

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

“Trabajo Final para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

Respuesta de la soja (*Glycine max* L.) a salinidad mediada por la
inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
(PGPR)

Mariano Ezequiel Ramadú

30.597.532

Director: Dr. Fabricio Cassán

Co-Directora: Dra. Virginia Luna

Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Abril del 2008

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Respuesta de la soja (*Glycine max* L.) a salinidad mediada
por la inoculación con rizobacterias promotoras del
crecimiento vegetal (PGPR)

Autor: Mariano Ezequiel Ramadú

DNI: 30.597.532

Director: Dr. Fabricio Cassán

Co-Director: Dra. Virginia Luna

**Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del
jurado evaluador:**

Ing. Agr. Adriana Marinelli

Dr. Javier Andrés

Ing. Agr. Letizia Petryna

Fecha de presentación: / /

Aprobado por Secretaría Académica: / /

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, le doy las gracias a mi director de tesina Dr. Fabricio Cassán por su apoyo incondicional, quien con su pensamiento crítico y toda su energía, me guió, encaminó y aportó todas las herramientas básicas necesarias para recorrer el camino científico en la realización de este trabajo.
- A mis padres, Elida y Americo, quienes me dieron la vida, y la educación que tengo la oportunidad de gozar. Por su apoyo y confianza constante que me aportaron las fuerzas necesarias para no bajar los brazos en los momentos más difíciles, y poder así, llegar a cumplir la meta que me propuse al iniciar la carrera.
- A mis hermanas, Marisa y Claudia, quienes con pequeños momentos cotidianos compartidos demuestran los grandes sentimientos difíciles de expresar.
- A mis compañeros de Investigación, Matías, David y Lucas, que con buen humor y dedicación me facilitaron la tarea de experimentación.
- A la Dra. Virginia Luna por el apoyo académico y humano que me brindó desde el primer momento en que llegué al laboratorio.
- Al Mic. Oscar Masciarelli, por su desinteresada ayuda en la investigación durante la realización del trabajo.
- A Nadín por acompañarme, aconsejarme y compartir tantos momentos en esta etapa de mi vida.
- A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC por los fondos otorgados para este desarrollo experimental, así como la beca de fomento a la investigación que se me otorgó, permitiéndome realizar nuevos experimentos sobre el tema investigado.
- Y finalmente, a otra tanta gente que forma o formó parte de mi vida, contribuyendo a lo que hoy en día soy, pero sería muy extenso nombrar.

INDICE

Resumen	VI
Summary	VII
Fundamentación	1
Antecedentes Generales	2
Origen e historia del cultivo	2
La soja en nuestro país	2
La salinidad de los suelos y el rol de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en respuesta al estrés salino e hídrico	3
Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de <i>Azospirillum brasilense</i>	5
Hipótesis	5
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Materiales, Técnicas y Métodos	7
Material Vegetal	7
Inoculante comercial	7
Condiciones generales del ensayo de germinación en cámara	7
Condiciones generales del ensayo de crecimiento temprano en cámara	8
Condiciones generales del ensayo de crecimiento en invernáculo	9
Resultados y Discusión	12
Ensayo de germinación en cámara de cultivo	12
Cuadro 1	12
Figura 1	14
Cuadro 2	14
Figura 2	15
Cuadro 3	16
Figura 3	18
Ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo	18
Figura 4	20
Figura 5	22
Figura 6	24
Ensayo de crecimiento en invernáculo hasta floración	25
Figura 7	25
Figura 8	26

Figura 9	28
Figura 10	29
Conclusiones	30
Bibliografías	32

RESUMEN

La salinización de los suelos disminuye la frontera agrícola generando suelos de baja productividad. Esta situación justifica la búsqueda de nuevas alternativas destinadas a ampliar la superficie de siembra en condiciones edáficas limitantes y/o incrementar la productividad de las mismas. Una posible alternativa para mejorar la respuesta vegetal en condiciones de salinidad, se basa en la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Azospirillum* y bacterias fijadoras de nitrógeno (RFN) del género *Bradyrhizobium*, a fin de mejorar la implantación y productividad de los cultivos. En tal sentido, la utilización de microorganismos capaces de regular el crecimiento vegetal, destinados a mejorar el balance hídrico de la planta en suelos con alto contenido de NaCl o Na₂SO₄ se propone como un método apto para este propósito. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento y el estado hídrico de plántulas de soja co-inoculadas con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* sometidas a estrés salino en condiciones controladas (cámara de crecimiento) y semi-controladas (invernáculo) de cultivo hidropónico en medio sólido. Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max.* L) A 5901 RG (transgénica tolerante a glifosato, NIDERA), de ciclo intermedio-largo de crecimiento determinado, inoculadas con la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum*. Los tratamientos salinos fueron NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla isoosmótica, el medio nutritivo fue Hoagland 25% sin N, y la bacterización se llevó a cabo con micropipeta a nivel radicular en un experimento y directamente sobre la semilla en el otro. Los resultados obtenidos nos permiten corroborar que la co-inoculación en condiciones controladas contrarresta el estrés salino incrementando el peso fresco, peso seco, número de plantas noduladas y número de nódulos por planta, y puede ser considerada como una alternativa tecnológica viable para aliviar al menos en parte, el efecto tóxico de la salinidad de los suelos.

Palabras Clave: *Glycine max* L.; salinidad; *Bradyrhizobium japonicum*; *Azospirillum brasilense*; co-inoculación.

SUMMARY

Soybean (*Glycine max* L.) responses to salinity as influenced by inoculation with plant growth promoter rhizobacteria (PGPR)

Soil salinization diminishes the agricultural frontier generating low productive areas. This situation justifies the search for new alternatives to enlarge the cultivated surface under restrictive conditions and to increase their productivity. A possible alternative to improve plant responses under salinity conditions is based on the co-inoculation with plant growth promoters' rizobacterias (PGPR) such as *Azospirillum sp.* and nitrogen fixing bacteria (RFN) such as *Bradyrhizobium sp.* In this sense, the use of microorganisms able to regulate plant growth through improving the hidric balance of the plant in soils highly salinized with NaCl or Na₂SO₄ is considered as a promising method for this purpose. The objective of this work was to evaluate the growth response and the hydric state of soybean seedlings co-inoculated with Az39 strain from *Azospirillum brasilense* to saline stress under controlled conditions (growth chamber) and semi-controlled conditions (greenhouse). Soybean seeds of (*Glycine max*. L) A 5901 RG (tolerant to glifosato, NIDERA) with intermediate-long cycle inoculated with E109 *Bradyrhizobium japonicum* strain were used. The saline treatments were NaCl, Na₂SO₄ and their isoosmotic mixture, the nutritive medium was Hoagland 25% without N, and the bacterization was carried out with a micropipete at radicular level in one experiment, and directly on the seed in the other. The obtained results allow us to corroborate that the co-inoculation under controlled conditions counteracts the saline stress increasing the fresh weight, dry weight, number of nadulated plants and number of nodules per plant, and it can be considered as a viable technological alternative to alleviate at least partly, the toxic effect of soil salinity.

Key words: *Glycine max* L.; salinity; *Bradyrhizobium japonicum*; *Azospirillum brasilense*; co-inoculation.

FUNDAMENTACIÓN

A medida que la población mundial incrementa, es necesario encontrar nuevas alternativas para mejorar la productividad agrícola y aprovechar eficientemente los recursos disponibles. Una manera de lograrlo, se basa en el desarrollo de cultivos tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico, tal como sequía, inundaciones, altas y bajas temperaturas, radiación excesiva, congelamiento, salinidad, etc. con el fin de que las tierras marginadas puedan ser convertidas en cultivables, fundamentalmente de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé y San Luis, en las que la salinización de los suelos disminuye de manera progresiva su frontera agrícola y ganadera, generando suelos de baja productividad. La generación de nuevas estrategias destinadas a mejorar la implantación de cultivos de alto interés económico, como lo es soja (*Glycine max* L.) y otras especies de alta producción nacional, así como la obtención de alternativas destinadas a incrementar su productividad y rendimiento, aún en condiciones edáficas limitantes (salinidad y déficit hídrico), representa una importante área de investigación y una variante tecnológica para el sector agrícola-ganadero de la región centro del país. Una posible alternativa para mejorar este cultivo en condiciones de salinidad, se basa en la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Azospirillum* y rizobacterias fijadoras de nitrógeno (RFN) del género *Bradyrhizobium*, con el objeto de mejorar la implantación y la productividad del cultivo. En numerosas especies, la inoculación con PGPR o RFN, así como la co-inoculación con ambos tipos de microorganismos ha determinado una mejor implantación y una mayor productividad de los mismos. Si bien estos incrementos son de considerable valor comercial, la falta de información del sector agrícola nacional, es una de las mayores barreras que restringe su aplicación a gran escala. Actualmente, la industria nacional de inoculantes está centralizada, en el caso de la soja, en la obtención de bioformulados a base de cultivos puros de *Bradyrhizobium japonicum*, sin considerar la potencialidad de la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento y su capacidad de producir compuestos reguladores del crecimiento vegetal. Estas bacterias así como sus compuestos reguladores, podrían ser la segunda piedra angular del desarrollo de una nueva tecnología en la industria de inoculantes para leguminosas y servir como modelo experimental para otras especies de leguminosas. La integración del conocimiento obtenido de este trabajo, permitirá no sólo un avance notable en la comprensión de la fisiología de la interacción planta-rizobacterias-salinidad, sino que además permitirá en etapas posteriores, la implementación de prácticas extensivas de tratamiento de cultivos con bacterias PGPR, lo que sugiere una fuerte inserción Institucional de la UNRC en el sector productivo regional, mediante la vinculación científico-tecnológica de la institución con empresas o productores agrícola interesados en aplicar el desarrollo.

ANTECEDENTES GENERALES

Origen e Historia del cultivo

La palabra soja proviene de un vocablo chino: *sou* y fue descubierta por un emperador chino llamado Sheng Nung, dueño de grandes extensiones de cultivos de soja. Al ser un producto prácticamente desconocido se dedicó a estudiarlo en profundidad, describiendo sus propiedades nutricionales y medicinales. La soja cultivada (*Glycine max* L.) es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. Hacia el año 3000 AC los chinos ya consideraban a la soja como una de las cinco semillas sagradas. Su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra chino-japonesa en 1894, época en que los japoneses comenzaron a importar tortas de aceite de soja para usarlas como fertilizantes. Es el alimento fuerte de los pueblos del oriente. La primera referencia Europea que se tiene de la soja se remonta al siglo XVII, a mano de los misioneros, que introducen las primeras habas de soja para su cultivo, sin gran éxito al parecer. A principios del siglo XIX se empezó a cultivar en Estados Unidos; sin embargo, en Europa y en Norteamérica, no se introdujo en la dieta alimenticia hasta bien entrado el siglo XX. La primera cosecha comercial se plantó en 1929 con la idea de suministrar semillas para hacer salsa de esta leguminosa (www.monografias.com/trabajos/lasoja.html).

La soja en nuestro país

Las primeras plantaciones en nuestro país se hicieron en 1862, pero no encontraron eco en los productores agrícolas de aquellos años. En 1925, el Ministro de Agricultura Le Bretón, introdujo nuevas semillas desde Europa y trató de difundir su cultivo, conocido en esa época entre los agrónomos del Ministerio como arveja peluda o soja hispida. Hacia 1956 en la Argentina no se conocían aún los aspectos básicos de la soja como un cultivo. La primera vez que Argentina exportó esta leguminosa fue el 5 de Julio de 1962, a través del buque "Alabama", que partió en esa fecha llevando en su interior 6.000 toneladas con destino a Hamburgo (Alemania). Su producción se incrementó notoriamente en los años 70 hasta alcanzar en la actualidad más de 15.600.000 de hectáreas cosechadas con una producción de más de 40.500.000 de toneladas, convirtiendo a la Argentina en el tercer productor mundial de grano, el primer exportador mundial de aceite y harina de soja (www.monografias.com/trabajos/lasoja.html). Este cultivo ocupa una amplia zona ecológica que se extiende desde los 23° (en el extremo norte del país) a los 39° de latitud sur, concentrándose principalmente en la Región Pampeana, con cerca del 94% de la superficie sembrada y el 95% de la producción total del país. Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires representan las provincias de dicha región con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos (Diaz-Zorita, 2004). No debe sorprender, entonces, que este

cultivo presente en la actualidad el rubro de exportación de mayor incidencia en el Producto Bruto Agropecuario del país y el mayor generador de divisas en el mercado agrícola nacional.

