



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

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

**Respuesta fisiológica a la salinidad impuesta por NaCl y Na₂SO₄ en
plántulas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]**

Rebeca Quetglas

DNI: 30.627.565

**Director: Dr. Fabricio Cassán
Co-Directora: Dra. Virginia Luna**

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

2009

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

**Respuesta fisiológica a la salinidad impuesta por NaCl y Na₂SO₄ en
plántulas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]**

Autora: Rebeca Quetglas

DNI: 30.627.565

Director: Dr. Fabricio Cassán

Co-Director: Dra. Virginia Luna

Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del Jurado Evaluador:

Ing. Agr. (Dra.) Elena Fernández

Ing. Agr. (MsCs) Teresa Caminos

Fecha de presentación: _____

Aprobado por Secretaría Académica: _____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto y en particular a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por su contribución a mi instrucción profesional brindada durante los años de carrera.
- A mi Director Dr. Fabricio Cassán y Co-directora Dra. Virginia Luna
- A mi familia, Norma, Osvaldo, Leonardo y Samuel, a los cuales les dedico este trabajo, por su sostén y confianza para cumplir esta aspiración que anhelo.
- A Fernando por ayudarme, inspirarme, recomendarme y compartir tantas cosas en esta etapa de mi vida.
- A mis compañeros de estudio que me han ayudado tanto durante toda mi formación como profesional.
- Y por ultimo, a tanta otra gente que forma parte de mi vida, aportando a lo que hoy en día soy.

INDICE

RESUMEN	IV
SUMMARY	V
INTODUCCIÓN	
Origen e historia del cultivo	1
La soja en nuestro país	1
La salinidad de los suelos y la respuesta vegetal al estrés	2
El rol de las bacterias en la respuesta vegetal al estrés	4
OBJETIVOS	
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
MATERIALES Y METODOS	
Material Vegetal	7
Inoculación con <i>B. japonicum</i>	7
Condiciones general del ensayo	7
Determinación de ABA	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA CITADA	28

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Crecimiento como longitud de la parte aérea	10
Figura N° 2: Crecimiento como peso fresco aéreo	12
Figura N° 3: Crecimiento como peso fresco radical	14
Figura N° 4: Relación del peso fresco radical y aéreo (IC-R.PA ⁻¹)	16
Figura N° 5: Crecimiento como peso seco aéreo	17
Figura N° 6: Crecimiento como peso seco radical	19
Figura N° 7: Relación del peso seco radical y aéreo (IC-R.PA ⁻¹)	20
Figura N° 8: Nodulación	21
Figura N° 9: Ácido abscisico (ABA).	25

INDICE DE IMÁGENES

Fotografía N° 1: Crecimiento como longitud de la parte aérea.	11
Fotografía N° 2 Estado general de plantas de soja al final del ensayo.	24

RESUMEN

Respuesta fisiológica a la salinidad impuesta por NaCl y Na₂SO₄ en plántulas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.]

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 estrategia posible para mejorar la respuesta vegetal del cultivo de soja en condiciones de salinidad, se basa en la inoculación con rizobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium japonicum*, con el fin de generar un uso más eficiente del nitrógeno, desde el punto de vista de la capacidad de la planta para enfrentar una condición de estrés abiótico. Hasta el momento, no han sido desarrollados trabajos que permitan comparar el efecto del estrés salino en especies de glicófitas que obtengan el nitrógeno a través de la fijación biológica, en comparación con otras que lo obtengan por la simple absorción radical, a partir de una fuente mineral. En base a estos antecedentes, la hipótesis de este trabajo sostuvo que en la leguminosa glicófito [*Glycine max* (L.) Merr.], la obtención de nitrógeno a través de la fijación biológica en interacción con bacterias simbióticas del género *Bradyrhizobium* o la obtención del mineral a partir de una fuente inorgánica por absorción radical, podrían determinar una respuesta diferencial a la salinización por NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica, a nivel del crecimiento o de la producción endógena de ABA. Para probar esta hipótesis, el modelo experimental se basó en la evaluación del crecimiento y estado hídrico, así como la respuesta vegetal al estrés mediada por la producción de ácido abscísico (ABA), en plántulas de soja mantenidas en condiciones semi-controladas de crecimiento, en cultivos hidropónicos suplementados con 0, -0,30; -0,47 y -0,65 MPa de NaCl; concentraciones equivalentes de Na₂SO₄ o de la mezcla isosmótica de ambas sales (NaCl+ Na₂SO₄). Además, éstos tratamientos se diferenciaron en condiciones de fijación biológica de nitrógeno, por la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, o en sistemas de fertilización mineral, por la adición de nitrógeno en la solución nutritiva. Los resultados de este trabajo sugieren que la inoculación de soja con *B. japonicum* sería al menos en parte, efectiva para revertir el efecto de la salinización en comparación con plantas fertilizadas con nitrógeno mineral, lo que permitiría suponer que en condiciones de estrés salino, el nitrógeno generado por la FBN se utilizaría de manera más eficiente que por el aporte mineral o fertilización.

