nutricional de sus hospedantes se conocen como biofertilizantes; en este sentido, los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* se utilizan como tal, principalmente debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Actualmente diversas mezclas de estas bacterias también están comercialmente disponibles como inoculantes para aplicaciones agrícolas.

Debido al interés comercial del cultivo de girasol en Argentina y otros países, y a la necesidad de establecerlo en áreas desfavorables, se ha propuesto la co-inoculación con cepas nativas como una nueva herramienta tecnológica. Por lo tanto, es de interés el estudio de las interacciones girasol-bacterias como así también su supervivencia en condiciones de estrés hídrico.

HIPÓTESIS

Bacterias co-inoculadas de *Bacillus pumilus*, y *Achromobacter xylosoxidans* con características PGPR capaces de crecer en condiciones de escasez de agua, promoverán el crecimiento y mejorarán el rendimiento de plantas de girasol en condiciones de campo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en condiciones de campo el efecto PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) sobre plantas de girasol de la co-inoculación de bacterias de *Bacillus pumilus* y *Achromobacter xylosoxidans* aisladas de la rizósfera del mismo cultivo a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de inoculación y co/inoculación a campo

Los ensayos se llevaron a cabo durante los ciclos agrícolas 2012/2013 y 2013/2014, en el campo de la Estación Experimental del INTA Manfredi, (Latitud Sur 31°49'12'', Longitud 63°46' 00'', altura sobre el nivel del mar 2192 m), en la provincia de Córdoba. La zona presenta un relieve de lomas casi planas, muy extendidas, con escasa pendiente regional que no supera el 0,5 %. El drenaje superficial del agua de lluvia, está caracterizado por la presencia de líneas de escurrimiento, orientadas en general de noroeste a sureste. Estas líneas de desagüe actúan como tales después de las lluvias, llevando las aguas hacia áreas intermedias y más bajas ubicadas hacia el este - sureste de la región (INTA, 2015).

El suelo se encuentra en planicies siendo el suelo del tipo Molisoles y pertenecen al gran sub-grupo de Haplustoles y dentro de ellos a los haplustoles énticos que poseen una textura franco limosa con suelos de alrededor de 100 cm de profundidad, ello según descripción de GeoInta (Nº de símbolo cartográfico MNem-4)

El perfil que representa el modal de la serie Oncativo, fue descripto 6,4 km al Sud-Oeste de la ciudad del mismo nombre. Desarrollado sobre sedimentos eólicos, de textura franco limosa, cuya secuencia de horizontes es A1, A/C, Ck. Es un suelo profundo, bien drenado; está en condiciones naturales moderadamente estructurado y posee muy buena capacidad de almacenaje de agua. Hasta 200 cm de profundidad es capaz de almacenar 570 mm de agua; mientras que el agua útil o disponible para los cultivos es de 305 mm. Serie carta de suelo-República Argentina, hoja 3361-32 (Oncativo). Cba. 1987 (Geo-INTA, 2015).

La siembra se realizó el 30/11/12 y 25/11/13, y la cosecha el 5/04/13 y 13/04/14 para la primera y segunda campaña agrícola respectivamente. El híbrido comercial utilizado para llevar a cabo los ensayos fue Paraíso 24 provisto por Nidera.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Achromobacter xylosoxidans* (cepa SF2) y *Bacillus pumilus* (cepas SF3 y SF4) y los tratamientos fueron:

T: testigo, plantas sin inocular

TF: testigo fertilizado químicamente, plantas sin inocular y con 270 kg ha⁻¹ (representando 128 kg de Nitrógeno)

SF2: plantas inoculadas con cepa bacteriana SF2

SF3: plantas inoculadas con cepa bacteriana SF3

SF4: plantas inoculadas con cepa bacteriana SF4

SF2-SF3: plantas co-inoculadas con las cepas bacterianas SF2 y SF3

SF2-SF4: plantas co-inoculadas con las cepas bacterianas SF2 y SF4

SF3-SF4: plantas co-inoculadas con las cepas bacterianas SF3 y SF4

SF2-SF3-SF4: plantas co-inoculadas con las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4.

La inoculación se realizó con el agregado de 1 ml de cultivo bacteriano en medio LB, creciendo a 28°C/100 RPM (hasta alcanzar una densidad óptica de 0.75-1 y 108 ufc/ml), disuelto en 0.16 ml de adherente cada 100 g de semillas de girasol; o sea, 500 ml de inoculante + 80 ml de adherente protector concentrado soluble (derivado celulósico) / 50 kg de semillas. La evaluación de las plantas se realizó en el estadio fenológico reproductivo (R9), según clasificación de Shneiter & Miller, (1981), mediante los parámetros detallados en Tabla 1.

ABREVIATURA	VARIABLE
CAP	Capítulos cosechados/parcela (n°)
RENSH	Rendimiento grano/ha (ajustado 11 % humedad) (kg ha ⁻¹)
MG	Contenido de aceite (%)
PS	Peso de 1000 semillas (g.)
RENMGH	Rendimiento materia grasa/ha (Kg ha ⁻¹)* ₁
RENSA	Rendimiento grano/ha (ajustado base 42% MG) (kg/ha.).
HUM	Humedad de las semillas (%)
NSC	Numero de semillas por capitulo

*₁ Determinado por un equipo de resonancia magnética nuclear, disponible en el INTA EEA Manfredi

Tabla N° 1: Variables medidas en los cultivos de girasol

El diseño experimental se correspondió con un Alpha Lattice con 4 repeticiones al azar, colocadas en 3 hileras de 5.10 metros. Los datos fueron analizados mediante una test ANNOVA, utilizando para ello el programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software), versión 8.

El clima durante los ensayos realizados en el campo de la Estación Experimental del INTA Manfredi, durante los ciclos agrícolas 2012/2013 y 2013/2014 fue caracterizado durante el ciclo del cultivo evaluado mediante las precipitaciones y temperaturas medias mensuales (Figs., 7 y 8).

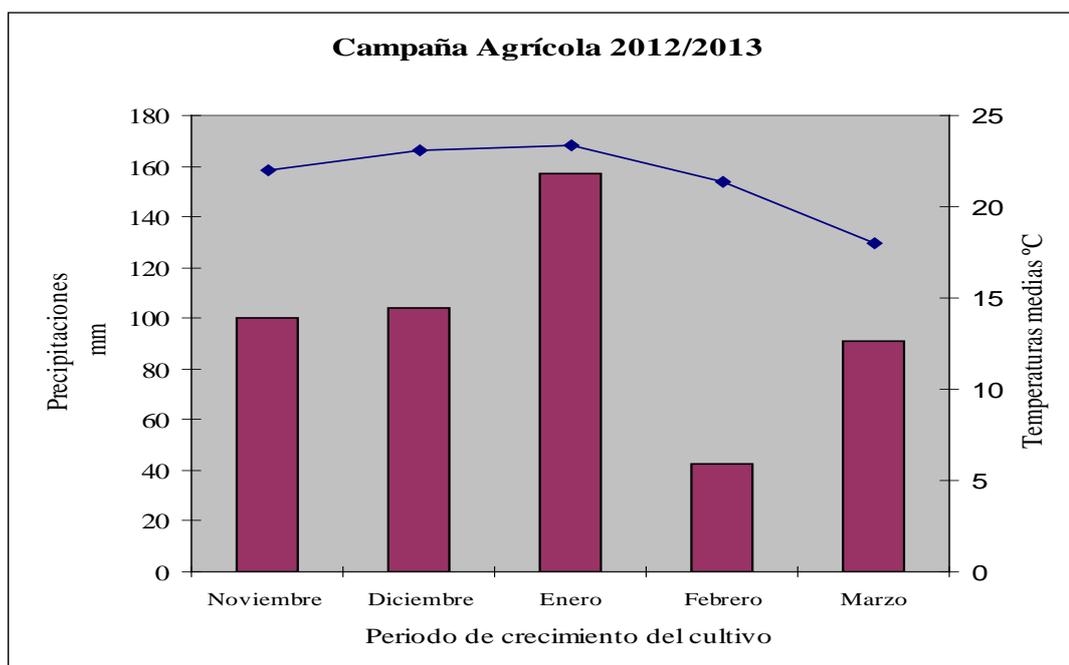


Fig. 7: caracterización climática del ciclo agrícola 2012/2013

Las precipitaciones registradas de noviembre a marzo en la campaña 2012-2013, acumulan un total de 495.5 mm. (INTA, 2015).

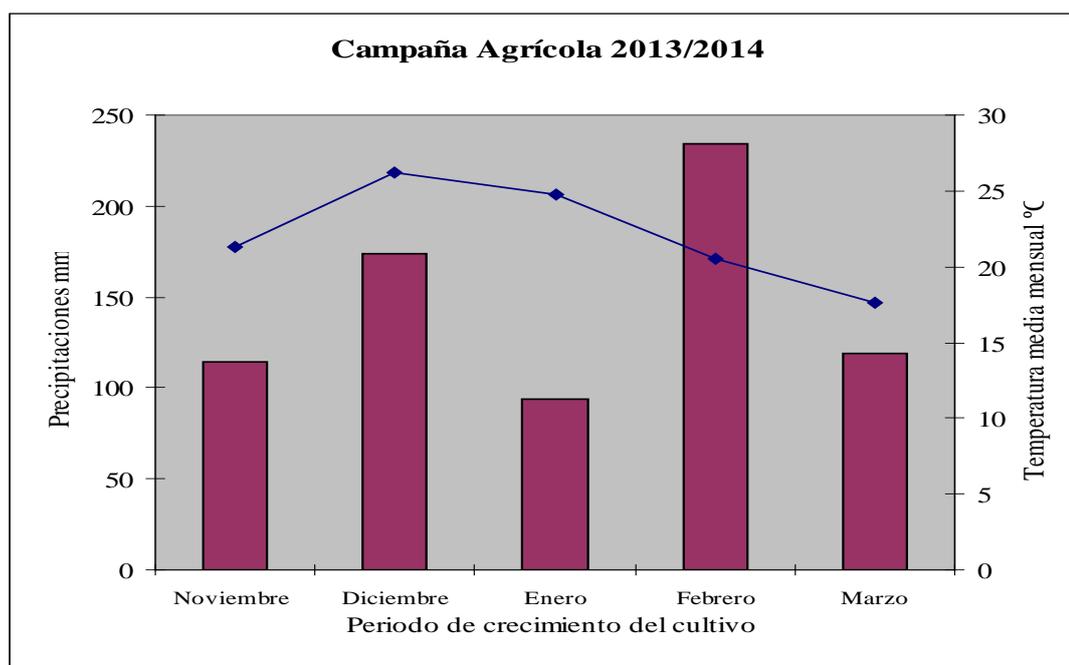


Fig. 8: Caracterización climática del ciclo agrícola 2013/2014

Las precipitaciones registradas de noviembre a marzo en la campaña 2013-2014, acumulan un total de 735 mm. (INTA, 2015).