La salinidad de los suelos y el rol de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en respuesta al estrés salino e hídrico.

La salinidad de los suelos representa la mayor causa de estrés abiótico en plantas cultivables en el mundo. En la actualidad, cerca del 20 % de las tierras cultivables y casi la mitad de las tierras irrigadas en todo el planeta están afectadas por salinidad (Rhoades y Loveday 1990). En nuestro país al menos 34.000.000 Ha están sometidas al exceso de agua y sales minerales y por ello sujetas a condiciones ecológicas extremas y a una drástica reducción en su productividad. Desde el punto de vista fisiológico, la salinidad determina dos tipos de estrés en los tejidos vegetales: un estrés hídrico ocasionado por el aumento relativo de la concentración de solutos y la consecuente disminución en la disponibilidad de agua en el suelo y un estrés iónico que resulta de la modificación en la relación de K^+/Na^+ y en las concentraciones de Na^+ y Cl^- que son perjudiciales para la planta. Resulta evidente que la exposición de un organismo a estrés, trae aparejadas importantes modificaciones fisiológicas, que afectan el normal crecimiento y desarrollo del individuo. Con el aumento de la población mundial, es necesario encontrar formas alternativas de mejorar la productividad agrícola y re-utilizar los recursos disponibles. Una de estas estrategias se focaliza en la obtención de cultivos tolerantes a diferente tipo de estrés con el objeto de introducirlos en las tierras marginales ó no utilizadas.

Los suelos salinizados aumentan su superficie año tras año, lo que produce una disminución de la productividad y disponibilidad de los mismos para su explotación. De esta manera, la búsqueda de poblaciones vegetales tolerantes, así como la comprensión de la base fisiológica de su respuesta a la salinidad, se considera como un tema prioritario de estudio. En este sentido, Holmberg y Bülow (1998) consideran que la estrategia básica para transferir la capacidad de respuesta a un estrés, de una planta tolerante a una no tolerante comienza con: i) La búsqueda y selección de organismos que naturalmente viven en condiciones extremas de estrés y ii) El estudio fisiológico y bioquímico del organismo bajo condiciones estresantes y no estresantes. En nuestro país existen poblaciones de leguminosas exitosamente adaptadas a ambientes salinos y diferenciadas evolutivamente en su estrategia de tolerancia a la sal. Tal es el caso de *Lotus glaber* que habita en suelos heterogéneos de la Pampa Deprimida del Salado, considerada una glicófita tolerante o *Prosopis strombulifera* que habita naturalmente suelos salinizados del sur de la provincia de Córdoba y suroeste de la provincia de San Luis. Esta especie, en particular, posee diversos mecanismos fisiológicos y bioquímicos que le permiten un crecimiento óptimo en condiciones de salinidad elevada o

tolerancia en condiciones de salinidad extrema. En ambos casos, parte del éxito adaptativo de los individuos de ambas leguminosas dependería de su capacidad de establecer y mantener efectivas asociaciones simbióticas con RFN del género *Rhizobium* y/o rizobacterias de *vida libre* promotoras del crecimiento. En este último caso, resultarían en una eficiente explotación de las fuentes minerales por un aumento del volumen radical y bio-protección contra patógenos presentes en la rizósfera, lo que indefectiblemente inducirá un aumento en el crecimiento y una mejor implantación en el sustrato. Considerando la importancia económica de nuestro modelo experimental (*Glycine max* L.), la interacción con bacterias del género *Bradyrhizobium*, ha sido extensamente estudiada, fundamentalmente desde la perspectiva de la fijación biológica de nitrógeno, sin embargo la asociación de esta especie con rizobacterias promotoras del crecimiento se presenta como un área de trabajo poco estudiada, sobre todo desde la perspectiva de la capacidad de estos microorganismos de mejorar el crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico. En tal sentido, todavía no se conoce si la colonización por PGPR modifica la tolerancia a la sal en una leguminosa. En general y para otras especies, los esfuerzos se han focalizado sólo en el modelo del microorganismo o de la planta en forma independiente y sólo desde la perspectiva de la producción de materia seca, con el objeto de verificar modificaciones de la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de salinidad extrema (Serraj *et al.*, 1999). No se describen hasta el momento ensayos que permitan comparar la respuesta a salinidad de leguminosas co-inoculadas con PGPRs capaces de estimular *in situ* su crecimiento por medio de diferentes mecanismos fisiológicos, tales como la producción o metabolismo de fitohormonas, dentro de las que se destacan las auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico (Cassan *et al.*, 2003, Perrig *et al.*, 2005). Por otro lado, en sistemas naturales, el grado de salinización y el tipo de sales presentes varía en los diferentes tipos de suelo y con la fuente de provisión de agua de los mismos. En la mayoría de los casos, los principales cationes presentes en la solución son Na^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , mientras que los principales aniones son Cl , SO_4^{2-} y CO_3H . En base a esto, Grattan y Grieve (1999) manifiestan que resulta sorprendente que la mayoría de los estudios sobre salinidad se lleven a cabo considerando al ClNa como el único agente salinizante, limitando la posibilidad de extrapolación de resultados a condiciones reales de campo. En los suelos salinizados del sur de Córdoba, las sales predominantes son ClNa y SO_4Na_2 (Cisneros *et al.*, 1997). Según Egan y Ungar (1998), muy pocos estudios enfocan los efectos del SO_4Na_2 en el crecimiento vegetal, a pesar de ser de interés creciente la comparación de los mismos con los del ClNa .

Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasilense*.

La bibliografía en general considera a *Azospirillum* sp. como uno de los géneros bacterianos responsable de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo así como el rendimiento de numerosas especies cultivables (Okon, 1985, Baldani *et al.*, 1987). Inicialmente, estas bacterias llamaron la atención de los investigadores por dos características distintivas: (a) la capacidad de colonizar de maneras endofítica los tejidos de ciertas gramíneas y otras especies, ocupando nichos ambientales protegidos y (b) la capacidad de aumentar significativamente el crecimiento radical y aéreo de plantas inoculadas. Las propiedades de esta bacteria para estimular el crecimiento de plantas inoculadas han sido comprobadas en decenas de experimentos en condiciones sumamente contrastantes. Los mecanismos por los que *Azospirillum* sp. modifica el desarrollo y la productividad vegetal aún son motivo de debate dentro de la comunidad científica; sin embargo, entre los más destacados se han postulado mecanismos directos, en los que el efecto promotor depende del aporte bacteriano de compuestos capaces de regular el crecimiento, e indirectos, en los que el efecto depende de la capacidad del microorganismo para impedir el crecimiento de bacterias u hongos fitopatogénicos. Dentro de los mecanismos directos se destacan: la fijación biológica del nitrógeno (FBN), actividad nitrato reductasa (NR), mineralización de nutrientes esenciales y producción o metabolismo de fitohormonas y compuestos reguladores del crecimiento tales como auxinas (Patten y Glick, 1996), citocininas (Tien *et al.*, 1979) y giberelinas (Cassan *et al.*, 2003), además de ciertas poliaminas como la cadaverina (Cassán *et al.*, 2005), con capacidad de regular el crecimiento o la respuesta de una planta a situaciones desfavorables. Dentro de los mecanismos indirectos, se destacan: la capacidad biocontroladora sobre otras bacterias o sobre hongos fitopatogénicos por medio de la biosíntesis de antibióticos y antifúngicos, o por competencia directa con los patógenos de la rizósfera. En la actualidad, la comunidad científica ha considerado su aplicación tecnológica dentro de un modelo de agricultura sustentable, basado en la utilización de este y otros microorganismos como estrategia para incrementar la productividad de cultivos de interés económico o ecológico (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994) aún en condiciones desfavorables (Barassi *et al.*, 2006).

Hipótesis

La hipótesis de trabajo sostiene que la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*, en semillas y plántulas de soja (*Glycine max* L.) tratadas con NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, determinará una mayor eficiencia en el uso del agua, mayor crecimiento y acumulación de materia seca, en comparación con las no inoculadas e inoculadas solamente con *Bradyrhizobium japonicum*.

Objetivo general

Evaluar la respuesta de crecimiento y el estado hídrico de plántulas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y sometidas a condiciones de estrés salino por NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica, en condiciones controladas (cámara de crecimiento) y semi-controlados (invernáculo) de cultivo hidropónico.

Objetivos específicos

1-Evaluar la germinación de semillas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* o *Azospirillum brasilense* en condiciones de cultivo recomendadas para la especie o modificadas por la adición de concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica.

2-Evaluar peso fresco y peso seco aéreo y radical, así como el número de nódulos en plántulas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y cultivadas en condiciones controladas (cámara de crecimiento), en sistemas hidropónicos suplementados con concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica, en comparación con las plántulas no inoculadas e inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*.

3-Evaluar peso fresco y peso seco aéreo y radical, longitud final de tallo principal y raíz primaria y curva de crecimiento de tallo en plantas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y cultivadas en condiciones semi-controladas (invernáculo) en sistemas hidropónicos suplementados con concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica, en comparación con las plántulas no inoculadas e inoculadas solamente con *Bradyrhizobium japonicum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

En todos los experimentos se utilizaron semillas de soja (*Glycine max.* L) A 5901 RG (transgénica tolerante a glifosato, NIDERA), de ciclo intermedio-largo de crecimiento determinado. Antes del comienzo del ensayo se evaluó su energía y poder germinativo de acuerdo a normas de la International Seed Test Association (ISTA) para la especie.

Inoculante comercial

Las semillas se inocularon con la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum*, recomendada por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, IMYZA-INTA Castelar y registrada nacionalmente ante el SENASA para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del marbete del producto CELLTECH® para soja de la empresa Nitragin Argentina SA. Adicionalmente, aquellos tratamientos que lo requirieron, fueron co-inoculados con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*, recomendada por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, IMYZA-INTA Castelar y registrada nacionalmente ante el SENASA para la formulación de inoculantes para gramíneas en la República Argentina. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del marbete del producto BONUS® para soja de la empresa Nitragin Argentina SA. Esta cepa fue recientemente testada por Perrig *et al.*, (2005) sobre su capacidad de promover el crecimiento vegetal en medio definido. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustará de acuerdo a las recomendaciones del marbete del producto BONUS® de la misma empresa.

Condiciones generales del ensayo de germinación en cámara

Para el desarrollo del experimento, se utilizaron cajas de petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro como soporte impregnado con 10 ml de H₂O como control o soluciones -0,2; -0,3; -0,4 y -0,6 MPa de NaCl; Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, de acuerdo a cada tratamiento. Previo a la siembra, las semillas fueron inoculadas con dosis recomendadas de los productos mencionados a base de cada microorganismo y adicionalmente se consideró un tratamiento sin bacterización. La preparación de cada sal y su equivalencia en concentración de iones se detalla a continuación en las Tablas A y B:

Cuadro A: Preparación de soluciones entre 0,05 y 0,15 M de NaCl, a partir de una solución 1M y su equivalencia en términos e potencial osmótico, de acuerdo a Sosa *et al.*, (2005).

MOLARIDAD	POTENCIAL OSMÓTICO	SOLUCION 1 M NaCl (ml)	H₂O destilada (ml)
0,05	-0,1 MPa	4,5	85,5
0,075	-0,3 MPa	6,72	83,25
0,1	-0,4 MPa	9	81
0,15	-0,6 MPa	13,5	77,5

Cuadro B: Preparación de soluciones entre 0,05 y 0,15 M de Na₂SO₄, a partir de una solución 1M y su equivalencia en términos e potencial osmótico, de acuerdo a Sosa *et al.*, (2005).