Palabras Clave: soja; salinidad; *Bradyrhizobium japonicum*; ácido abscísico

SUMMARY

Physiological responses of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] to salinity conditions generated by NaCl or Na₂SO₄

Soil salinization diminishes the agricultural frontier generating soils of low productivity. This situation justifies the search of new alternatives destined to extend the agricultural practice in restrictive soils and/or to increase the productivity in optimal conditions. A possible strategy to improve the soybean answer in salinity conditions is based on the seed inoculation with the nitrogen-fixing rhizobacteria *Bradyrhizobium japonicum* to generate a more efficient use of the nitrogen under abiotic stress conditions. In this sense, have not been developed research works that allow to compare the effect of saline stress in glycophyte species (as soybean) obtaining nitrogen through the biological fixation or by the simple radical absorption from a mineral source. Based on this information our work hypothesis was “in a typical glycophyte leguminous as soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] the nitrogen obtaining through the biological fixation in symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* or the nitrogen obtaining of the mineral source by radical absorption, could determine an differential plant stress answer to the salinization conditions generated by NaCl, Na₂SO₄ or its isosmotic mixture of both. This answer could be correlated with the plant homeostasis at level of growth and development or the production, as physiological stress marker molecule. In order to prove this hypothesis, the experimental conditions were adjusted to the evaluation of the plant growth, hydric status and stress response by abscisic acid (ABA) production of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seedlings grown in hydroponic medium supplemented with 0, -0,30; -0,47 and -0,65 MPa NaCl; equivalent concentrations of Na₂SO₄ or the isosmotic mixture of both (NaCl+ Na₂SO₄), in semi-controlled hydroponic culture conditions. Additionally, seedlings were treated with two different nitrogen statuses: biological fixation by inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* or mineral fertilization by radical absorption of nitrogen. Results of this work suggest that the inoculation of soybean seeds with *B. japonicum* would be effective, at least partly, to mitigate the negative effects of salinization compare to the plants treated with mineral nitrogen. This fact, would allow supposing that in abiotic stress conditions, the nitrogen generated by the biological fixation would be used more efficiently than the obtained by mineral fertilization to maintain the plant homeostasis.

Key words: soybean; salinity; *Bradyrhizobium japonicum*; abscisic acid.

INTRODUCCIÓN

1.1. 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.) Merr.] es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China y es considerada uno de los alimentos más fuertes de los pueblos del oriente. Hacia el año 3000 AC, los chinos consideraban a la soja como una de las cinco semillas sagradas y su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra chino-japonesa en 1894, momento en que los japoneses comenzaron a importar tortas de aceite de soja para usarlas como fertilizantes en su país (Argenbio, 2009). La primera referencia Europea que se tiene de la soja se remonta al siglo XVII, a mano de los misioneros, que introducen los primeros granos de soja para su cultivo, pero sin mayor éxito en ese momento. A principios del siglo XIX se empezó a cultivar en Estados Unidos; mientras que en Europa no se introdujo en la dieta alimenticia, hasta bien entrado el siglo XX. La primera cosecha comercial se realizó en 1929 con la idea de suministrar semillas para hacer salsa de esta leguminosa (AV Natural, 2009).