Caracterización del material genético utilizado (datos aportados por el semillero)

PARAÍSO 24

Tipo de híbrido	Negro
Ciclo	Simple
Tipo de cruzamiento	Intermedio tardío
Días a floración** N	72
Días a floración** C	75
Días a floración** S	66
Días a maduración** N	116
Días a maduración** C	116
Días a maduración** S	109
Vuelco	Muy bueno
% de aceite en grano	52
Plantas logradas recomendadas C por ha. (x1.000) S	50 - 55 55 - 58
NEA y PY	40 - 45

** Días desde emergencia. Según fecha de siembra. N: Norte - C: Centro - S: Sur Consulte por disponibilidad de semilla tratada con Poncho Sol*. *Poncho Sol disponible exclusivamente sobre semilla tratada "en origen" (Advanced Seed Treatment Technology). *CLEARFIELD, CLEARFIELD Plus y sus correspondientes logos son marcas registradas de BASF. Poncho es marca registrada de Bayer.

Zona Recomendada para la siembra



Fuente: Nidera semillas (2011)

RESULTADOS-CAMPAÑA 2012-13

-Número de capítulos (por parcela)

El tratamiento con fertilización química, evidenció el mayor aumento en dicha variable, con un 13.28 % (Fig. 9B) de diferencia respecta al testigo. Todas las inoculaciones y co-inoculaciones superaron al testigo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Fig. 9A).

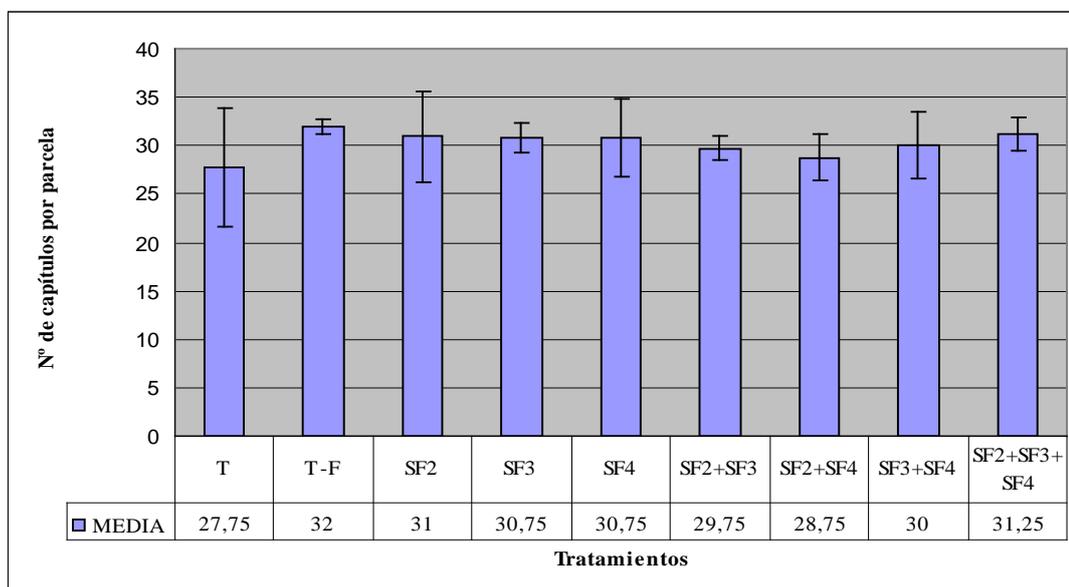


Fig. 9A: Número de capítulos de girasol por parcelas, campaña 2012-2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

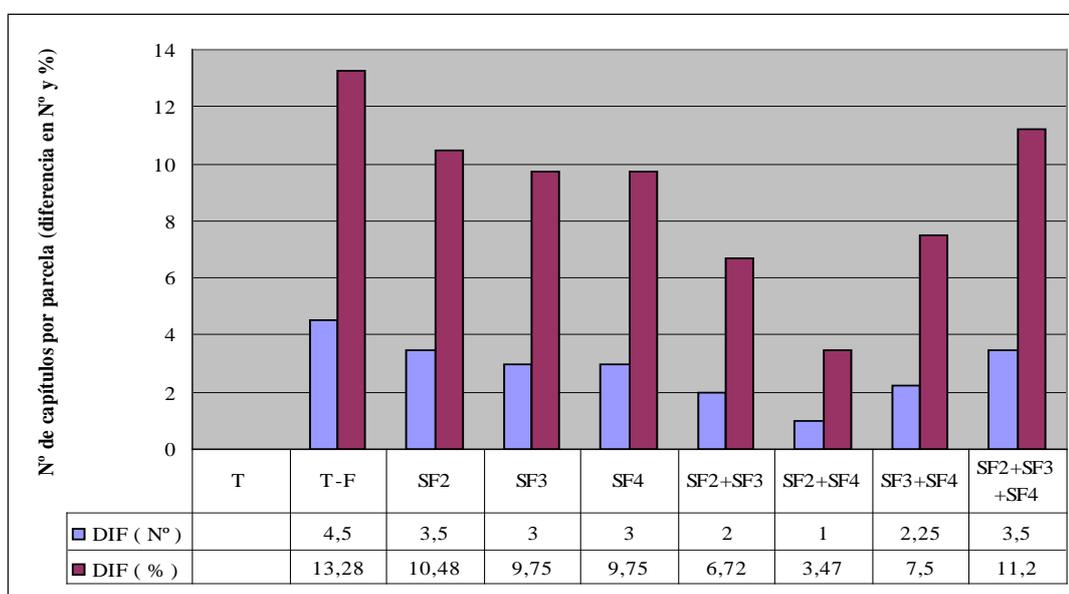


Fig. 9B: Diferencia de número de capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.

-Semillas por capítulo

El número de semillas por capítulo es un componente directo que define el rendimiento. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, el tratamiento inoculado con la cepa SF2 (609.04 semillas por capítulo) incrementó un 10,4 % el parámetro medido, respecto al testigo sin inocular T (545.66 semillas por capítulo), incluso superó levemente al tratamiento con fertilización química (Figs. 10A y B).

Las co-inoculaciones con SF2+SF4 y con SF2+SF3+SF4, superaron en 3,63 % y 4,32 % respectivamente a las plantas sin inocular (Fig. 10B).

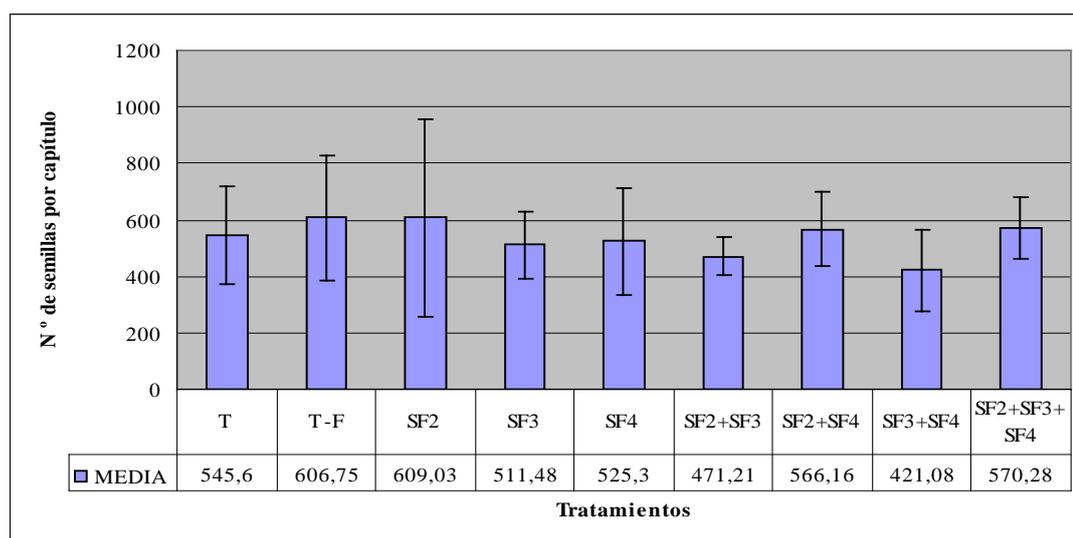


Fig. 10A: Número de semillas por capítulos de girasol en el ciclo agrícola 2012/2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

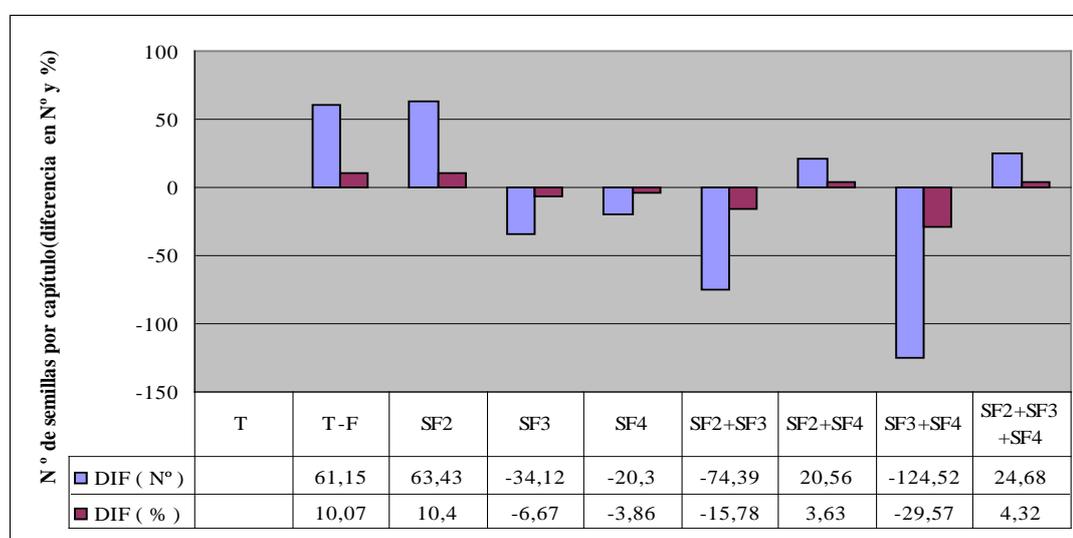


Fig. 10B: Diferencia de número de semillas por capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.