MOLARIDAD	POTENCIAL OSMÓTICO	SOLUCION 1 M Na₂SO₄ (ml)	H₂O destilada (ml)
0,044	-0,1 MPa	4	86
0,066	-0,3 MPa	6	84
0,088	-0,4 MPa	8	82
0,132	-0,6 MPa	12	78

La experiencia se desarrolló con un diseño aleatorio de dos replicas por tratamiento (n=10) y en cada cápsula se colocaron 10 semillas de soja (*Glycine max* L.). Las placas conteniendo las semillas fueron colocadas en una cámara de germinación mantenida a 25 °C y condiciones de oscuridad hasta la finalización del ensayo. El parámetro determinado en todos los casos fue el número de semillas germinadas por réplica, considerando como tales a aquellas que presentan mas de 0.5 cm de longitud la radícula. Los intervalos de evaluación fueron establecidos inicialmente a las 48 h y luego cada 24 h hasta el momento de la evaluación de la energía germinativa (5 d), de acuerdo a normas ISTA (2007) (Internacional Seed Test Asossiation), más una evaluación final (8 d) considerado el tiempo de evaluación de poder germinativo, para la misma especie. En ambos casos se consideró el promedio (P) así como su desvío standard (SD) para el total de semillas germinadas sobre el total de semillas existentes en la placa.

Condiciones generales del ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo

La experiencia se llevó a cabo con un diseño aleatorio, de tres réplicas por tratamiento (n=10) y los datos fueron analizados por ANOVA y test de Tuckey *a posteriori* con p<0.05.

Para ello, 300 semillas fueron sembradas en bandejas plásticas conteniendo arena y agua destilada estéril (60 % de capacidad de campo). Las semillas fueron cultivadas en cámara de germinación con un fotoperíodo de 16 h de luz a 30° C y 8 h de oscuridad a 25° C con 80 % de HR durante 72 h. Transcurrido este período, se seleccionaron los individuos con crecimiento y características morfológicas uniformes y se implantaron en un sistema de bandejas plásticas con receptáculos individuales de 100 ml de capacidad, conteniendo vermiculita estéril como único sustrato y solución nutritiva de Hoagland (25 % modificada y sin adición de N) suministrada por riego capilar. Las semillas fueron inoculadas luego de 48 h desde la implantación, con una dosis de 2.0×10^9 UFC.ml⁻¹ de la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum*, formulada en el producto CELLTECH® de la empresa Nitragin Argentina SA. o co-inoculadas con 1×10^8 UFC.ml⁻¹ de la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* formulada en el producto BONUS® de la empresa Nitragin Argentina SA. en los tratamientos pertinentes. La bacterización se llevó a cabo utilizando una micropipeta y a nivel radicular y luego las plántulas fueron cultivadas por 12 días en las condiciones ambientales descriptas anteriormente, de acuerdo a los siguientes tratamientos:

1-Semillas sin inocular

2-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109.

3-Semillas co-inoculadas con *B. japonicum* E109 y *A. brasilense* Az39.

4-Semillas tratadas con 100 mM de NaCl e inoculadas con *B j* E109.

5-Semillas tratadas con 100 mM de Na₂SO₄ e inoculadas con *B j* E109.

6-Semillas tratadas con 100 mM de NaCl y Na₂SO₄ e inoculadas con *B j* E109.

7-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 100 mM de NaCl.

8-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 100 mM de Na₂SO₄.

9-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 100 mM de NaCl y Na₂SO₄

La salinización comenzó luego de 48 h desde la inoculación y co-inoculación. Para ello, la solución nutritiva de Hoagland (25 %, sin N) fue modificada por la adición de 100 mM de NaCl (-0,4 MPa); una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. Al finalizar la experiencia, fueron evaluados los siguientes parámetros de crecimiento: (a) peso (fresco y seco) aéreo y radical (b) nodulación en raíz principal (Test de Burton) y (c) número de plantas noduladas.

Condiciones generales del ensayo de crecimiento en invernáculo

La experiencia fue desarrollada en el invernáculo de la Universidad Nacional de Río Cuarto, que se encuentra emplazada sobre la ruta nacional n° 36 Km. 601, Las Higueras, Córdoba (33° 07' Latitud Sur, 64° 14' Longitud Oeste, 421 m.s.n.m.) durante la campaña 2005-2006. El ensayo se llevó a cabo con un diseño experimental "anidado" que consistió en

8 tratamientos con tres repeticiones cada uno. Cada tratamiento consistió de tres receptáculos o macetas plásticas flexibles de 20 cm de diámetro x 20 cm de longitud, con una mezcla de perlita:arena (2:1) estéril como soporte inerte según Somasegaran *et al.*, (1994), conteniendo 5 semillas de soja. Para asegurar el crecimiento sin deficiencias nutricionales, todas las semillas fueron inoculadas con la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum*, recomendada por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, IMYZA-INTA Castelar y registrada nacionalmente ante el SENASA para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina. Debido a la imposibilidad de obtener un producto de la misma firma comercial que el utilizado en los ensayos en condiciones controladas, la forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del marbete de un producto de similares características de la empresa Laboratorios López SRL de la ciudad de Jesús María (Córdoba), que recomienda la aplicación de 10 ml de formulación concentrada con un título de 1×10^9 UFC.ml⁻¹, para 50 kg de semillas. A los fines de comprobar nuestros objetivos, se realizó, de acuerdo al tratamiento, la co-inoculación con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* en concentraciones ajustadas a lo indicado por el marbete comercial de la misma empresa, que recomienda la aplicación de 10 ml de formulación concentrada con un título de 1×10^8 UFC.ml⁻¹, para 50 kg de semillas. Cada maceta recibió por capilaridad agua destilada estéril hasta el momento de la emergencia. A partir de este momento, el riego capilar se realizó con solución nutritiva de Hoagland 25% (sin N), que se renovó cada 7 días hasta la finalización del ensayo. Las variantes para cada tratamiento se resumen a continuación:

- 1-Semillas sin inocular
- 2-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109.
- 3-Semillas co-inoculadas con *B. japonicum* E109 y *A. brasilense* Az39.
- 4-Semillas tratadas con 150 mM de NaCl e inoculadas con *B j* E109.
- 5-Semillas tratadas con 150 mM de Na₂SO₄ e inoculadas con *B j* E109.
- 6-Semillas tratadas con 150 mM de NaCl y Na₂SO₄ e inoculadas con *B j* E109.
- 7-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 150 mM de NaCl.
- 8-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 150 mM de Na₂SO₄.
- 9-Semillas co-inoculadas con *Bj* E109 y *Ab* Az39 en 150 mM de NaCl y Na₂SO₄.

La salinización comenzó a los 15 días posteriores a la siembra, mediante pulsos de 50 mM de la sal correspondiente, cada 7 días hasta que alcanzó una concentración final de 150 mM. La experiencia completa finalizó cuando las plantas alcanzaron el estado fenológico correspondiente a R1 según la escala de desarrollo de Fehr y Caviness (1977) (comienzo de floración), evaluándose los siguientes parámetros de crecimiento: (a) longitud aérea y radical; (b) peso seco y fresco aéreo y radical; (c) sistema de nodulación (número de

nódulos, porcentaje de plantas noduladas y test de Burton); (d) longitud final de tallo principal y raíz primaria (cm) y (e) velocidad de crecimiento de la fracción aérea de la planta ($\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$). Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de Tukey *a posteriori* con $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de germinación en cámara de cultivo

Cuadro 1: Porcentaje (%) de semillas germinadas en placas de Petri impregnadas con volúmenes constantes de agua (control), soluciones de NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales en concentraciones crecientes.

		C	MPa de NaCl				MPa de Na ₂ SO ₄				MPa de NaCl+ Na ₂ SO ₄			
Lectura	T	0	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6
1	48	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	72	85	40	45	55	25	50	40	25	20	85	50	30	20
3	96	100	70	60	70	60	80	60	35	45	90	75	65	55
4-EG	120	100	90	80	95	95	90	80	70	70	95	80	80	60
5-PG	192	100	90	95	100	100	95	95	80	80	100	95	90	80

C : Concentración osmótica de las soluciones expresadas como Mpa.

T : Tiempo de evaluación desde tiempo 0 (comienzo del ensayo).

Como se observa en el **Cuadro 1** y en la **Figura 1**, la mejor respuesta a nivel de velocidad de germinación, se obtuvo en las semillas del tratamiento control sin salinizar. En tales condiciones, se obtuvo el máximo valor de germinación, que se consiguió luego de 96 h de incubación y se mantuvo hasta la finalización del ensayo. En lo que se refiere a las soluciones salinas, podemos destacar que el tratamiento de semillas con cualquiera de las sales o su mezcla isosmótica a potenciales osmóticos (P_0) mayores a -0.2 MPa determinó una disminución significativa, tanto del porcentaje de semillas germinadas, como de la velocidad de germinación. Al respecto, Shannon (1997), mencionan que en presencia de sales, la germinación y crecimiento temprano se ven principalmente inhibidos por el componente osmótico de la sal. En el caso particular de la mezcla isosmótica, se determinó una velocidad de germinación similar al tratamiento control a un $P_0 = -0.2$ MPa pero a diferencia del anterior, el incremento de la germinación fue sostenido (mayor a 90%) a partir de las 96 horas y alcanzó un valor máximo al momento de evaluar el poder germinativo (192 h). A pesar de que en el **Cuadro 1** se comprueba un comportamiento máximo de germinación (solo sostenido luego de 120 h) en semillas tratadas con NaCl para $P_0 = -0.4$ y -0.6 MPa, cuando los valores se ajustaron a un modelo exponencial de crecimiento, como indica la **Figura I**, fueron menores que el control no salinizado; sin embargo, su comportamiento fue superior al de las semillas tratadas con Na₂SO₄ y la mezcla isosmótica de sales. Cuando las semillas fueron tratadas con soluciones $P_0 = -0.3$ MPa, no se determinaron diferencias considerables en el patrón de respuesta poblacional y solo en la fase de crecimiento lineal (**Figura 1**^{INSET $P_0 = -0.3$}) se podría considerar una velocidad de germinación superior de aquellas

semillas tratadas con la mezcla isosmótica de sales y una velocidad inferior de aquellas tratadas con Na_2SO_4 y NaCl respectivamente. En el caso de las semillas tratadas con soluciones $P_0 = -0.4$ MPa se determinó una respuesta diferencial, de acuerdo al tipo de solución salina. Las semillas tratadas con la solución de Na_2SO_4 mostraron una respuesta inferior, tanto a nivel de la velocidad (**Figura 1** ^{INSET $P_0 = -0.4$}), como del porcentaje (**Cuadro 1**) de semillas germinadas. Tal efecto fue parcialmente revertido cuando se adicionó Na_2SO_4 junto con NaCl en una solución isosmótica, así como por la adición independiente de NaCl , que determinó el mejor comportamiento de las semillas salinizadas. Al respecto, estudios de la respuesta germinativa de *Prosopis strombulifera*, una leguminosa arbustiva de la subfamilia Mimosoideae, demostraron que el anión sulfato en soluciones monosalinas isoosmóticas, era considerablemente mas inhibitorio que el anión cloruro. Adicionalmente se demostró que la toxicidad ocasionada por sulfato era revertida cuando el sulfato era combinado con el cloruro en soluciones bisalinas de sodio (Sosa *et al.*, 2005). En el caso de las semillas tratadas con las soluciones $P_0 = -0.6$ MPa se determinó una respuesta similar a la obtenida en $P_0 = -0.4$ MPa sobre el efecto de las diferentes combinaciones de sal; sin embargo, la fase inicial de crecimiento determinó un porcentaje de germinación superior al 50 % de las semillas posterior a las 96 h desde la incubación y alcanzó valores comparables en el caso de las semillas tratadas con la mezcla bisalina y el Na_2SO_4 . Esto se debería, tanto al incremento del anión sulfato en la mezcla de sales a valores comparables a los establecidos en la solución $P_0 = -0.4$ MPa como a la incapacidad del NaCl de revertir el efecto de toxicidad.