1.2. La soja en nuestro país

Las primeras hectáreas de soja en nuestro país fueron sembradas en 1862, pero no encontraron repercusión en los productores agrícolas de aquellos años. En 1925, se introdujeron nuevas semilla desde Europa y se trató de difundir su utilización. Hacia 1956, en la Argentina, no se conocían aún los aspectos básicos de la especie como un cultivo y 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, observándose un gran impulso desde 1996, cuando se introdujo la variedad transgénica resistente al glifosato (RR), creciendo el área sembrada a razón del 12% anual. En la campaña 1991/92 se sembraron 5.000.000 de hectáreas que pasaron a 18 millones en la campaña 2007/08. La producción, que en 1990 era de 10.000.000 de toneladas, llegó a los 48 millones en 2007/08, consolidando a la Argentina como uno de los mayores productores mundiales del grano (SAGyP, 2008). 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. Así, Córdoba, Santa Fé y Buenos Aires representan las provincias de dicha región con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos (García, 2009). No debe sorprender, entonces, que este cultivo represente en la

actualidad, el rubro de exportación de mayor incidencia en el Producto Bruto Agropecuario (PBA) del país y el mayor generador de divisas en el mercado agrícola nacional.

1.3. La salinidad de los suelos y la respuesta vegetal 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). Una estrategia para mejorar y expandir las fronteras agrícolas y re-utilizar los recursos disponibles se focalizan en la obtención de cultivos tolerantes a la salinidad o déficit hídrico con el objeto de introducirlos en las tierras desfavorables o no utilizadas. En la región agrícola central, principalmente en la provincia de Córdoba y Santa Fé, los suelos salinizados aumentan en superficie año tras año disminuyendo la productividad y disponibilidad de los mismos para su expansión (Cantero *et al.*, 1996). Sobre la base de la tolerancia relativa a salinidad de diversos cultivos, Mujeriego (1990) ha considerado cuatro niveles de respuesta: tolerantes (T), moderadamente tolerantes (MT), moderadamente sensibles (MS) y sensibles (S). 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.

Desde el punto de vista fisiológico, la salinidad causa dos tipos de estrés en los tejidos vegetales: un estrés hídrico 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. Shannon *et al.* (1999) afirman que el factor osmótico de la salinidad es responsable de reducir la tasa de crecimiento (principalmente en los estadios de germinación y crecimiento de la plántula) y de modificar la arquitectura vegetal (proporción raíz/tallo). De este modo, no cabe duda que ocurren variadas interacciones iónicas en plantas bajo estrés, que implican importantes consecuencias para el crecimiento de las mismas. En sistemas naturales, el grado de salinización y el tipo de sales presentes, varía en los diferentes tipos de suelos y con la fuerte provisión de agua de los mismos. En la mayoría de los casos, los principales cationes presentes en la solución son Na^+ , Ca^{++} , 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 ensayo en condiciones de salinidad se reproduzcan solo por el uso de NaCl como el único agente salinizante, limitando la posibilidad de extrapolación de resultados a condiciones reales de campo en las que hay más de un tipo de sal presente. En los suelos salinizados del sur de Córdoba, las sales predominantes son NaCl y Na_2SO_4 (Cisneros *et al.*, 1999). Según Egan y Ungar (1998), muy

pocos estudios enfocan los efectos del Na_2SO_4 en el crecimiento vegetal, a pesar de ser de interés creciente la comparación de los mismos con los del NaCl .

Existen muy pocos trabajos en los que se haya evaluado el efecto del Na_2SO_4 a nivel del crecimiento y desarrollo de leguminosas glicófitas; sin embargo, existen numerosas publicaciones recientes que vinculan el efecto de esta sal sobre la respuesta de crecimiento de ciertas gramíneas cultivables e incluso sobre ciertas leguminosas y no-leguminosas halófitas. Tal es el caso del trabajo publicado por Lone (1988), quien determinó la mayor toxicidad del ión SO_4^{-2} a nivel del crecimiento y desarrollo de embriones de cebada. Azhar y Qureshi (2005), evaluaron la respuesta del crecimiento de dos cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidos a salinización por NaCl o Na_2SO_4 y encontraron una respuesta opuesta, siendo el Cl^- más tóxico que el SO_4^{-2} . Por otro lado, Bie *et al.* (2004) determinaron que tanto el Na_2SO_4 como el HCO_3Na podían disminuir y afectar considerablemente el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.), siendo dependiente de la acumulación excesiva de Na^{+2} en los tejidos. Por su parte, Shi y Sheng (2005), determinaron una respuesta similar en girasol (*Helianthus annuus* L.) tanto por la salinización con Na_2SO_4 , como por la alcalinización del medio con el consecuente aumento de pH. Estudios previos realizados por Reinoso *et al.* (2004), demostraron que ciertos genotipos de una leguminosa halófito llamada *Prosopis strombulifera*, exhibieron una notable tolerancia a NaCl pero no a la misma concentración de Na_2SO_4 donde el desarrollo general de la planta fue fuertemente afectado (Reginato, 2003). Similares resultados fueron previamente informados por Warne *et al.* (1990) en la halófito *Chenopodium rubrum*, en la que el Na_2SO_4 fue más inhibitorio sobre el crecimiento y tóxico en los tejidos que el NaCl .