-Peso de mil semillas

En dicho parámetro se observaron diferencias estadísticamente significativas a favor de los tratamientos inoculados y co-inoculados, el tratamiento SF3+SF4 fue el que alcanzó mayor peso (61.71 gramos) seguido por SF4 (61.35 gramos) representando una diferencia de 4,15 gr. y 3,17 gr. con respecto al testigo que alcanzó un peso de 57,56 g lo que implica una diferencia positiva de 6,72 y 5,21 % respectivamente.

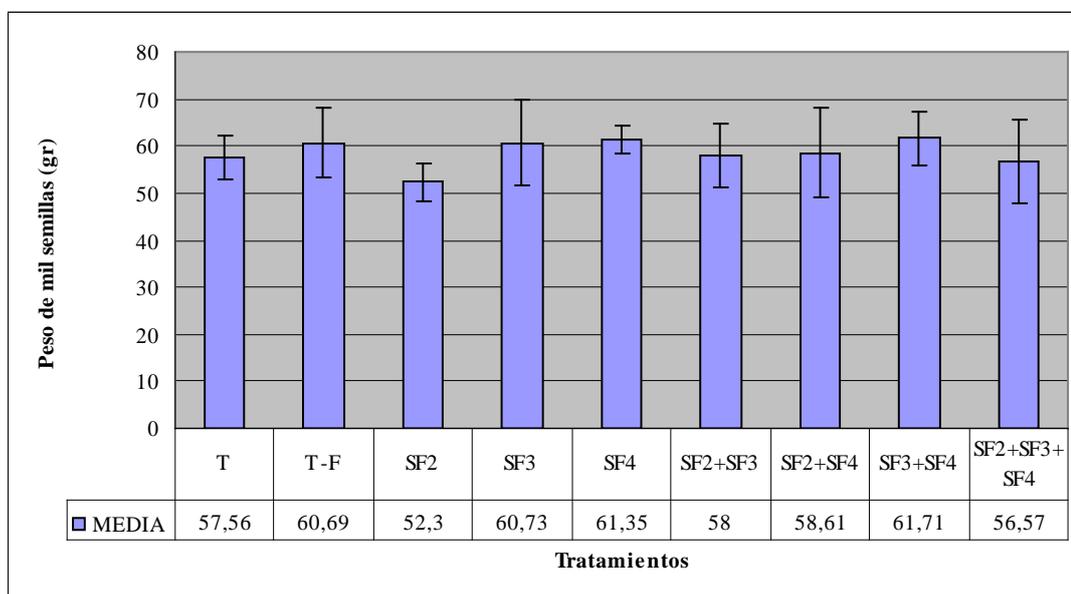


Fig. 11A: Peso de mil semillas en el ciclo agrícola 2012/2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

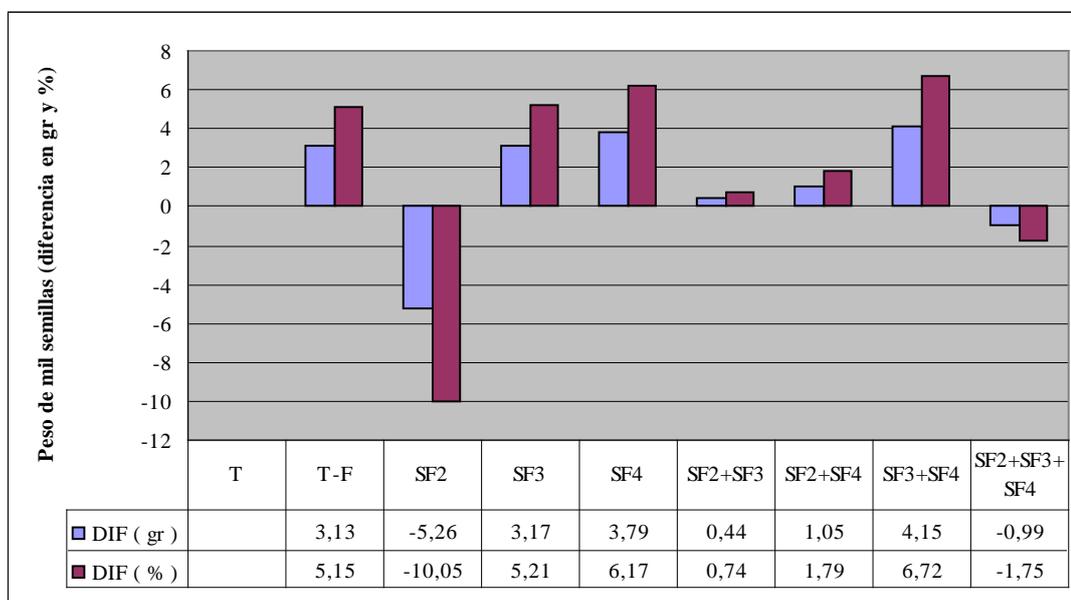


Fig. 11B: Diferencia de peso de mil semillas expresada en Kg y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013

-Rendimiento en granos

El rendimiento en granos se determinó en todos los tratamientos, y fue ajustado al 11 % de humedad, con la finalidad de poder comparar los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas a favor del testigo fertilizado, con un rendimiento de (2901,76 Kg ha⁻¹) seguido por el tratamiento SF2+SF4 con un rendimiento de (2700,54 Kg ha⁻¹) a excepción del testigo fertilizado, sólo dos tratamientos de inoculación superaron al control, que son SF4 y SF2+SF4 con un 5.86 y 10 % de diferencia respectivamente.

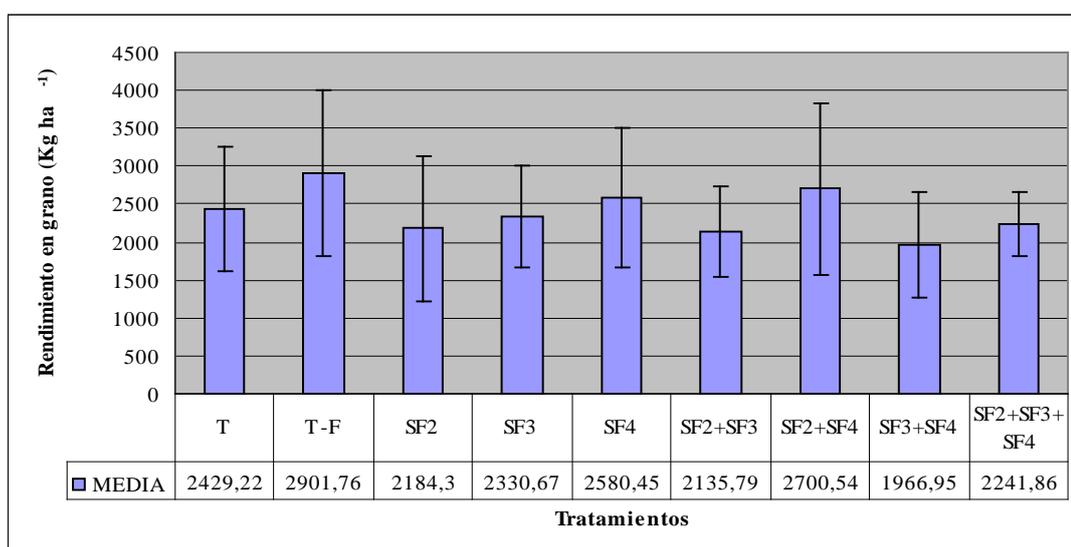


Fig. 12A: Rendimiento en grano (kg ha⁻¹) en el ciclo agrícola 2012/2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. . Las barras representan la media ± DE.

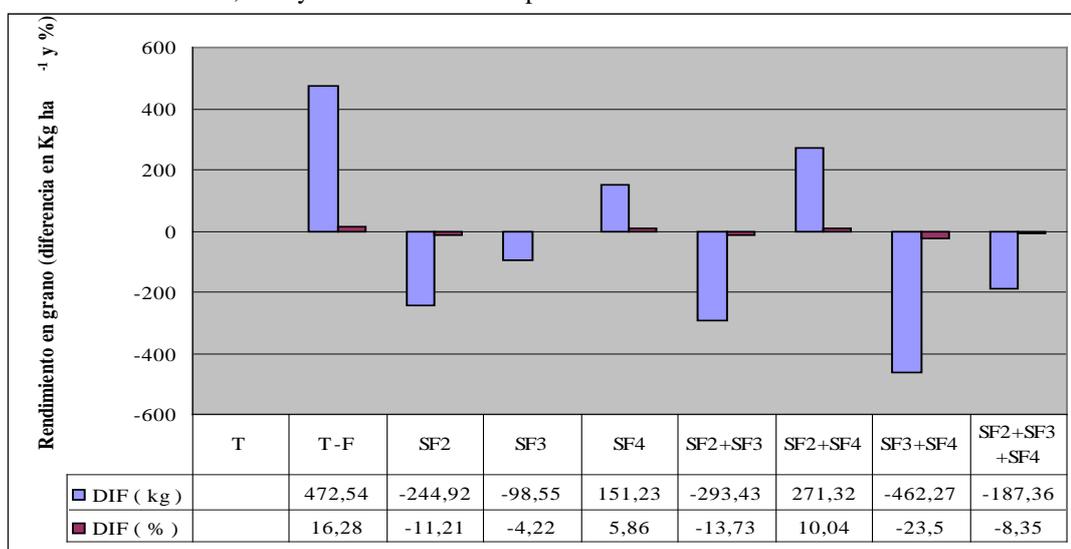


Fig. 12B: Diferencia de rendimiento en granos, expresada en kg ha⁻¹ y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.