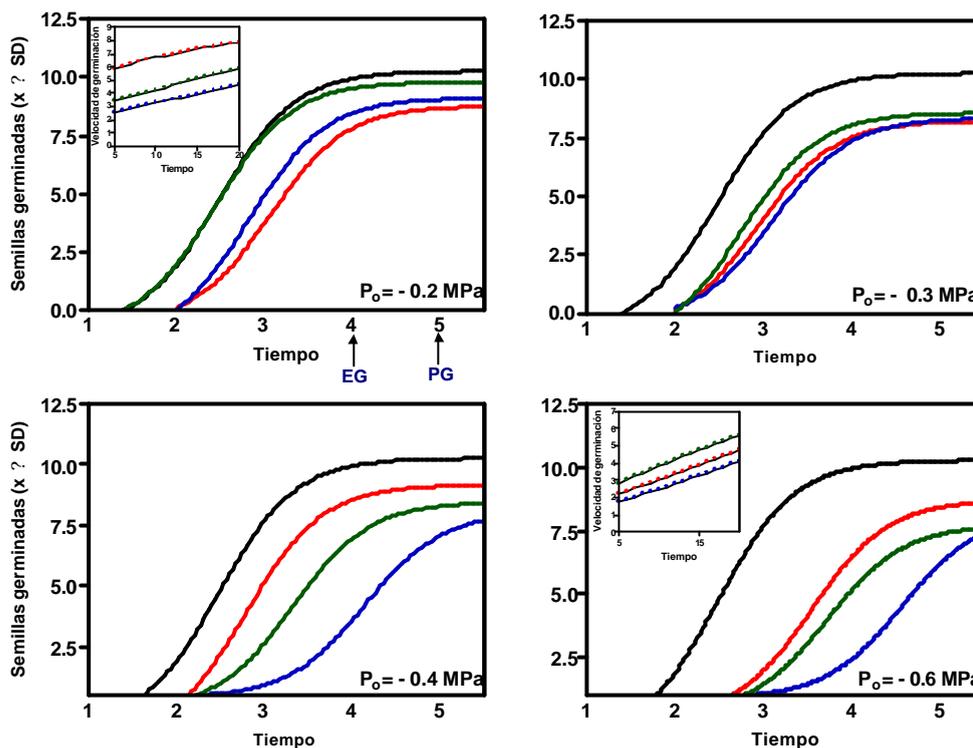


Figura 1: Comportamiento germinativo ajustado a un crecimiento exponencial ($r^2 > 0.95$) de semillas de soja impregnadas con volúmenes constantes de agua (negro), solución de NaCl (rojo), Na_2SO_4 (azul) o la mezcla isosmótica de ambas (verde). INSET: Velocidad de crecimiento en fase lineal ($r^2 > 0.99$).

Cuadro 2: Porcentaje (%) de semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 germinadas en placas de Petri impregnadas con volúmenes constantes de agua (control), soluciones de NaCl, Na_2SO_4 o la mezcla isosmótica de sales en concentración creciente.

		C	NaCl (MPa)				Na_2SO_4 (MPa)				NaCl+ Na_2SO_4 (MPa)			
Lectura	T	0	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6
1	48	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	72	90	70	50	55	35	70	30	30	5	60	35	40	15
3	96	95	95	75	70	55	85	50	50	20	80	75	65	40
4-EG	120	95	100	90	80	80	90	70	65	45	95	80	75	55
5-PG	192	95	100	100	80	90	100	90	80	85	95	90	90	80

C : Concentración osmótica de las soluciones expresadas como Mpa.

T : Tiempo de evaluación desde tiempo 0 (comienzo del ensayo).

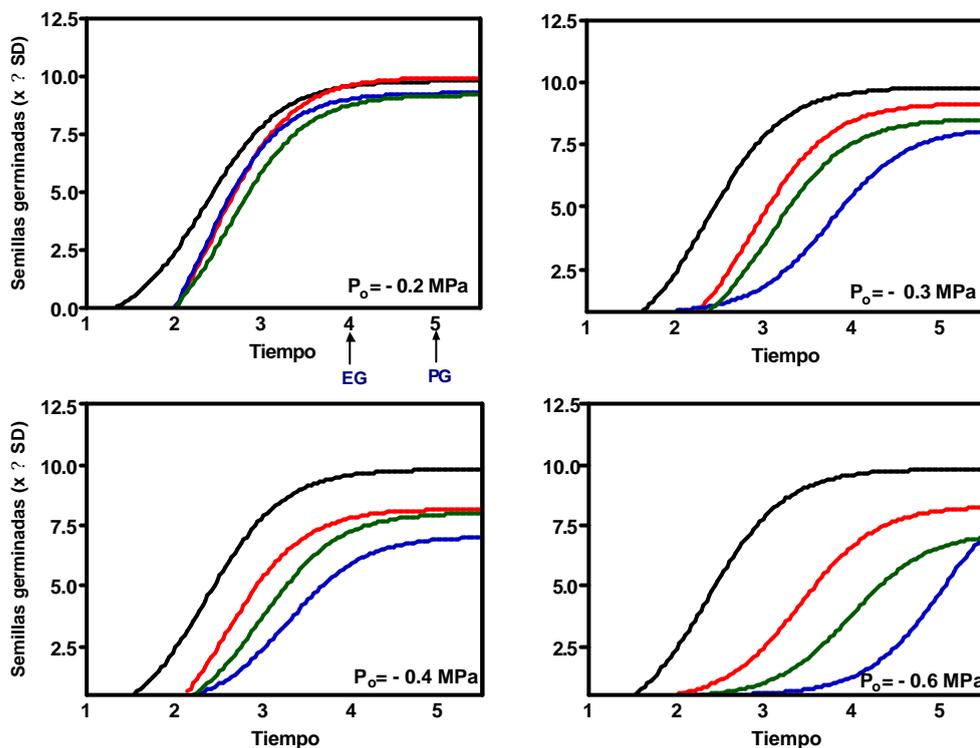


Figura 2: Comportamiento germinativo ajustado a un crecimiento exponencial ($r^2 > 0.95$) de semillas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* e impregnadas con volúmenes constantes de agua (negro), soluciones de NaCl (rojo); Na_2SO_4 (azul) o la mezcla isosmótica de ambas sales (verde).

Como se observa en el **Cuadro 2** y en la **Figura 2**, podemos decir que el tratamiento inoculado y no salinizado (control) tuvo una mayor velocidad de germinación solo en las primeras 72 h de incubación, en las que alcanzó un porcentaje del 90 %. Esta tendencia fue revertida luego de ese período de tiempo y hasta la finalización del ensayo por todas las semillas tratadas con soluciones $P_0 = -0.2$ MPa. En el caso particular del NaCl, alcanzó un valor máximo de 100% al momento de la evaluación de la Energía germinativa (120 h) y su comportamiento fue comparativamente superior al control no salinizado. Comparando esta respuesta, con aquella obtenida en las semillas sin inocular (**Figura 1**) para un P_0 de -0.2 MPa podemos destacar que la bacterización determinó un menor impacto sobre la germinación de cada una de las sales adicionadas de manera independiente, no diferenciándose de la respuesta obtenida por la adición de la mezcla isosmótica de sales. Para el caso de las semillas tratadas con soluciones de P_0 de -0.3 , -0.4 y -0.6 MPa, podemos discriminar un patrón de crecimiento similar al determinado en las semillas no inoculadas, en las que el Na_2SO_4 determinó una respuesta inferior, tanto a nivel de la velocidad (**Figura 2**), como del porcentaje de germinación (**Cuadro 2**). De la misma manera, este efecto fue

parcialmente revertido por la adición de Na₂SO₄ con NaCl en una solución isosmótica, así como por la adición independiente de NaCl. Particularmente en aquellas semillas tratadas con soluciones P₀ de -0.6 MPa de Na₂SO₄, se comprobó una respuesta altamente inhibitoria de la velocidad de germinación, comparada con los mismos tratamientos de las semillas no inoculadas (**Figura 1** y **Cuadro 1**) lo que determinaría que en condiciones de alta concentración del anión SO₄⁻², la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium japonicum* podría tener un efecto aletargador de la velocidad de germinación que no afectaría significativamente el porcentaje de semillas geminadas al momento de considerar su poder germinativo. Esto se pone en evidencia en la Cuadro 2, en la que se comprueba que las semillas tratadas con P₀ -0.6 MPa de Na₂SO₄ alcanzan un porcentaje de germinación del 85% luego de 192 horas de incubación; sin embargo el 50 % de la población de semillas germina luego de la evaluación de la energía germinativa a las 120 h. Una hipótesis de este comportamiento podría estar relacionada con la incapacidad de *Bradyrhizobium japonicum* de sobrevivir a potenciales osmóticos de soluciones de Na₂SO₄ inferiores a P₀ -0.3 MPa y con ello la incapacidad de regular cualquier proceso en la semilla. En tal sentido, es necesario destacar que al igual que lo que sucede en plantas superiores, es escasa la información disponible del efecto del SO₄⁻² sobre el crecimiento microbiano.

Cuadro 3: Porcentaje (%) de semillas de soja inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y germinadas en placas de Petri impregnadas con volúmenes constantes de agua (control), soluciones de NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales en concentración creciente.

		C	NaCl (MPa)				Na ₂ SO ₄ (MPa)				NaCl+ Na ₂ SO ₄ (MPa)			
Lectura	T	0	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6
1	48	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	72	90	60	20	40	35	35	35	10	15	45	30	30	15
3	96	100	90	70	60	50	70	60	60	55	85	70	70	35
4-EG	120	100	90	85	85	70	75	80	70	70	95	75	85	55
5-PG	192	100	90	95	95	90	100	95	90	80	100	95	95	75

C : Concentración osmótica de las soluciones expresadas como Mpa.

T : Tiempo de evaluación desde tiempo 0 (comienzo del ensayo).

Como se observa en el **Cuadro 3** y en la **Figura 3**, la mejor respuesta a nivel de la velocidad de geminación, se obtuvo en las semillas del tratamiento control sin salinizar e inoculado con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*. En tales condiciones, se obtuvo el máximo valor de germinación, que se consiguió a las 96 h de incubación y se mantuvo hasta la finalización del ensayo. En lo que se refiere a las

soluciones salinas, podemos destacar que el tratamiento de semillas con cualquiera de las sales o su mezcla isosmótica a potenciales osmóticos (P_0) mayores a -0.2 MPa determinó una disminución significativa, tanto del porcentaje de semillas germinadas, como de la velocidad de germinación, comparados con el control no salinizado. A diferencia de lo que ocurrió en el tratamiento sin inocular (**Figura 1**), la presencia de NaCl determinó el menor porcentaje de semillas germinadas; sin embargo, este tratamiento llegó a un máximo porcentaje de germinación (90 %) dentro de las primeras 96 h de incubación a diferencia de aquellos en los que se adicionaba Na_2SO_4 para los que el máximo porcentaje de germinación se consiguió a las 192 h de incubación. A diferencia de lo observado en las semillas no inoculadas de la **Figura 1** y de las inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* de la **Figura 2** que fueron tratadas con soluciones de P_0 de -0.3 , -0.4 y -0.6 MPa, no evidenciamos un efecto deletéreo del Na_2SO_4 sobre el resto de los tratamientos, lo que determinaría que la incorporación del microorganismo a las semillas permitiría regular benéficamente el proceso de germinación en condiciones de salinidad por Na_2SO_4 . Al respecto, ensayos realizados con semillas de lechuga inoculadas con *Azospirillum* demostraron que, tanto la energía germinativa (ISTA 2007) como el PG fueron significativamente superiores a los controles sin inocular, tanto a 50 como 80 mM NaCl (Barassi *et al.*, 2006). Otros ensayos adicionalmente han probado la tolerancia de este género microbiano a concentraciones mayores a 200 mM de NaCl en medio químicamente definido (Fisher *et al.*, 2000) y quizás parte de la respuesta reguladora observada, en primera instancia se deba a la capacidad del microorganismo de tolerar tales concentraciones de la sal. Por otro lado es necesario destacar que no existen referencia relacionadas con la supervivencia de la bacteria en soluciones de Na_2SO_4 en las que suponemos debería darse una respuesta similar a la observada en la sal de sodio. Por otro lado, parte de la regulación sobre el sistema vegetal, se debería a la adición conjunta del microorganismo y de compuestos reguladores del crecimiento vegetal, del tipo fitohormonas producidos por la bacteria durante su fermentación, que amortiguarían el estrés iónico ocasionado por el anión sulfato al embrión. En tal sentido, Perrig *et al.*, (2007) comprobaron la capacidad de la cepa Az 39 de *Azospirillum brasilense* para producir ácido giberélico (GA_3), abscísico (ABA), indol 3-acético (AIA), zeatina (Z) y etileno, así como ciertas poliaminas (PAs) en medio químicamente definido. Esta hipótesis supone la incorporación de estas moléculas a la semilla en el momento de la inoculación y en la actualidad se apoya sobre la

consideración de que la mayoría de los inoculantes a base de esta bacteria del mercado nacional, además de aportar un número considerable de microorganismos viables, aportarían estas moléculas con un efecto a corto plazo sobre la semilla (Cassán *et al.*, 2007). Si bien existió una respuesta uniforme a los diferentes tratamientos de salinización, es necesario destacar que la respuesta fue disminuyendo en la medida que disminuía el potencial osmótico de la solución.