Particularmente para la soja, numerosos trabajos relatan el efecto de la salinización con NaCl a nivel del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* y la posterior fijación biológica de nitrógeno (FBN); sin embargo no hay referencias de trabajos que hayan comparado el efecto de más de una sal sobre este proceso o la consecuencia del uso de otros microorganismos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Singleton y Ben Bohlool (1984) probaron que en *Glycine max* (L.) Merr., la aplicación retardada de NaCl , provocaba un aumento en el número y peso de nódulos, así como de la FBN y propusieron que la iniciación del nódulo es extremadamente sensible, incluso a bajas concentraciones de NaCl y que la sensibilidad no está relacionada con la supervivencia microbiana o a su capacidad de infección o posterior fijación de nitrógeno. Por su parte, Balasubramanian y Sinha (1976) sugieren que el total de nódulos, peso y contenido de nitrógeno por planta de caupí y frijol disminuyen debido a la salinización, interfiriendo solo con el inicio de la ontogenia de estos órganos, pero no con su futuro desarrollo. Resultados similares fueron obtenidos en otras leguminosas, como *Lotus glaber* en las que se determinó que tanto la nodulación (número y ubicación de nódulos), como la FBN (actividad nitrogenada) eran significativamente

inhibidas por concentraciones crecientes de NaCl en cultivo hidropónico (Cassán *et al.*, 2006).

Por otra parte, el ácido abscísico (ABA) desempeña un papel fundamental en la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés ambiental y se ha probado que adicionalmente a su bien conocida función en el cierre estomático, la tolerancia de los tejidos se ve incrementada significativamente con elevadas concentraciones de esta fitohormona (Hartung y Jesschke, 1999) por lo que se la considera una molécula antiestrés generalizada. La exposición de un organismo al estrés, trae aparejadas importantes modificaciones fisiológicas, que afectan el normal crecimiento y desarrollo del individuo. La estrategia de las plantas para tolerar esta condición, es debida a la activación de múltiples vías metabólicas, tendientes a (1) facilitar la retención y/o adquisición de agua, (2) proteger la funcionalidad de las células, (3) modificar la estrategia de crecimiento y (4) mantener la homeostasis en general. El ABA es la molécula clave de esta respuesta y quizás el compuesto químico de mayor relevancia y jerarquía dentro de los mecanismos de respuesta al estrés hídrico o salino. Esta molécula desencadena el estado de alerta en tejidos vegetales, como una señal química al estrés y comandada la respuesta de la planta a tal condición (Bray, 1997). Por lo tanto, se deduce la importancia de determinar sus niveles endógenos en respuesta a un estrés determinado.

1.4. El rol de las bacterias promotoras del crecimiento en la respuesta vegetal al estrés

Una posible alternativa para mejorar la respuesta vegetal a condiciones de salinidad, se basaría en la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno de los géneros *Bradyrhizobium* o *Azospirillum*. En tal sentido, la utilización de microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico o regular el crecimiento vegetal, destinados a mejorar el balance nutricional e hídrico de la planta en suelos con alto contenido de NaCl o Na₂SO₄, podría considerarse como parte de esta estrategia. Recientemente, Han y Lee (2005), probaron que la co-inoculación de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y una rizobacteria promotora del crecimiento del género *Bacillus* aumentaban la tolerancia, vía un aumento de la actividad antioxidante de plántulas de soja, sometidas a estrés salino por NaCl. Similares resultados fueron informados por Ramadú *et al.* (2007) en sistemas de co-inoculación de soja con *Azospirillum brasilense* Az39 y en plántulas de maíz inoculadas con la misma cepa PGPR en condiciones de estrés salino generadas por NaCl o Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales (Calcagno *et al.*, 2007). Estos resultados permitirían proponer que la co-inoculación de uno o ambos microorganismos en soja o la inoculación con *Azospirillum* en maíz, mitigarían el estrés salino impuesto a través del incremento del peso fresco (estado hídrico), peso seco (biomasa), número de plantas noduladas y número de nódulos por planta en soja, y que tal respuesta podría ser considerada como una alternativa