-Materia grasa

Si bien no se observan diferencias estadísticas significativas, los tratamientos que recibieron inoculación, con las cepas SF4 y la combinatoria SF2+SF3+SF4, obtuvieron los mayores porcentajes de materia grasa (Fig. 13B), superando levemente al resto de todos los tratamientos. Los demás los tratamientos no superaron al testigo.

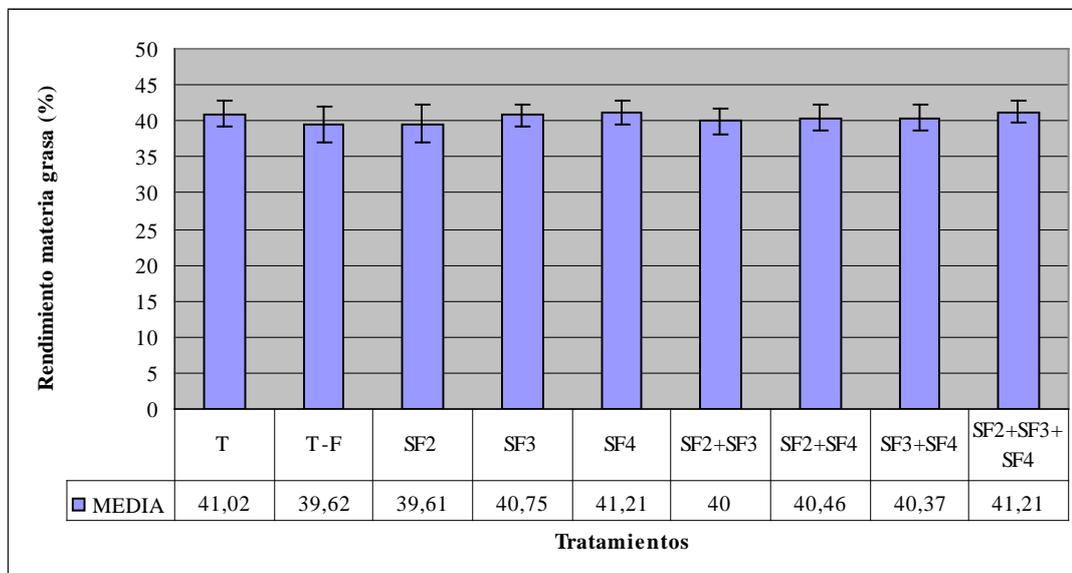


Fig. 13A: Porcentaje de materia grasa en el ciclo agrícola 2012/2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

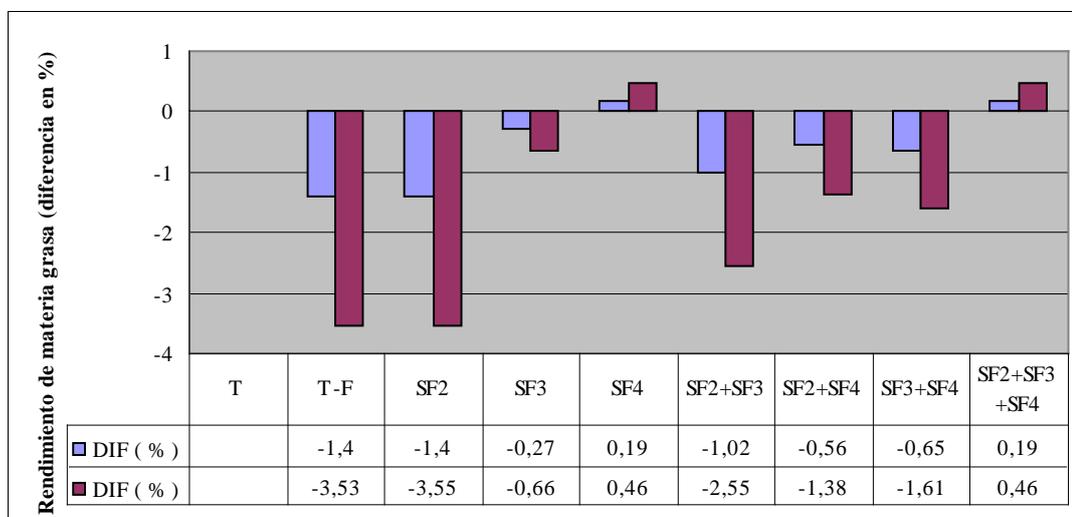


Fig. 13B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.

-Rendimiento de materia grasa

En cuanto al rendimiento de materia grasa (Kg ha^{-1}) no se observan diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento testigo fertilizado, superó al resto, con un rendimiento de 1040 Kg de materia grasa por hectárea, respecto al testigo que presentó un rendimiento de 911 Kg de materia grasa por hectárea (Fig. 14A). Dos tratamientos de los que recibieron inoculación y/o co-inoculación superaron al testigo en un 5.65% para la cepa SF2 y un 7.33% para la cepa SF2+SF4 (Fig. 14B).

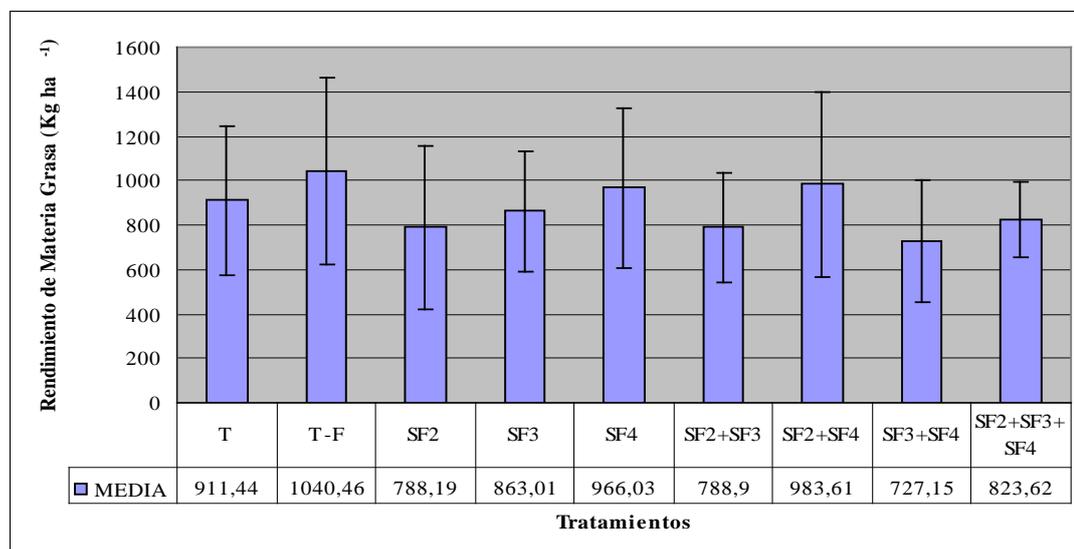


Fig. 14A: Rendimiento de materia grasa ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) en el ciclo agrícola 2012/2013. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

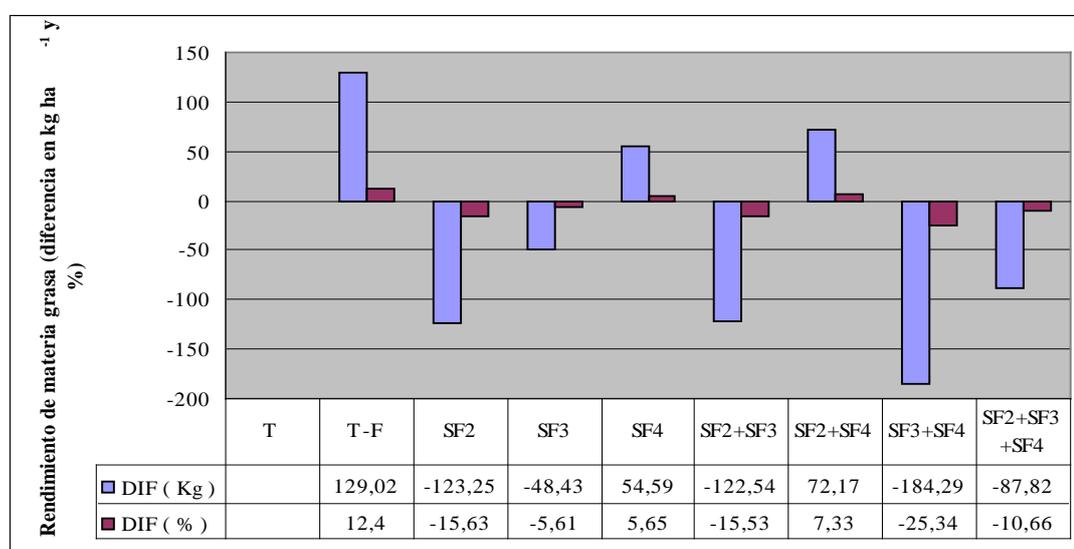


Fig. 14B: Diferencia de rendimiento de materia grasa, expresada en kg ha^{-1} y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2012/2013.

RESULTADOS-CAMPAÑA 2013-14

-Número de capítulos (por parcela)

El tratamiento inoculado con la cepa SF3 incrementó el número de capítulos en un 2,27%, aunque sin diferencia estadísticamente significativa. Los demás tratamientos de inoculación, co-inoculación y fertilización química, no superaron a las plantas testigo, lo que evidencia una muy baja respuesta de esta variable (Fig. 15 A y B).