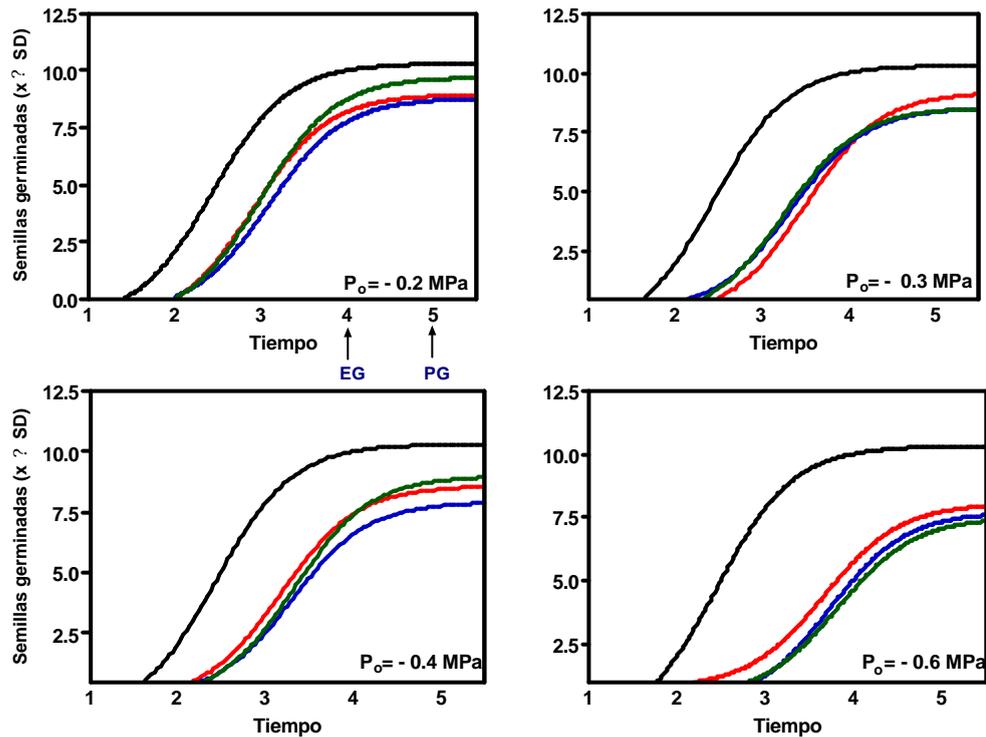


Figura 3: Comportamiento germinativo ajustado a un crecimiento exponencial ($r^2 > 0.95$) de semillas de soja inoculadas con *Azospirillum brasilense* y germinadas en placas de Petri impregnadas con volúmenes constantes de agua (negro), soluciones de NaCl (rojo), Na_2SO_4 (azul) o la mezcla isosmótica de ambas sales (verde), como se describe en materiales y métodos.

Ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo

Estado hídrico y producción de biomasa

Como podemos observar en la Figura 4, el efecto de la inoculación (*Bradyrhizobium japonicum*) y en mayor magnitud de la co-inoculación (*Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*) en plántulas de soja, determinó un aumento significativo en el peso fresco de la parte aérea (PFA), con respecto al control sin inocular. Esta respuesta se debería, al menos en parte, a un

mejor estado hídrico de las plántulas bacterizadas, determinado por la producción bacteriana de compuestos reguladores del crecimiento que le permitirían una mayor retención y absorción de agua y nutrientes desde la solución mineral (Hoagland). Ensayos realizados en otras especies vegetales, tal como *Lotus glaber*, demostraron que la presencia de *Azospirillum* sp. junto a la fijadora de nitrógeno *Mesorhizobium loti* en los tejidos vegetales, determinaba un mejor estado hídrico de las plántulas inoculadas, comparadas con aquellas sin inocular (Cassán *et al.*, 2006). Similares resultados fueron obtenidos por la inoculación de ambas estirpes bacterianas en semillas de soja (*Glycine max* L.) y maíz (*Zea mays* L.) en sistemas de cultivo controlados (Cassán *et al.*, 2007). A nivel de raíces, en los tratamientos inoculados y co-inoculados no se observó un aumento significativo del peso fresco radical (PFR) producido por la bacterización. Cuando las plántulas inoculadas se sometieron a salinidad mediada por NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla de ambas, se observó una disminución significativa del peso fresco, tanto a nivel aéreo como radical en comparación con el control inoculado y no salinizado. En tal sentido, el peso fresco aéreo y radical, así como el estado hídrico de ambas fracciones vegetales, fue mayormente afectado por la presencia de Na₂SO₄. De acuerdo con Shannon y Grieve (1999), este efecto se debería, al menos en parte al componente osmótico de las diferentes sales adicionadas al medio de cultivo que sería el responsable de reducir la tasa de crecimiento, principalmente en los estadios de germinación y crecimiento temprano. En las plántulas salinizadas con NaCl y Na₂SO₄ que fueron co-inoculadas con *A. brasilense*, se comprobó un incremento significativo del peso fresco aéreo (PFA), con respecto a los tratamientos salinizados e inoculados con *B. japonicum*. Resultados similares se obtuvieron con plántulas de trigo (Alvarez *et al.*, 1996; Creus *et al.*, 1998) y maíz (Casanovas *et al.*, 2002), donde la inoculación con *Azospirillum* Sp245 aliviaba los efectos del estrés salino. También, esto se comprobó en condiciones extensivas de cultivo (Casanovas *et al.*, 2003; Creus *et al.*, 2004). Esta diferencia se explicaría desde la capacidad de *Azospirillum brasilense* para biosintetizar compuestos relacionados potencialmente con la tolerancia vegetal al estrés abiótico, tales como ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007) y poliaminas (Cassán *et al.*, 2003).

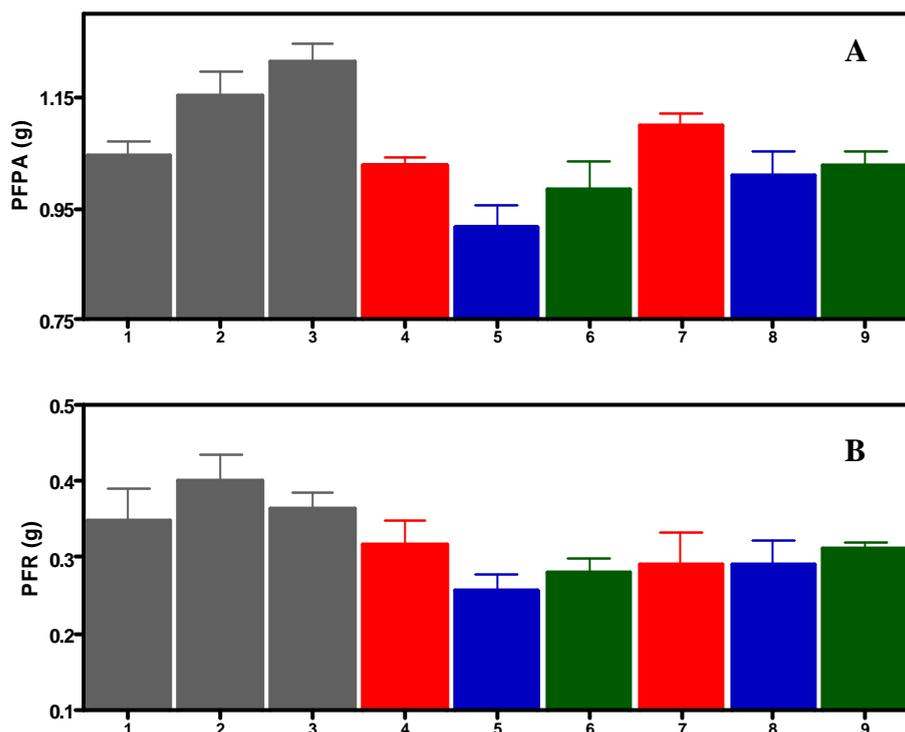


Figura 4: Peso fresco de la parte aérea (PFPA) (A) y peso fresco radical (B) (parte inferior), de plántulas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109; co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y cultivadas en 100 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en materiales y métodos. (T=SD para p<0.05).

En la **Figura 5** podemos observar que a nivel de los tratamientos no salinizados, se mantiene un comportamiento similar al obtenido por la evaluación del estado hídrico de la planta, expresado como peso fresco (PF). En tal sentido, podemos destacar un incremento de la producción de biomasa, expresado como peso seco (PS) de las plántulas de soja inoculadas (*Bradyrhizobium japonicum*) y en mayor medida, co-inoculadas (*Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense*), comparadas con el control sin bacterizar. A diferencia de lo expresado en la **Figura 1**, este incremento se comprobó con diferencias significativas tanto a nivel aéreo como radical. Al respecto, Cassán *et al.*, (2007) informaron que la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium japonicum* E109, produce un incremento significativo del crecimiento, expresado como peso seco de la raíz y de la parte aérea, como consecuencia de dos mecanismos de la interacción bacteriana con la planta, un efecto temprano mediado por la presencia de compuestos reguladores del crecimiento del tipo hormonal en el medio de cultivo (Boiero *et al.*, 2006). En tal

sentido, Kaneshiro y Kwolek (1985) observaron que la inoculación de semillas de soja con una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* productora natural de AIA mostraba un incremento significativo del número de nódulos establecidos en raíces inoculadas, así como el aumento en volumen y peso de los órganos vegetales en desarrollo. El segundo efecto considerado estaría determinado a mediano plazo y sería mediado por la capacidad de la cepa inoculada de aportar nitrógeno atmosférico por medio de la fijación biológica de este elemento (FBN). Cuando las plántulas inoculadas se sometieron a condiciones de salinización, se observó una inhibición del crecimiento en todos los tratamientos, independientemente de la sal adicionada, en comparación con aquellos controles inoculados y co-inoculados. Adicionalmente, las plántulas que se expusieron a NaCl y Na₂SO₄ fueron más afectadas, que aquellas sometidas a la exposición con la mezcla isosmótica de sales. En este sentido, ensayos realizados por Luna *et al.*, (2006) con las mismas sales y en la leguminosa halófila *P. strombulifera*, demostraron que en la fracción aérea de plántulas tratadas con la mezcla isosmótica de sales (a baja concentración), se obtenía un crecimiento comparable al de los tratamientos monosalinos. Con respecto a las plántulas co-inoculadas en condiciones de estrés salino, se manifestó una menor inhibición del crecimiento con respecto a las mismas plantas inoculadas, siendo estas diferencias solo significativas para los tratamientos con NaCl y Na₂SO₄ y no para la mezcla isosmótica de sales. En primera instancia, esto respuesta se debería a que la asociación de la planta con *Azospirillum* podría favorecer la mitigación del estrés salino, por una mayor promoción del crecimiento de plantas afectadas (Barassi *et al.*, 2000) o por la capacidad de la bacteria de producir compuestos capaces de regular el crecimiento de la misma en condiciones de estrés abiótico, tal como ABA (Perrig *et al.*, 2007) o cadaverina (Cassán *et al.*, 2005). En tal sentido, plántulas de zanahoria inoculadas con *A. brasilense* Sp245 y mantenidas durante 23 días en soluciones de hasta 80 mM de NaCl, mostraron ventajas significativas en el crecimiento expresado como peso seco radical y aéreo con respecto a los controles sin inocular (Ayrault, 2002).