tecnológica de bajo costo para el manejo de estos cultivos. Finalmente, Lodeiro *et al.* (2000) lograron probar que el estrés hídrico en poroto era mitigado de manera más eficiente cuando la planta se encontraba en condiciones de FBN con su socio natural *Rhizobium* sp., en comparación con plantas fertilizadas con diferentes fuentes minerales y orgánicas de nitrógeno. En base a estos antecedentes, la **hipótesis** de trabajo sostiene que:

“En la leguminosa glicófita [*Glycine max* (L.) Merr.], tratamientos con diferentes concentraciones de NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla isosmótica, en condiciones semi-controladas de cultivo hidropónico, podrían afectar de manera diferencial el crecimiento y los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA)”.

Como una hipótesis secundaria, surgida a partir de los ensayos desarrollados en este trabajo final, se propone que:

“En la leguminosa glicófita [*Glycine max* (L.) Merr.], la obtención de nitrógeno a través de la fijación biológica en interacción con bacterias simbióticas del género *Bradyrhizobium* o la obtención del mineral a partir de una fuente inorgánica por absorción radical, podrían determinar una respuesta diferencial a la salinización por NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica, a nivel del crecimiento o de la producción endógena de ABA”.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

1-Evaluar el crecimiento y la respuesta a la salinidad, así como la producción de ácido abscísico (ABA), en plántulas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] sometidas a estrés salino por diferentes concentraciones de NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica, tanto en condiciones de fijación biológica de nitrógeno por la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*, como por la fertilización con nitrógeno mineral, a partir de un medio de cultivo hidropónico.

2.2. Objetivos específicos

1-Evaluar parámetros de crecimiento como: longitud del tallo y el peso seco aéreo y radical de plántulas de soja, mantenidas en condiciones semi-controladas de crecimiento, en cultivos hidropónicos suplementados con soluciones -0,30; -0,47 y -0,65 MPa de NaCl; concentraciones equivalentes de Na₂SO₄ y la mezcla isosmótica de ambas, tanto en simbiosis

con *Bradyrhizobium japonicum*, como en cultivos hidropónicos fertilizados con nitrógeno mineral.

2-Evaluar el estado hídrico de la planta, como peso fresco aéreo y radical, así como la producción endógena de ácido abscísico (ABA) en plántulas de soja mantenidas en condiciones semi-controladas de crecimiento, en cultivos hidropónicos suplementados con soluciones -0,30; -0,47 y -0,65 MPa de NaCl; concentraciones equivalentes de Na₂SO₄ y la mezcla isosmótica de ambas, tanto en simbiosis con *Bradyrhizobium japonicum*, como en cultivos hidropónicos fertilizados con nitrógeno mineral.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de soja del cultivar A 5901 RG (transgénica resistente 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, 2007) para la especie en cuestión.

3.2. Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*

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 Republica Argentina. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se estableció de acuerdo a las recomendaciones del SENASA para la inoculación de soja, en no menos de 80.000 rizobios viables por semilla (3.0 ml.kg^{-1} semilla) y en concordancia con las recomendaciones del marbete del producto CELLTECH® para soja de la empresa Nitragin Argentina SA.

3.3. Condiciones generales del ensayo

El ensayo se llevó a cabo 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 ($33^{\circ} 07'$ Latitud Sur, $64^{\circ} 14'$ Longitud Oeste, 421 m.s.n.m), en la campaña 2007-2008.