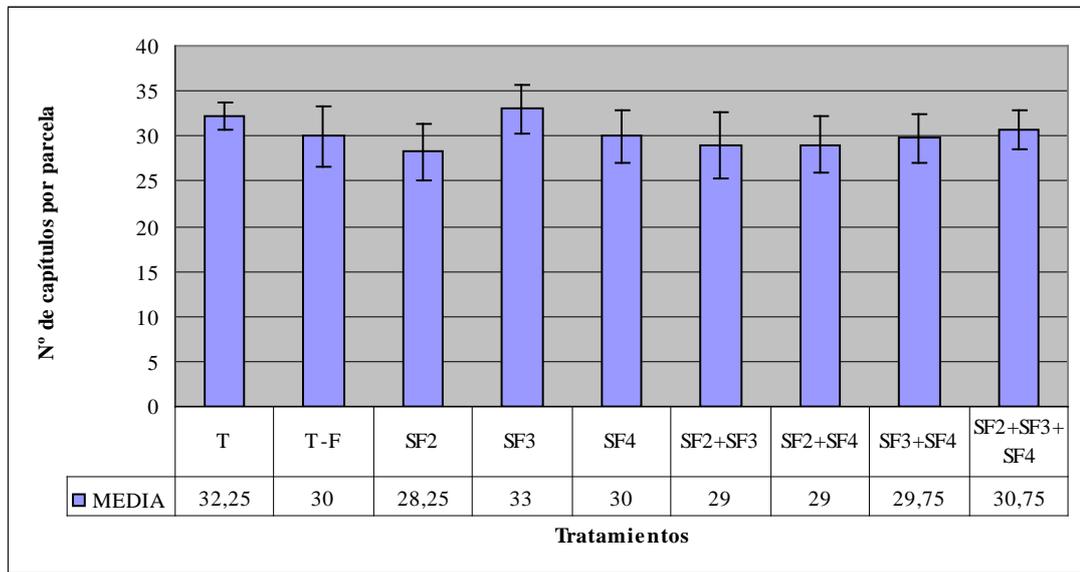


Fig. 15A: Número de capítulos de girasol por parcelas, campaña 2013-2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculada con la cepa SF3; **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

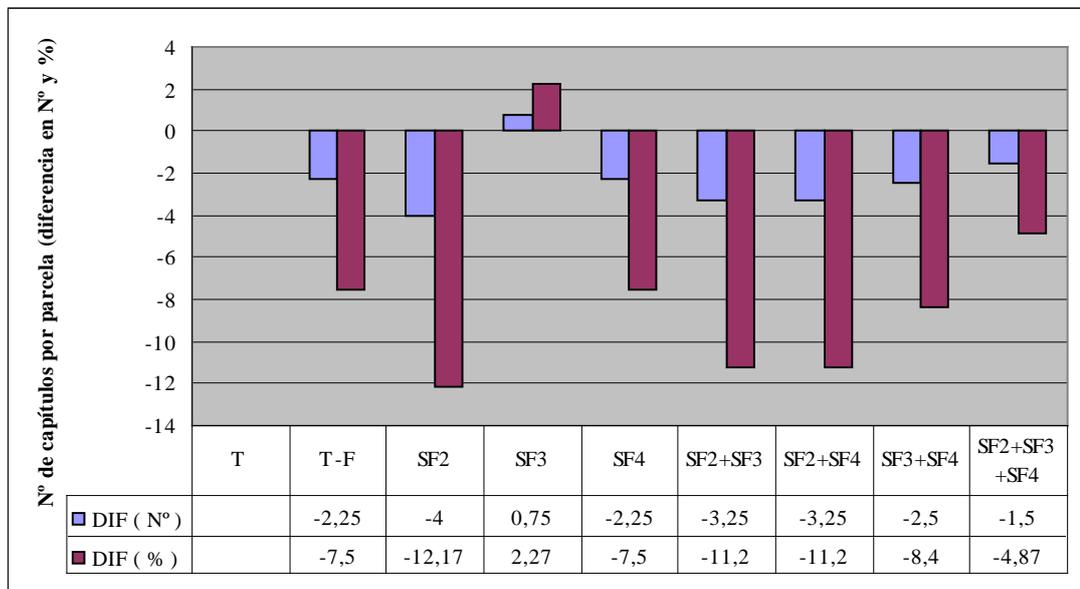


Fig. 15B: Diferencia de número de capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

-Semillas por capítulo

Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas, la co-inoculación con la cepa SF2+SF3 produjo un incremento de 110 semillas (Fig. 16B), lo que implicó una diferencia del 17,08 % (644.36 semillas por capítulo). (Fig. 16B). Los demás tratamientos de inoculación y co-inoculación, también incrementaron el número de semillas, a excepción de la cepa SF3+SF4, que fue inferior al testigo.

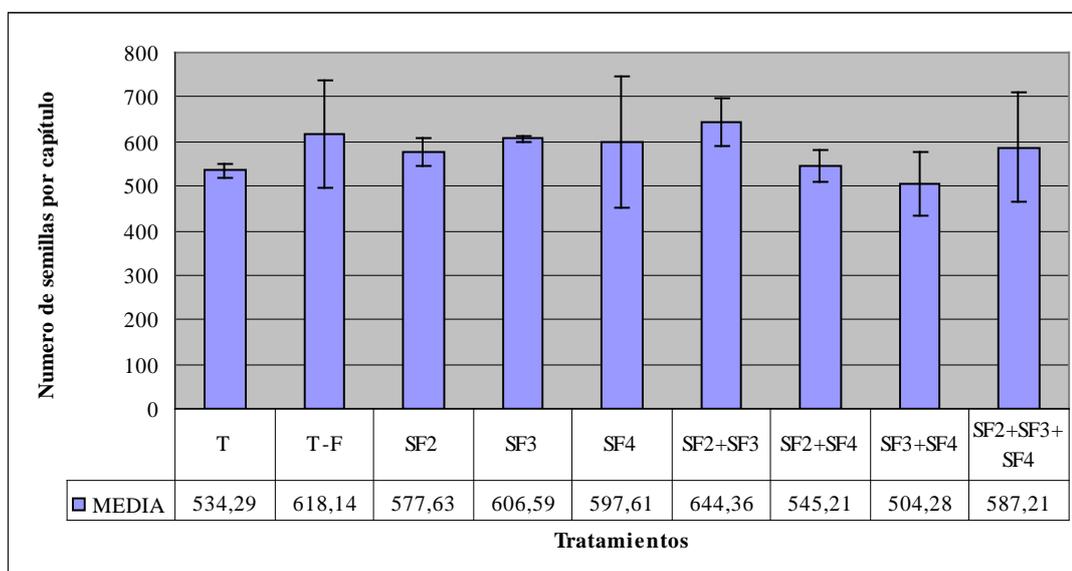


Fig. 16A: Número de semillas por capítulos de girasol en el ciclo agrícola 2013/2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

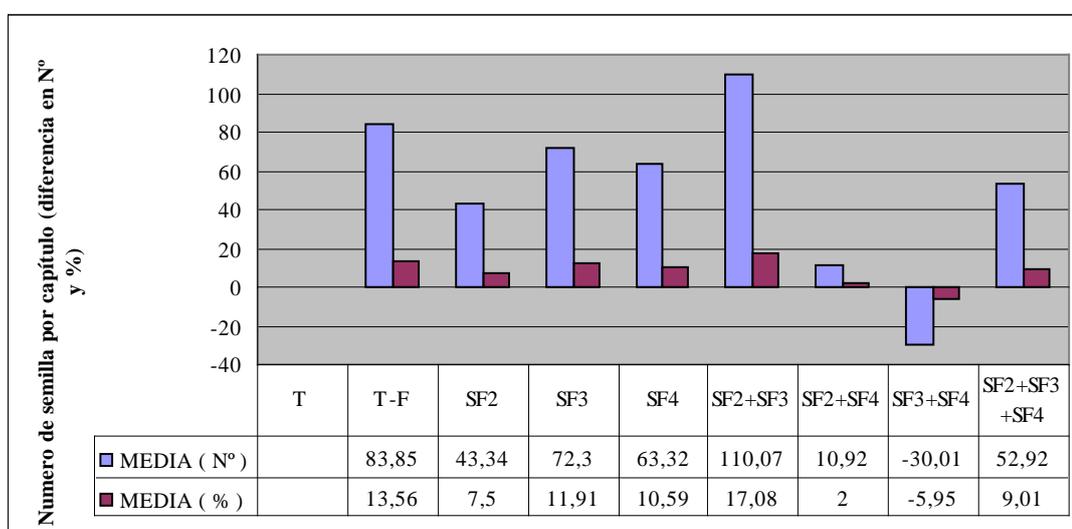


Fig. 16B: Diferencia de número de semillas por capítulos expresada en número y porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

-Peso de mil semillas

Si bien no se advierten diferencias estadísticas significativas, el tratamiento co-inoculado con la cepa SF2+SF4 obtuvo el mayor peso (65.38 gramos) seguido por la cepa SF2+SF3+SF4 con un peso de (62.32 gramos) respecto al testigo (60.98 gramos) (Fig. 17A), lo que implicó una diferencia de 4,4 g y 1.34 g respectivamente (Fig. 17B) representando un 6.72 y 2.15 % de incremento en el peso respecto al testigo.