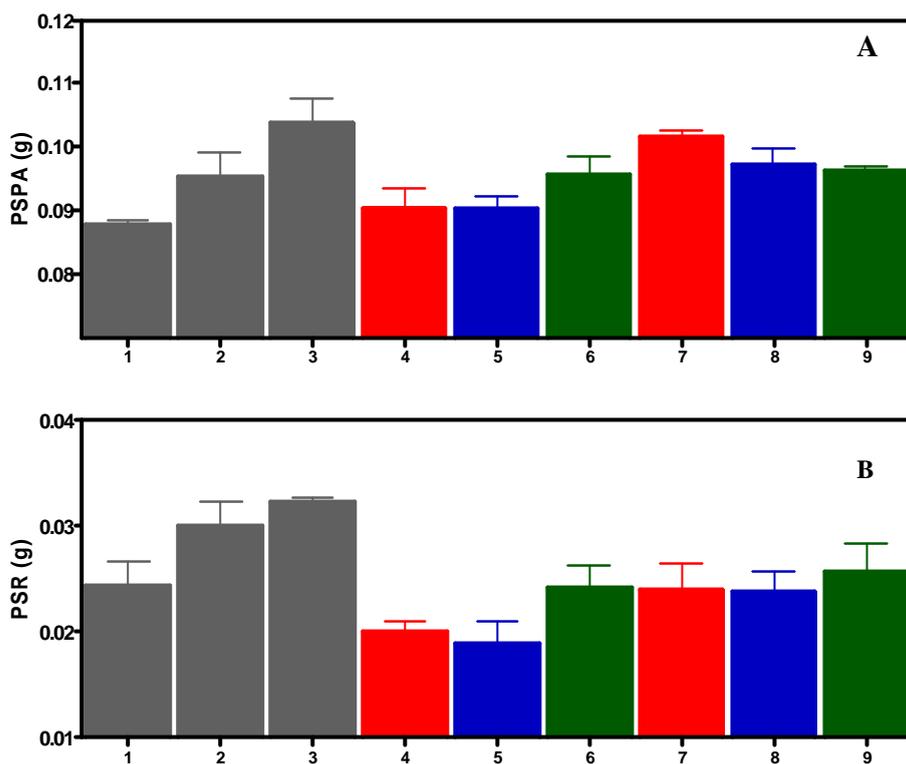


Figura 5: Peso seco de la parte aérea (PSPA) (A) y peso seco radical (PSR) (B), de plántulas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109; co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y cultivadas en 100 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en materiales y métodos. (T=SD para p<0.05).

Parámetros de nodulación

Desde el punto de vista fisiológico, el desarrollo y la ontogenia del nódulo en leguminosas, es uno de los eventos que más se ve afectado por los componentes iónico y osmótico de una sal. Esto se debe a que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es uno de los eventos más complejos y costosos de la naturaleza y esta sujeto a un riguroso sistema de regulación tanto de la planta como del microorganismo (Serraj *et al.*, 1999).

Como se observa en la **Figura 6**, la inoculación con *B. Japonicum* en plántulas de soja, comparadas con las plántulas sin inocular fue morfológicamente diferenciable y determinó un incremento significativo del porcentaje de nódulos por planta (PNP); el promedio de plantas noduladas (PPN) y el Test de Burton (1972). De manera similar, las plántulas co-inoculadas con *A. brasilense* mostraron un incremento significativo sobre las plántulas inoculadas con *Bradyrhizobium*, a nivel del PNP y del PPN y sobre los controles sin inocular en todos los parámetros. Esta respuesta ha sido probada en otros sistemas experimentales (Cassán *et al.*, 2007) y se debería, en parte, a la capacidad de *Azospirillum*

para regular el establecimiento de la simbiosis; la nodulación y eventualmente la fijación biológica de nitrógeno (FBN), a través de la promoción directa del crecimiento radical, mediada por la biosíntesis de compuestos reguladores del crecimiento del tipo fitohormonas, tales como, AIA; Z y GA₃ (Perrig *et al.*, 2007). Al respecto, Okon (1985) menciona la capacidad de *Azospirillum* para promover el crecimiento radical de las plantas inoculadas, así como la FBN, por medio de un modelo predominantemente hormonal. Existen numerosos antecedentes en sistemas de co-inoculación de leguminosas con bacterias del género *Rhizobium* y rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas del género *Azospirillum* en los que se ha probado un aumento significativo del número, peso y actividad nitrogenasa de los nódulos formados en las raíces de las plantas co-inoculadas con respecto a aquellas solo inoculadas con *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1990, Kaneshiro y Kwoleck 1985; Fukuhara *et al.*, 1994). Cuando las semillas fueron co-inoculadas con *Azospirillum* y sometidas a estrés abiótico mediado por NaCl o Na₂SO₄, se observó una disminución significativa de los parámetros de nodulación, comparados con el control inoculado y co-inoculado no salinizado. En el caso de la exposición a soluciones de NaCl, ensayos realizados en cultivos de soja (*Glycine max* L.), sometidos a estrés salino en condiciones *a campo*, han determinado el efecto deletéreo de la sal a nivel de la nodulación y de la FBN (Velagaleti y Marsh, 1989). En otras leguminosas, como *Lotus graber* se determinó que tanto la nodulación, como la fijación biológica de nitrógeno eran significativamente inhibidas por concentraciones crecientes (100, 150 y 200 mM) de la sal en condiciones hidropónicas de cultivo (Cassán *et al.*, 2006). En el caso de *Vicia faba*, Yousef y Sprent (1983) mostraron que 100 mM de NaCl afectaban significativamente la nodulación, sobre todo a nivel del proceso de infección. La disminución generalizada de la capacidad de la planta y el microorganismo para consumir la simbiosis y la consecuente FBN en condiciones de salinidad dependería mayoritariamente de la regulación de la planta, por la activación de un mecanismo de conservación de la energía disponible, con el fin de regular de la homeostasis en condiciones de estrés (Cordobilla *et al.*, 1999). Respecto al efecto del Na₂SO₄ sobre la nodulación y FBN en leguminosas, podemos decir que no hay referencias bibliográficas sobre el tema y que este aspecto sería novedoso para este trabajo. En el caso de las plántulas sometidas a salinización por la mezcla isosmótica de sales, se determinó un incremento significativo de los parámetros de nodulación. Este efecto sería considerado una reversión de la toxicidad que tanto el NaCl como el Na₂SO₄ ocasionarían de manera independiente y sería comparable al obtenido cuando las plántulas fueron co-inoculadas con *Azospirillum* y sometidas a estrés salino. En tales tratamientos, se comprobó un aumento significativo de los parámetros de nodulación con respecto a los tratamientos inoculados y salinizados con NaCl y Na₂SO₄ que no determinó una diferencia de alguno de ellos de manera particular y en los que solo se comprobó un efecto más deletéreo, a nivel del Test de Burton (1972), en aquellas plántulas

sometidas a salinización por Na₂SO₄ comparados con el NaCl o la mezcla isosmótica de sales (**Figura 6**).

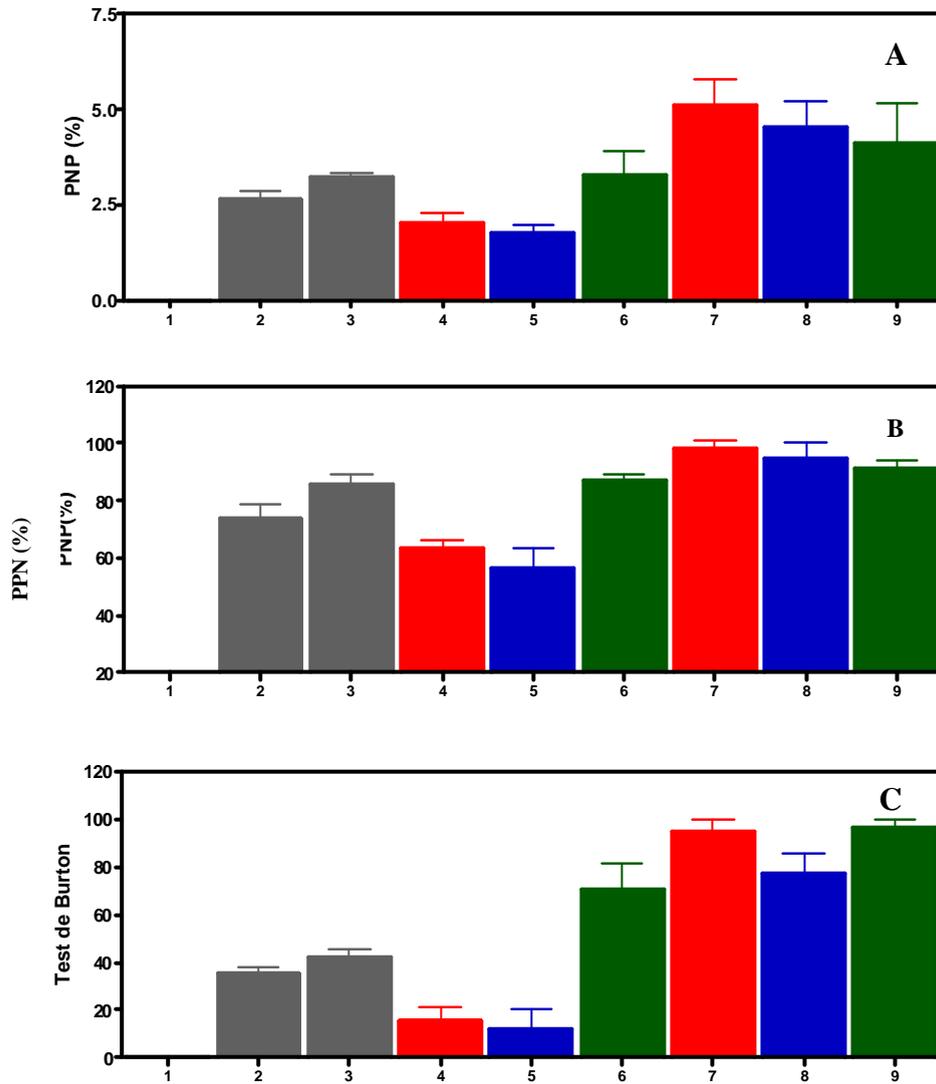


Figura 6: Porcentaje de nódulos por planta (PNP) (A) y porcentaje de plantas noduladas (PPN) (B) y Test de Burton (1972) (C), de plántulas de soja (*Glycine max* L.) inoculada con *B. japonicum* E109, co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y cultivada en 100 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en Materiales y métodos. (T=SD para p<0.05).

Ensayo de crecimiento tardío en invernáculo

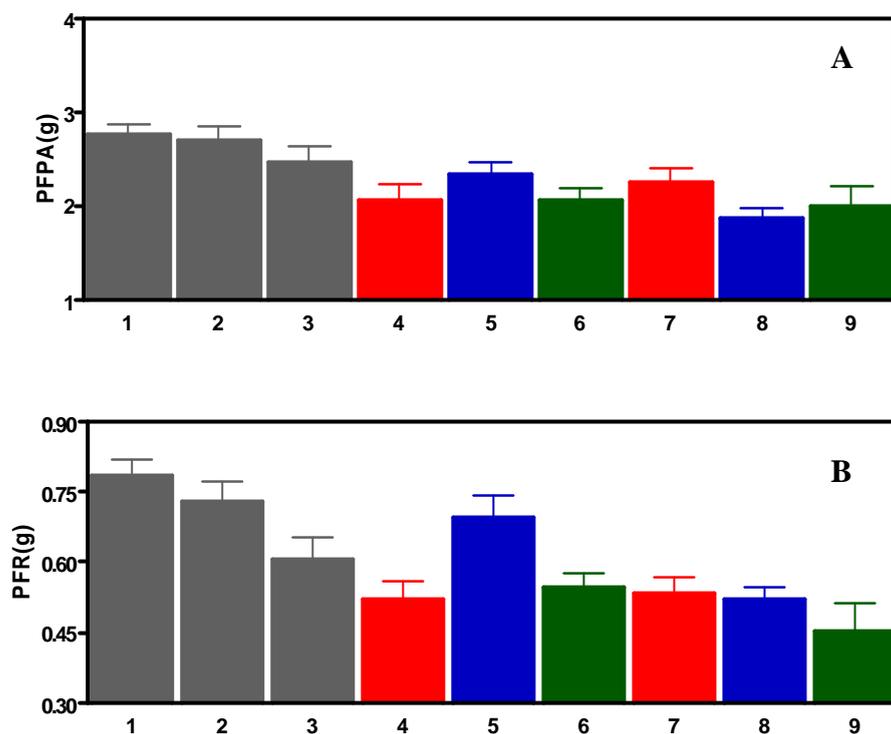


Figura 7: Peso fresco de la parte aérea (PFPA) (A) y peso fresco radical (PFR) (B), de plántulas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109; co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y cultivadas en 150 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en materiales y métodos. (T=SD para p<0.05).

Como se observa en la **Figura 7**, las semillas y/o plántulas de los tratamientos control (1); inoculado con *B. japonicum* (2) y co-inoculado con *A. brasilense* (3) presentaron un estado hídrico (expresado como peso fresco de la raíz y de la parte aérea) superior a la mayoría de los tratamientos salinizados, con excepción de aquellas plántulas no inoculadas y sometidas a estrés por Na₂SO₄ en las que se determinó una reversión significativa sobre estos parámetros. Según Shannon y Grieve (1999), tal condición se debería, al menos en parte, a la disminución de la disponibilidad de agua en el sustrato mediada por el componente osmótico de cada sal, con la consecuente disminución de la capacidad de realizar trabajo en la solución acuosa de Hoagland. Si comparamos el efecto de la salinización en aquellas semillas que fueron co-inoculadas, podemos observar que no se presentaron diferencias significativas en ambas fracciones vegetales (PFR y PFPA) debidas a la presencia de la bacteria y adicionalmente el estado hídrico de aquellas plántulas sometidas a salinización por Na₂SO₄ fue significativamente inferior cuando se co-inoculó. Este comportamiento, si bien determina un efecto benéfico de la inoculación e condiciones normales, no se correlaciona en condiciones de salinidad y no determina continuidad con los resultados obtenidos a nivel de

la germinación o del crecimiento temprano evaluado en cámara de crecimiento. Las causas posibles de este comportamiento se discutirán al finalizar la exposición de los resultados de este ensayo.

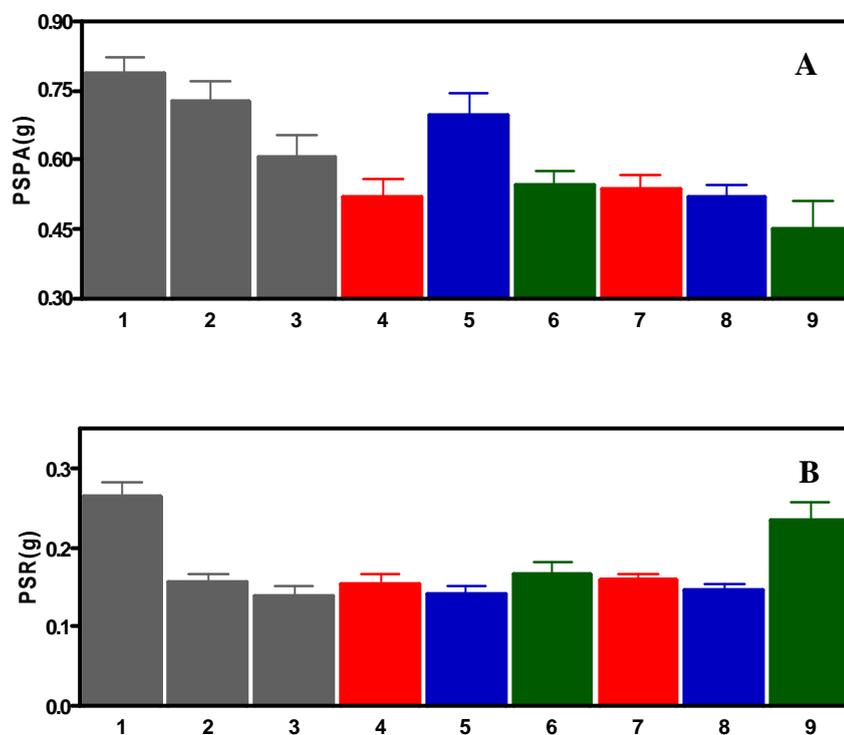


Figura 8: Peso seco de la parte aérea (PFPA) (“A”) y peso seco radical (PFR) (“B”), de plántulas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109; co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y cultivadas en 150 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en materiales y métodos. (T=SD para p<0.05).

Del análisis de la **Figura 8**, podemos deducir que las plantas del tratamiento control, correspondiente a las semillas no inoculadas, presentaron un mayor crecimiento y una mayor producción de biomasa (PSPA y PSR) que el resto de los tratamientos evaluados. Dos excepciones a este comportamiento se reportaron sobre el crecimiento aéreo y radical de las semillas inoculadas o de las no inoculadas y tratadas con la solución de Na₂SO₄, así como en aquellas co-inoculadas y sometidas a la mezcla isosmótica de NaCl y Na₂SO₄ respectivamente, en las que se demostró un crecimiento similar al control del ensayo. Una posible hipótesis de este comportamiento se presentará luego de la exposición de todos los resultados.

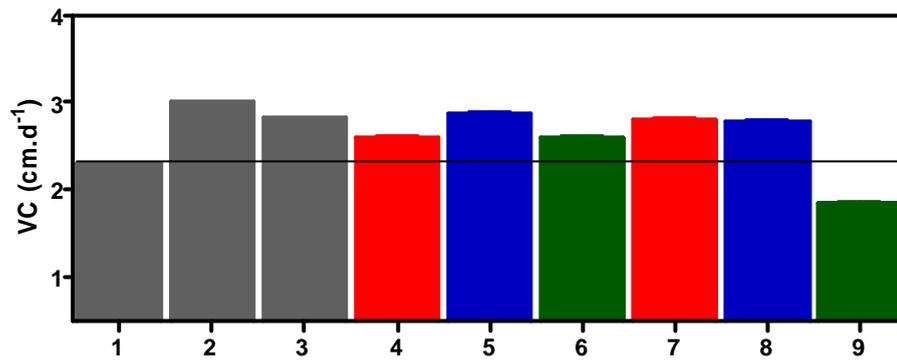


Figura 9: Velocidad de crecimiento obtenida de la curva sigmoide (cm.d⁻¹) de plántulas de soja no inoculadas; inoculadas con *B. japonicum* E109; co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 (barras negras) y cultivadas en 150 mM de NaCl (barras rojas); una concentración equivalente de Na₂SO₄ (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El parámetro fue obtenido de una regresión lineal de la fase de crecimiento constante de las curvas desarrolladas para cada tratamiento, en base a la longitud total de la parte aérea, utilizando el software PRISM® y considerando (T=SD para $p < 0.05$ y $r^2 > 0.95$).

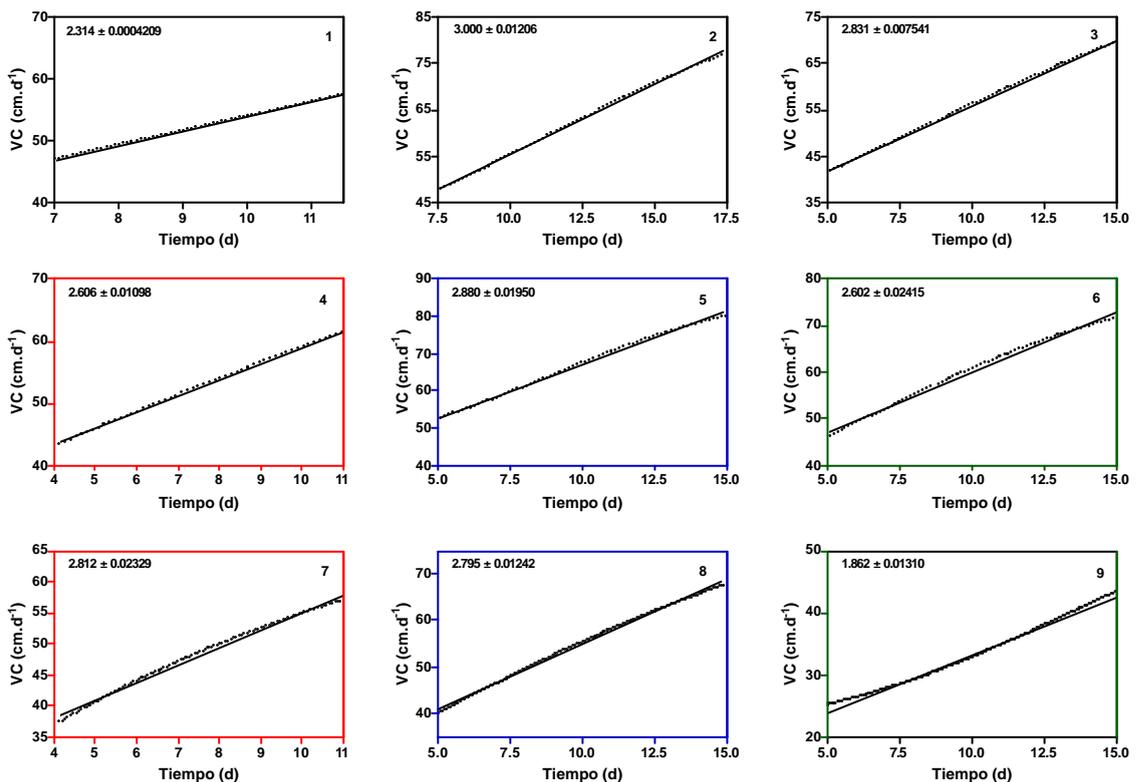


Figura 10: Velocidad de crecimiento expresada como cm.d⁻¹ de plántulas de soja no inoculadas (recuadro 1); inoculadas con *B. japonicum* E109 (recuadro 2); co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 (recuadro 3) y cultivadas en 150 mM de NaCl (recuadro 4 y 7 de color rojo); una concentración equivalente de Na₂SO₄ (recuadro 5 y 8 de color azul) o la mezcla isosmótica de ambas sales (recuadro 6 y 9 de color verde), utilizando el software PRISM® y considerando (T=SD para $p < 0.05$ y $r^2 > 0.95$).

Como podemos observar en las **Figuras 9 y 10**, las plantas no inoculadas y no salinizadas fueron las que presentaron una menor velocidad de crecimiento (cm.d^{-1}), en relación al resto de los tratamientos, con excepción de las plántulas co-inoculadas y salinizadas con la mezcla isosmótica de NaCl y Na_2SO_4 , en las que la velocidad fue menor a las del primero. En el caso de las plántulas salinizadas con NaCl y con la mezcla isosmótica de sales que fueron inoculadas con *Bradyrhizobium*, podemos observar que la velocidad de crecimiento fue menor a la del tratamiento control inoculado y al tratamiento co-inoculado que mostró una velocidad comparable al tratamiento salinizado con Na_2SO_4 . En lo que se refiere a las plantas co-inoculadas con *Azospirillum* y sometidas a salinización por NaCl, podemos decir que la velocidad de crecimiento fue superior a la obtenida en aquellas no inoculadas y que adicionalmente esta respuesta fue comparable al control co-inoculado, sin salinizar y en tal sentido, Alvarez (1996) menciona que *Azospirillum* sp podría incrementar la velocidad de crecimiento en plántulas de trigo bajo la influencia de estrés por NaCl. En el caso de las plantas salinizadas con Na_2SO_4 no se determinó una diferencia significativa a nivel de la velocidad de crecimiento entre aquellas co-inoculadas y no co-inoculadas.