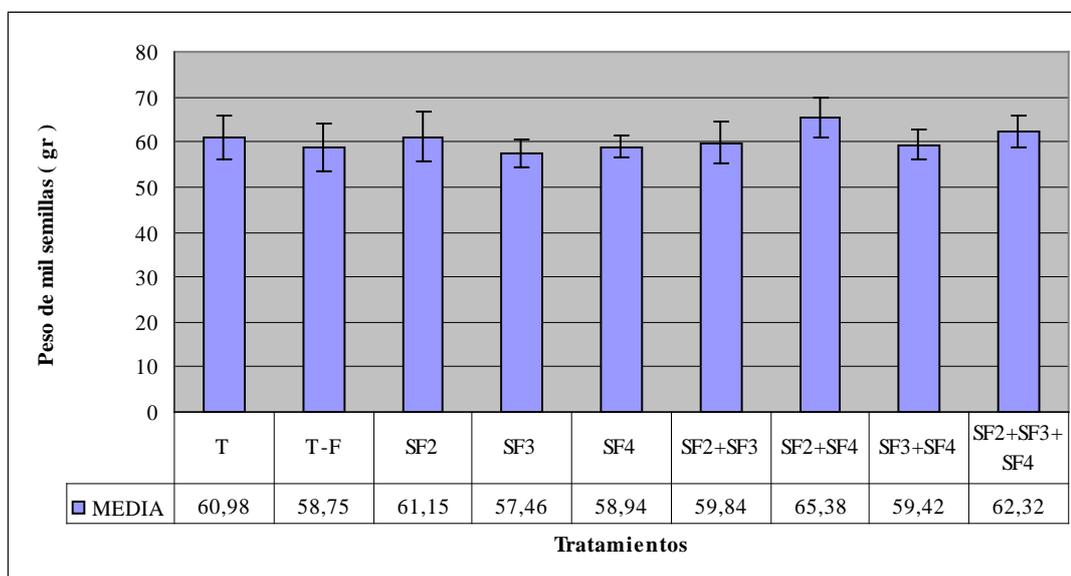


Fig. 17A: Peso de mil semillas en el ciclo agrícola 2013/2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** plantas inoculadas con la cepa SF3; **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

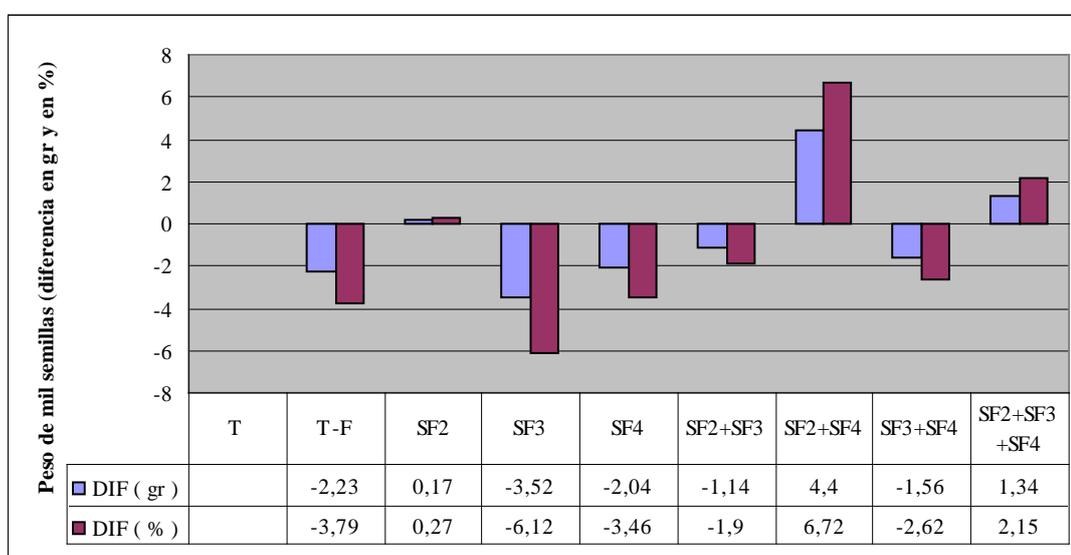


Fig. 17B: Diferencia de peso de mil semillas expresada en gr y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014

-Rendimiento en granos

Si bien no se observan diferencias estadísticas significativas, los tratamientos inoculados y co-inoculados fueron los que arrojaron los mayores rendimientos superando incluso al testigo fertilizado. El tratamiento co-inoculado con cepas bacterias SF2+SF3 obtuvo un rendimiento de (1946 kg ha⁻¹), seguido por el tratamiento SF3 (1942.26 kg ha⁻¹), el testigo fertilizado alcanzó un rendimiento de (1915.15 kg ha⁻¹) (Fig 18A). El tratamiento SF2+SF3 superó al testigo en (100.4 kg ha⁻¹) lo que representa un 5.15 % (Fig. 18B).

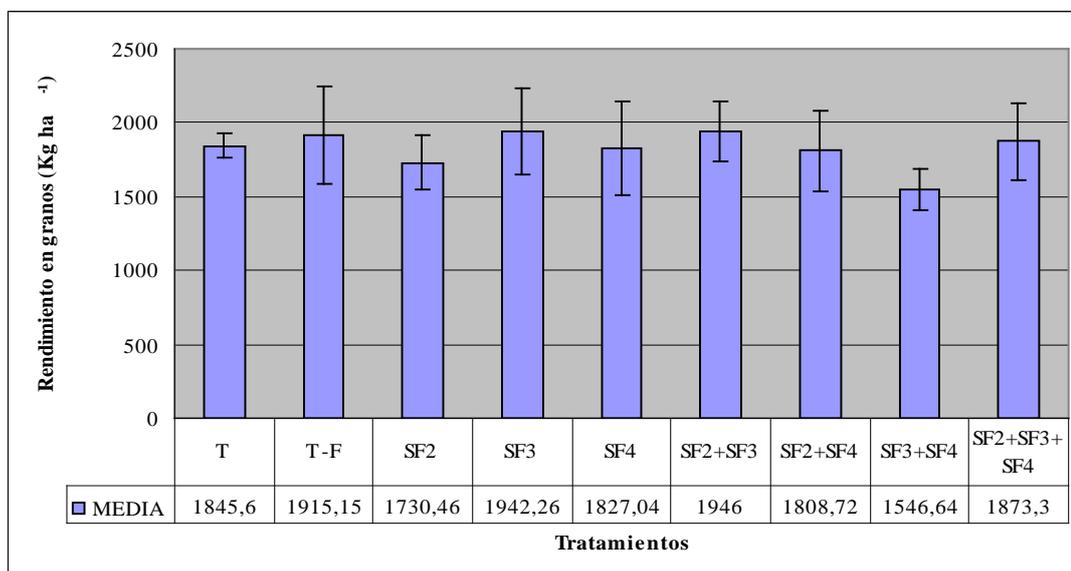


Fig. 18A: Rendimiento en grano (kg ha⁻¹) en el ciclo agrícola 2013/2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media ± DE.

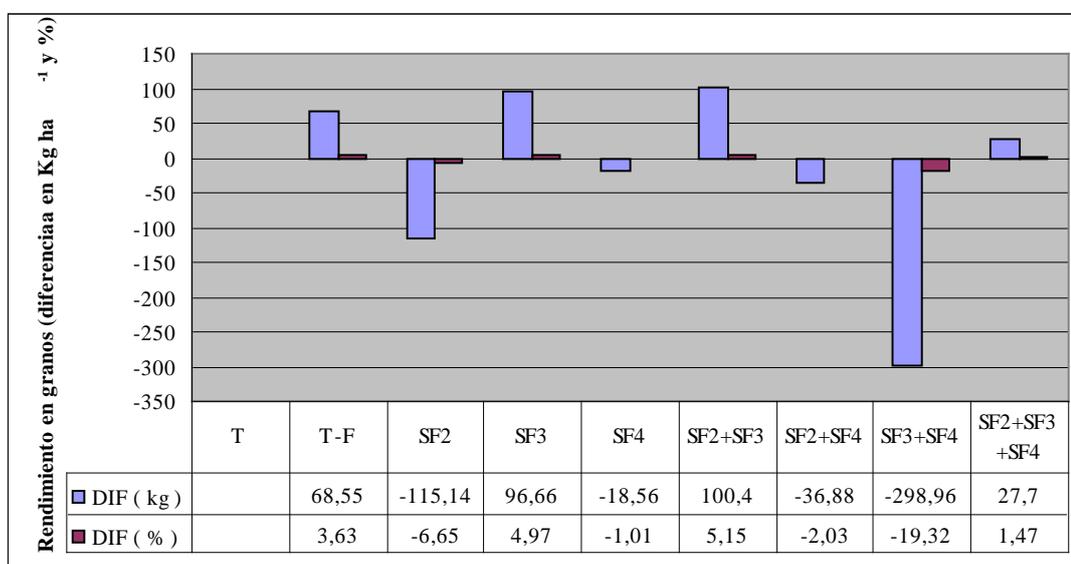


Fig. 18B: Diferencia de rendimiento en granos, expresada en kg ha⁻¹ y en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

-Materia grasa

Si bien no se observan diferencias estadísticas significativas, los tratamientos que recibieron inoculación, con las cepas SF2+SF3, SF3+SF4 y SF4 (Fig. 19A) obtuvieron los mayores porcentajes de materia grasa, superando levemente al resto de todos los tratamientos. El tratamiento SF2+SF3 incrementó en un 0.75 % el porcentaje de materia grasa (Fig. 19B). Ningún tratamiento superó al testigo en más de un 1 %. Esto evidencia una baja respuesta de todas las inoculaciones frente a la variable analizada.

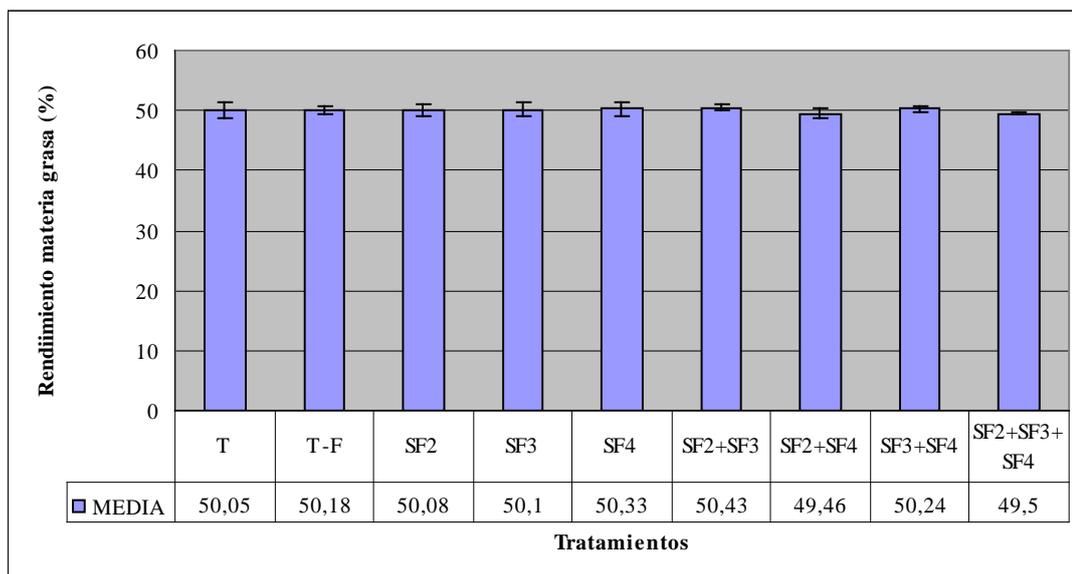


Fig. 19A: Porcentaje de materia grasa en el ciclo agrícola 2013/2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3; **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media \pm DE.

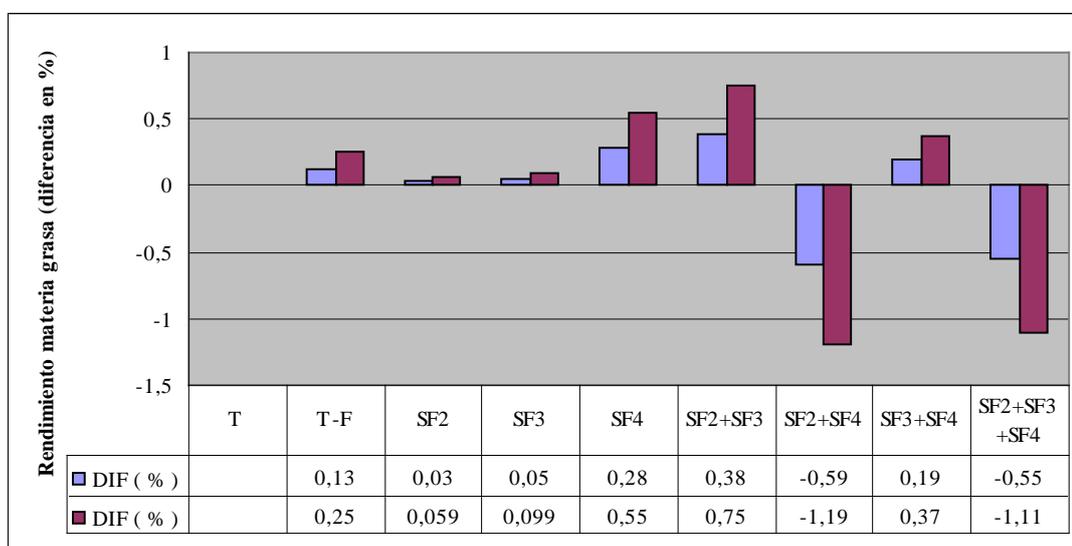


Fig. 19B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

-Rendimiento de materia grasa

Si bien no se advierten diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo (T) (Fig. 20A), se observó que aquellas plantas co-inoculadas con la cepa SF2+SF4 (884.75 kg. ha⁻¹) evidenciaron una mayor respuesta frente a esta variable, superando al testigo en 54.89 (kg. ha⁻¹) representando un aumento en el rendimiento de materia grasa de 6.2 % (Fig. 20B).

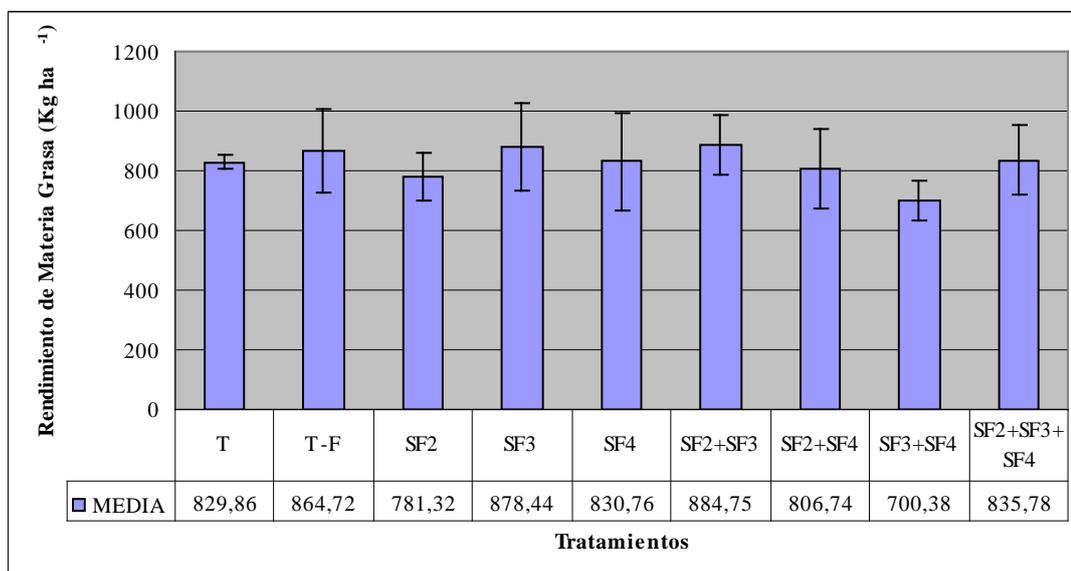


Fig. 20A: Rendimiento de materia grasa (kg . ha⁻¹) en el ciclo agrícola 2013/2014. **T:** plantas sin tratamiento, testigo; **T-F:** plantas tratadas con fertilizante nitrogenado; **SF2:** plantas inoculadas con la cepa SF2; **SF3:** planta inoculadas con la cepa SF3, **SF4:** plantas inoculadas con la cepa SF4; **SF2+SF3:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; **SF2+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; **SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4; **SF2+SF3+SF4:** plántulas co-inoculadas con SF2, SF3 y SF4. Las barras representan la media ± DE

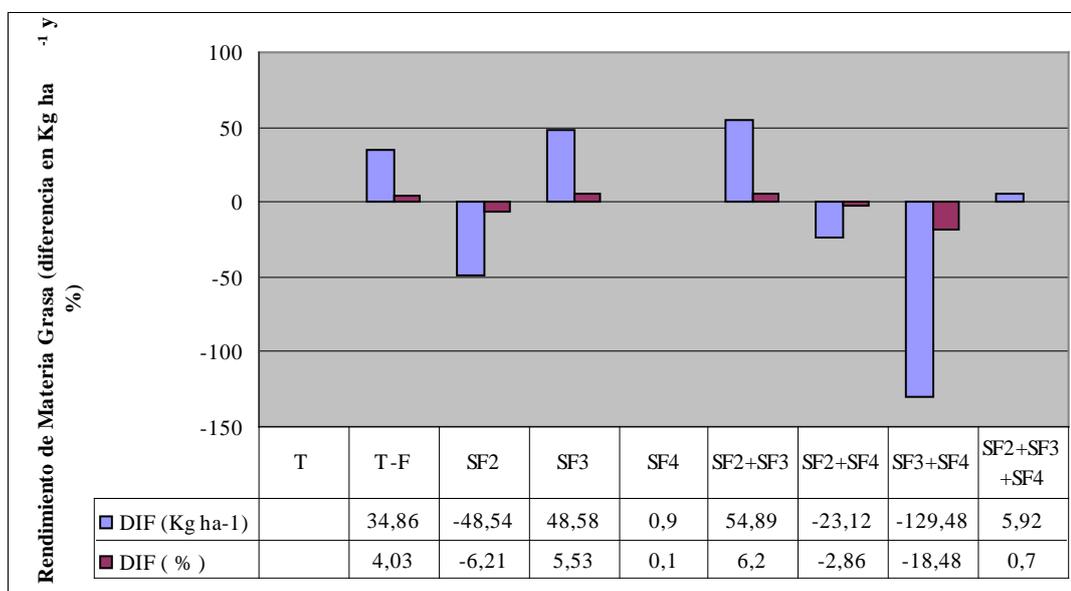


Fig. 20B: Diferencia en el contenido de materia grasa expresado en porcentaje en referencia al testigo. Campaña agrícola 2013/2014.

DISCUSIÓN

El rendimiento del girasol (peso de frutos por unidad de superficie) puede ser dividido en diferentes componentes. Estos componentes son: el número de capítulos por unidad de superficie, el número de frutos llenos por capítulo y el peso individual de esos frutos (Aguirrezábal *et al.*, 2001). En la campaña agrícola 2012/13 se registró un número de capítulos por parcela, en similar a todos los tratamientos evaluados, aunque el mayor número de semillas por capítulos se obtuvo en plantas que fueron inoculadas con la cepa SF2 (*Achromobacter xylosoxidans*), en cuanto al peso de mil semillas, el tratamiento SF3+SF4 alcanza el mayor peso (61.07 gr.) seguido por SF4 (61.35 gr.) y el testigo (57.5 gr.), respecto al rendimiento en granos nuevamente existe una tendencia a favor de las plantas que recibieron el tratamiento de inoculación y/o co-inoculación.

La co-inoculación de las cepas bacterianas SF2+SF4 (SF2 *Achromobacter xylosoxidans*+ SF4 *Bacillus pumilus*) superaron al testigo en 271 Kg ha⁻¹ representando un 10 % de incremento en el rendimiento de semillas. Si se compara el número de semillas por capítulo y el peso de mil semillas, las plantas que fueron inoculadas superaron al testigo sin inoculación, pero si se analiza el comportamiento de las plantas sin inocular pero que recibieron fertilización química (270 Kg de urea ha⁻¹) se observa que el testigo fertilizado, arroja un rendimiento superior a todos los tratamientos que fueron inoculados, con un rendimiento en grano de 2900 Kg ha⁻¹ frente a los 2700 Kg ha⁻¹ del mejor tratamiento inoculado (SF2+SF4). En lo que hace al parámetro constituido por materia grasa (expresado en Kg ha⁻¹) los mejores resultados se obtuvieron del tratamiento que recibió fertilización nitrogenada, esto puede deberse a los altos requerimientos de nitrógeno de la oleaginosa (40 kilogramos de Nitrógeno por tonelada de grano (IPNI, 2015)).