Uno de los parámetros que inicialmente habíamos considerado para su evaluación, fue el del establecimiento del sistema de nodulación y la fijación biológica de nitrógeno, así como su modificación por la presencia de sales; sin embargo, al realizar la evaluación de este parámetro al finalizar el ensayo, pudimos comprobar que el establecimiento de la simbiosis había sido muy aleatorio y de mucho menor incidencia que en el ensayo de cámara de cultivo y que esta condición indefectiblemente modificó el resultado de nuestro experimento de manera negativa, debido a que las plántulas que alcanzaron a formar al menos un nódulo en su raíz principal pudieron tolerar la condición de estrés de manera diferencial a aquellas que no lo hicieron. El patrón de formación de nódulos fue altamente irregular y en la mayoría de los casos variable dentro de las réplicas del mismo tratamiento, lo que indefectiblemente determina que la eficiencia de los inoculantes utilizados para este ensayo fue inferior a la que se esperaba inicialmente. De manera general, podemos establecer que el fracaso para probar la hipótesis de trabajo del ensayo realizado en condiciones de invernáculo, se debió a un factor experimental que introdujo una fuerte aleatoriedad sobre los resultados obtenidos: Los inoculantes utilizados en este experimento no eran comercialmente aptos (de acuerdo a lo requerido por SENASA para la inoculación de maíz y soja). Debido a la imposibilidad de obtener una muestra de igual calidad que aquella utilizada para los ensayos desarrollados en cámara de cultivo y debido a la urgencia estacional para iniciar el ensayo en el invernáculo, se decidió utilizar inoculantes comerciales para maíz y soja de otra empresa que fueron remitidos a nuestro laboratorio para el recuento

de microorganismos viables con cierta anterioridad al desarrollo del ensayo. Cuando estas muestras comerciales fueron utilizadas para su evaluación en el laboratorio presentaron un recuento estimado en $5E+09$ UFC.ml⁻¹ de *Bradyrhizobium* y $8E+08$ UFC.ml⁻¹ de *Azospirillum* respectivamente; sin embargo, luego de su almacenamiento mostraron una rápida pérdida de viabilidad que posteriormente fue corroborada con valores de $1E+8$ UFC.ml⁻¹ y $5E+7$ UFC.ml⁻¹ respectivamente. A pesar de esta pérdida de viabilidad, podemos destacar que ambos productos mantuvieron su condición de monocultivo. Esta condición afectó considerablemente el número de bacterias aportadas por unidad de propagación (semilla), que para la inoculación de soja (SENASA) se estima en un título superior a las $8E+04$ UFC.semilla⁻¹. Estudios recientes realizados por Penna *et al.*, (2004), han determinado que cerca del 90 % de las bacterias que se aplican sobre la semilla en una formulación líquida, mueren antes de las 4 horas (desde el momento de la inoculación). Teniendo en cuenta esta consideración, la dosis comercial del inoculante que se utilizó para el desarrollo de este ensayo realizó un aporte menor al recomendado por SENASA para soja y que por efecto de la muerte celular ocasionada por la aplicación, su aporte real fue ampliamente inferior a $1E+04$ UFC.semilla⁻¹. Bajo esta consideración, la cantidad de bacterias aportadas solo permitió el establecimiento de los microorganismos en condiciones normales de cultivo y provocó una disminución significativa del número de bacterias viables en condiciones de salinidad, que imposibilitó una colonización efectiva de la rizósfera y la posterior FBN o promoción del crecimiento vegetal.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por nuestros experimentos indican que:

1-La salinización de plántulas o semillas de soja (*Glycine max* L.) con soluciones osmóticamente comparables de NaCl o Na₂SO₄ afectó considerablemente la germinación; el crecimiento y desarrollo temprano de la especie, así como el establecimiento de la simbiosis con *Bradyrhizobium japonicum*. En el caso de la germinación, tal efecto se correlacionó además con un aumento de la concentración de cada sal en el medio de cultivo. La salinización con Na₂SO₄ tuvo un efecto de mayor toxicidad a nivel de la velocidad de germinación y el número de plantas germinadas que en el caso del NaCl. Por contrapartida, la salinización con mezclas isosmóticas de NaCl y Na₂SO₄, revertió parcialmente el efecto individual de cada sal.

2- La co-inoculación de soja (*Glycine max* L.) con *Azospirillum brasilense* Az39 modificó significativamente la respuesta fisiológica de la semilla y de la planta a la salinización y revirtió parcialmente la condición de estrés impuesta. A nivel de la germinación, la incorporación de la bacteria mitigó el efecto de mayor toxicidad ocasionado por el Na₂SO₄ y las semillas presentaron una respuesta más uniforme.

Estos resultados demostrarían que *Azospirillum* sp. podría mejorar la respuesta vegetal a determinados tipos de estrés abióticos, por lo que estos microorganismos podrían ser incluidos en el grupo de rizobacterias denominadas PHRR, del inglés Plant Homeostasis Regulator Rhizobacteria .

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez M.I., Sueldo R.J. and Barassi C.A. (1996). Effect of *Azospirillum* on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. *Cereal Research Communications*, 24, 101-107
2. Ayrault G. (2002). Estudios sobre la factibilidad del uso de *Azospirillum* para mejorar la capacidad germinativa y el establecimiento de *Lactuca sativa* y *Daucus carota* bajo estrés salino. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 90 páginas.
3. Baldani, V.; Baldani, J. and Döbereiner J. (1987). Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum spp.* *Brazil. Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
4. Baldani, V.; Baldani, J. and Döbereiner J. (1987). Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum spp.* *Brazil. Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
5. Barassi C.A., Ayrault G., Creus C.M., Sueldo R.J. and Sobrero M.T. (2006). Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*, 109, 8-14.
6. Barassi, C., Creus, C., Casanovas, E., Sueldo. R., (2000). Could *Azospirillum* mitigate abiotic stress effects in plants?. Auburn University web site available at: <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/barassi.pdf>
7. Boiero, L. Perrig, D. Masciarelli, O. Penna, C. Cassán F. and Luna V. (2006). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (4): 874-880.
8. Burton J., Martinez, C. and Curley, R. (1972). *Methods of testing and suggested standars for legume inoculants and preinoculated seed*. pp:1-156. Nitragin Corporation. USA.
9. Casanovas E.M, Barassi C.A. and Sueldo R.J. 2002. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal Research Communications*, 30, 343-350.
10. Casanovas, E., Barassi, C., Andrade, F., Sueldo, R. (2003). *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. *Cer. Res. Commun.* 31, 395-402.
11. Cassán F, Piccoli, P. and Bottini R. (2003). Plant growth promotion by *Azospirillum sp.* through gibberellin production. An alternative model to increase crop yield?. *Microbiología Agrícola*. pp: 143-158. ISBN: 987-99083-5-1

12. Cassán F; Paz R; Maiale S; Masciarelli O; Vidal A; Luna V.; Ruíz O (2005). Producción de cadaverina por *Azospirillum brasilense* Az39. Un nuevo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Biocell. En prensa.
13. Cassán F., Pieckenstain F., Palma F.; Estrella J., Sanjuan J., Lluch-Plá C., Ruíz O. (2006). Regulación de la respuesta a salinidad de *Lotus glaber* por la inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Mesorhizobium loti*. Actas de la Asociación Argentina de las Ciencias del Suelo. CD-Rom. ISBN 987-21419-5-9
14. Cassán F; Perrig D; Sgroy V.; Masciarelli O; Penna C; Luna V. (2007). Regulación de la germinación y crecimiento temprano de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) y soja (*Glycine max* L.) mediados por la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* Az39. Actas de la VI REBIOS. ISBN: 978-950-665-438-2.
15. Cisneros JM, Cantero JJ y Cantero Gutiérrez A. (1997). Revista UNRC. 17 (1): 23-35
16. Cordovilla, M.; Ligeró, F.; Lluch, C. (1999). Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO₃ fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant Science*. 140: 127-136.
17. Creus C.M., Sueldo R.J. and Barassi C.A. (1998). Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany*, 76, 238-244.
18. Creus, C., Sueldo, R., Barassi, C. (2004). Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can. J. Bot.* 82, 273-281.
19. Diaz-Zorita, M. (2004). Manual práctico para la producción de soja. Eds. Diaz-Zorita, M y Duarte G. Hemisferio. República Argentina.
- Egan T., Ungar I. (1998). Journal of Plant Nutrition 21(10): 2193-2205.
20. Egan, T. and Ungar, I. (1998). Effect of different salts of sodium and potassium on the growth of *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae). *J. Plant Nutr.* 21(10) 2193-2205.
21. Fehr, W. and Caviness, C. (1977). Stages of soybean development. Special Report 80. Iowa State University, Ames, Iowa. 11p.
22. Fischer, S. Rivarola V. and Mori G. (2000). Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. *Plant and Soil* 225: 187-191.
23. Fukuhara, H.; Minakawa, Y.; Akao, S. and Minamisawa K. (1994). The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol.* 35:1261-1265.
24. Grattan and Grieve (1999). En Handbook of Plant and Crop Stress. Cap 9: 203-229. Ed. Mohammad Pessarakli. New York.
25. Holmberg and Bülow (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. Trends

- in Plant science. 3(2): 61-66.
26. International Seed Test Association (2007). International Rules for Seed Testing. ISTA Editorial. USA.
 27. Kaneshiro, T. and Kwoleck, W. (1985). Stimulated nodulation of soybean by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. *Plant Sci.* 42:141-146.
 28. La soja en Argentina.1997 En: www.monografias.com/trabajos/la-soja.html
 29. Luna, V. Reginato, M., Hampp, E., Sosa, L., Llanes, A., Reinoso, H. (2006). Differential growth and ion accumulation in the halophytic legume *Prosopis strombulifera* in response to NaCl, Na₂SO₄ and their mixture. International conference on biosaline agriculture & high salinity tolerance. Gammarth, Tunisia. pp 85.
 30. Okon, Y. (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol. 3: 223-228.
 31. Okon, Y. and Labandera-González, C. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26: 1591-1601.
 32. Patten C. and Glick B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.
 33. Penna, C., Demares, D., Guerrero, M., Gutkind, G. (2004) Vancomycin as a selective agent in agarized media for evaluating bacterial inoculant after seed treatment. Abstracts Book of Latin American Conference on Rhizobiology. Brasil. pp 60.
 34. Perrig D, O Masciarelli, A Peticari, F Cassán, V Luna (2005) Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasilense* az39, la cepa más utilizada en la formulación de inoculantes para gramíneas en argentina. Biología de Suelos. 2005- CD ROM-PGPR; ISBN 950-721-237-1
 35. Perrig D, O Masciarelli, A Peticari, F Cassán, V Luna (2005) Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasilense* az39, la cepa más utilizada en la formulación de inoculantes para gramíneas en argentina. V Reunión Nacional de Biología de Suelos: 2005- CD ROM-PGPR; ISBN 950-721-237-1
 36. Perrig, D., Boiero, L., Masciarelli, O., Penna, C., Ruíz, R., Cassán F. and Luna V. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 1143-1150.
 37. Rhoades and Loveday (1990). In: Irrigation of Agricultural Crops, pp. 1089-1142.

38. Serraj, R., Sinclair, T. and Purcell, L. (1999). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*. 50:143-155.
39. Shannon M.C. Grieve C. (1999). Effect of salinity and oxygen level on lettuce grown in a floating system. *Scientia Horticulturae* 78: 5-38.
40. Shannon, M. (1997). Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron.* 60, 75-120.
41. Somasegaran et al. (1994). En: *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag. NY.
42. Sosa L, (2005). Adaptaciones fisiológicas de *Prosopis strombulifera* a condiciones de salinidad por cloruros y sulfatos. Ph.D Thesis, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
43. Sosa L, Llanes A, Reinoso H, Reginato M, and Luna V. (2005). "Osmotic and Specific Ion Effects on the Germination of *Prosopis strombulifera*". *Annals of Botany* 96 (2): 261-267.
44. Tien, T.; Gaskin, M. and Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Microbiol* 37: 1016-1024.
45. Velagaleti RR, Marsh S. (1989). Influence of host cultivars and *Bradyrhizobium* strains on growth and symbiotic performance of soybean under salt stress. *Plant and Soil* 119: 133–138.
46. Yahalom, E., Okon, Y. and Dovrat, A. (1990). Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the roots morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.* 36: 10-14.
47. Yousef, A. and Sprent, J. (1983). Effects of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and NH₄NO₃ fertilized *Vicia faba* (L.) plants. *J. Experimental Botany* 34, 941-950.