En la campaña 2013-14, la variable número de capítulos por parcela, no mostró diferencias significativas entre tratamientos, aunque se observó un incremento en semillas inoculadas con las cepas bacterianas SF2+SF3 (SF2 *Achromobacter xylosoxidans*; SF3 *Bacillus pumilus*) donde prácticamente se obtuvo un capítulo más por parcela que el testigo y además se observó que dicho tratamiento también mostró un incremento de 110 semillas por capítulo en referencia al testigo, lo cual implica una mejora del 17.08%.

En el peso de mil semillas, hay incrementos para el tratamiento SF2+SF4 (65.38gr.), el cual supera al testigo en 4.4 gramos, lo cual representa una ganancia del 6,72 %. Los resultados de los parámetros anteriores implicaron incremento en el rendimiento de granos de aproximadamente un 5 % para el tratamiento con las cepas SF2+SF3 (SF2 *Achromobacter xylosoxidans*+SF3 *Bacillus pumilus*) (101 Kg ha⁻¹), en esta campaña en particular. Además tal incremento no solo implicó que se superara al testigo, sino también al testigo fertilizado.

En referencia al rendimiento de materia grasa el tratamiento de co-inoculación SF2+SF3 mostró la mejor performance superando a los tratamientos, testigo y testigo fertilizado, con incrementos de 54.89 Kg ha⁻¹ (6,2 %) y 20,03 Kg ha⁻¹ (2.31 %), respectivamente.

Tanto *Bacillus pumilus* como *Achromobacter xylosoxidans* mostraron comportamiento PGPB en concordancia con lo indicado por Weller y Thomashow (1994). La introducción de bacterias beneficiosas puede normalizar y, en algunos casos, mejorar el rendimiento de la planta en ambientes estresante y con ello preservar o mejorar el rendimiento (Bensalim et al., 1998).

Los desempeños de las diferentes combinaciones de co-inoculaciones puede deberse al diferente aporte hídrico de las diferentes campañas agrícolas (2012-13 se registraron 495.5 mm y 2013-14 se registraron 735 mm) y a los distintos métodos de propagación, resistencia y comportamiento de los dos géneros de bacterias, siendo *Bacillus* capaz de generar estructuras de resistencia (esporas). En los tratamientos inoculados con cepa bacteria SF2 (*Achromobacter xylosoxidans*), SF3 (*Bacillus pumilus*), SF4 (*Bacillus pumilus*), no se obtuvieron grandes diferencias con respecto al testigo, a excepción del tratamiento SF2 que en la campaña 2012/13 logro aumentar el numero de semillas por capítulo y de SF3 (*Bacillus pumilus*) que obtuvo buenos resultados en el parámetro, rendimiento de materia grasa, ahora esas mismas cepas combinadas entre si, muestran un aumento o mejora en la mayoría de los componentes del rendimiento.

Tales resultados concuerdan con los hallados por Metin *et al.* (2010), donde un incremento en el índice de cosecha y el rendimiento de semillas de cultivares de trigo en dos sitios de cultivo y en diferente campaña agrícola, atribuyéndose tal incremento a una mayor fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, producido por la aplicación de cepas PGPR en referencia con el control.

CONCLUSION

La producción agrícola está en permanente cambio, que involucra la búsqueda de herramientas alternativas de protección y fertilización. Los inoculantes (biofertilizantes) y biocontroladores están siendo explorados mundialmente como medida contra la contaminación ambiental y reducción de los costos de producción, en sistemas agropecuarios sustentables.

En la campaña 2012/2013 el mayor rendimiento en grano se obtuvo con el tratamiento testigo-fertilizado, y con valores similares se ubicaron las semillas tratadas con las cepas SF2+SF4 (SF2 *Achromobacter xylosoxidans*+SF4 *Bacillus pumilus*) presentando tal combinatoria de cepas una mejor aptitud para lograr un aumento en el número y peso de mil semillas, superando al testigo en las variables analizadas.

En la campaña 2013/2014 la combinatoria de cepas bacterianas SF2+SF3 (SF2 *Achromobacter xylosoxidans*+SF3 *Bacillus pumilus*) evidenció el mayor rendimiento en grano y materia grasa superando inclusive al tratamiento que recibió fertilización química, esto comprueba que las PGPR pueden promover el crecimiento vegetal en forma directa (liberando hormonas u otros compuestos) o indirectamente como agente de control biológico.

El comportamiento diferencial de las cepas en las diferentes campañas agrícolas podría deberse a la diferencia en el aporte hídrico durante el ciclo del cultivo.

Es importante destacar que las diferentes combinaciones de cepas bacterianas presentaron un mayor efecto en los componentes del rendimiento que cuando fueron inoculadas de manera individual.

BIBLIOGRAFIA

- AGUIRREZÁBAL, L.A.N., G.A. ORIOLI, L.F. HERNÁNDEZ, V.R PEREYRA Y J.P MIRAVÉ. 2001. Girasol. En: *Aspectos fisiológicos que determinan e rendimiento*. Ed. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce-Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. p: 10-30.
- ALBA-ORDÓÑEZ, A. y M. LLANOS-COMPANY. 1990. El cultivo de girasol. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 158p.
- ANDREANI, P. 2004. Mercado de Girasol. En: *El cultivo de Girasol en Siembra Directa*. Ed. Gustavo Duarte, B. Aires. p. 16-26
- ANTOUN, H. y D. PRESVOST. 2006. Ecology of Plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer. Netherlands. pp 1-38
- ASAGIR. 2008. Historia – El Girasol. En: www.asagir.org.ar/asagir2008/historia.asp. Consultado: 20-05-2015.
- BABALOLA, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-1570.
- BADRI, D.V. T.L. WEIR, D. VAN DER LELIE, J.M. VIVANCO (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20: 642-650.
- BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promotin bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv.* 16:729-770.
- BCR. 2015. Firme consumo mundial de aceites vegetales 2014/2015. En: www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/infoboletinsemanal.aspx?IdArticulo=1084. Consultado 19/08/2015.
- BENSALIM, S. J. NOWAK, S.K ASIEDU. 1998 A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Amer. Potato J.* 75:145–152.
- BISWAS, J.C., J.K LADHA, F.B. DAZZO 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci Soc.* 64:1644–1650.

FORCHETTI, G., O. MASCIARELLI, S. ALEMANO, D. ALVAREZ, y G. ABDALA. 2007. Endophytic bacteria in sunflowers (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiol Biothech.* 76:1145-1152.

FORCHETTI, G., O. MASCIARELLI, S. ALEMANO, D. ALVAREZ, G. ABDALA. 2010. Native bacteria from sunflower roots produce salicylic acid and improve seedling growth under water deficit stress. *Curr. Microbiol.* 61:485–493.

Geo-INTA. 2015. Caracterización de suelos. En: www.geointa.inta.gov.ar Consultado 19/08/2015.

INTA. 2015. Información meteorológica mensual de la E.E.A. Manfredi. www.inta.gob.ar/documentos/informacion-meteorologica-mensual-de-la-e.e.a.-manfredi. Consultado 19/08/2015.

IPNI. 2015. Requerimientos nutricionales de los cultivos. En: www.ipni.net Consultado 08/06/2015.

JEFFRIES P., S. GIANINAZZI, S. PEROTO, K. TURNAU, J.M. BAREA. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils.* 37:1-16.

JHA P, A. KUMAR 2009. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb. Ecol.* 58:179-188.

KOCH, B.L. y J. OYA. 1974. Non-symbiotic nitrogen fixation in some Hawaiian Pasture. *Soils Soil Biol Biochem.* 6:363-367.

LUI, Z. y J. SINCLAIR. 1993. Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B 153-2-2. *Soil Biol. Biochem.* 25:849-855.

LUGTENBERG, B. F. KAMILOVA. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.

MAGyP. 2015. Calendario de siembra. En: www.mag.gov.py/dgp/Calendario%20de%20siembra%20MAG.pdf. Consultado 20/05/2015.

MECON. 2014. Producción de Aceite 2011. www.mecon.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_Oleaginoso.pdf. Consultado: 20-05-2015.

METIN, T., G. MEDINE, C. RAMAZAN, O. TASKIN, y S. FIKRETTIN. 2010. The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. **XIX World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World**: 140-143.

NGOMA, L., O. BABALOLA, F. AHMAD. 2012. Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Sc. Res. and Essays*. 7: 4003-4013.

PRIMICIAS RURALES. 2012. En: www.ruralprimicias.com.ar/noticia-comenzo-la-siembra-de-girasol-de-la-campana-2011-2012-11259.php. Consultado 19/08/15.

SCHNEITER y MILLER. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* Volumen 21: 902-903.

SHEHATA, M.M., S.A. EL-KHAWAS. 2003. Effect of two biofertilizers on growth parameters, yield characters, nitrogenous components, nucleic acids content, minerals, oil content, protein profiles and DNA banding pattern of sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Vedock) yield. *Pak. J. Biol. Sci.* 6, 1257–1268.

SIIA. 2015. Estimaciones agrícolas. En: www.sii.gov.ar. Consultado: 20-05-2015.

TRÁPANI, N., M. LÓPEZ PEREIRA, V.O. SADRAS y A.J. HALL. 2003. Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en girasol. En: *Producción de Granos, bases funcionales para su manejo*. Ed. Facultad de Agronomía, B. Aires, Argentina. 29-37.

VESSEY, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255:571-586.

WELLER, D.M. y L.S. THOMASHOW. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. En: *Molecular ecology of Rhizosphere microorganisms: Biotechnology and Release of GMOs*. Eds. O'Gara F, Dowling D.N., Boesten B., NY, EE.UU. p:1-18.