Seis (6) semillas de la especie, luego de ser inoculadas, fueron colocadas en soportes plásticos flexibles de 20 cm de diámetro x 20 cm de longitud, conteniendo como soporte inerte vermiculita de granulometría media, previamente esterilizada y estabilizada a pH fisiológico, según Somasegaren y Hoben (1994). A partir de la emergencia y de acuerdo al crecimiento uniforme, se raleó para permitir el establecimiento solo de tres (3) plántulas por maceta. Estas plántulas fueron: (1) inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* e irrigadas con solución nutritiva de Hoagland al 25% y sin contenido de N, o (2) fertilizadas con la misma solución, conteniendo N mineral como sales de NO_3^{-2} (Hoagland y Arnon, 1950). En todos los casos, la adición de las soluciones se realizó por vía capilar y se renovó cada 2 días hasta la finalización del ensayo.

La salinización comenzó a los 15 días después de la siembra para permitir el establecimiento de la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja y la posterior provisión de N en las condiciones de fijación biológica. La salinización, consistió en la suplementación de la solución nutritiva con NaCl para generar potenciales agua (ψ_w) de 0 (control); -0.3; -0.47 y -0.65 MPa respectivamente; (b) soluciones de similar potencial agua por la adición de Na_2SO_4

y (c) la mezclas isosmóticas de ambas sales. El esquema general de los tratamientos se resume a continuación y considera, tanto los tratamientos de inoculación o adición de soluciones minerales de nitrógeno, así como las diferentes concentraciones de sal mencionadas:

- 1-Semillas sin inocular
- 2-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109
- 3-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y salinizadas con NaCl
- 4-Semillas sin inocular y salinizadas con Na₂SO₄.
- 5-Semillas sin inocular y salinizadas con NaCl y Na₂SO₄
- 6-Semillas sin inocular y salinizadas con NaCl
- 7-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y salinizadas con Na₂SO₄
- 8-Semillas inoculadas con *B. japonicum* E109 y salinizadas con NaCl y Na₂SO₄

Cada 7 días, se consideró la evaluación del crecimiento longitudinal de la parte aérea (cm) para la construcción de la curva de crecimiento sigmoide, en todos los tratamientos. La experiencia finalizó cuando las plantas alcanzaron el estado fenológico correspondiente a R1 según la escala de desarrollo de Fehr y Caviness (1977) (comienzo de floración), en la que se evaluaron los siguientes parámetros de desarrollo: (a) longitud aérea y radical; (b) peso fresco y peso seco aéreo y radical; (c) índice de crecimiento, como la relación entre el peso radical y aéreo; (d) sistema de nodulación (número y tamaño de nódulos en raíz principal y raíces secundarias). Adicionalmente, se colectaron muestras de aproximadamente 1 g de material vegetal (PF) para la identificación y cuantificación de ácido abscísico (ABA) endógeno. Las mismas fueron congeladas en nitrógeno líquido, liofilizadas y luego almacenadas en presencia de butil-hidroxitolueno (BHT, Merck®) como antioxidante a -20°C hasta su procesamiento definitivo.

Cada tratamiento se llevó a cabo con un diseño aleatorio, tres réplicas por tratamiento y los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de Tukey *a posteriori* con $p < 0.05$.

3.4. Determinación de ABA

El material vegetal congelado y liofilizado, se homogeneizó con mortero y se resuspendió en una solución de metanol: agua (4:1, v/v) a 4°C por 24 hs. Luego el homogeneizado se filtró y se ajustó a pH 2,5 con ácido acético glacial (1%) y se adicionó 50 mg de [²H₆]-ABA como estándar interno, gentilmente provista por el Dr. J.D. Chen (USDA, Maryland, USA). Después de centrifugar y evaporar la fase metanol, se purificó la fase acuosa mediante columnas de NH₄, lavando con acetonitrilo, hexano y acetato de etilo. El

ABA retenido, se recuperó con metanol-acético (95:5, v/v) para luego ser particionado isocráticamente por HPLC-UV, mediante columna corta de C₁₈ corrida con una mezcla de solventes de metanol: agua: ácido acético (30:70:1, v/v), a 1 ml/min. Las fracciones que mostraron absorbancia a 262 nm fueron reunidas y derivatizadas (mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y sensibilidad en la detección) con diazometano etéreo y MSTFA (monosilil-trifluoroacetamida), evaporadas y retomadas con acetato de etilo (2µl) para luego ser inyectadas en un GC acoplado a un MS (espectrómetro de masas) en donde se procedió a la identificación y cuantificación de esta hormona mediante GC-SIM (monitoreo selectivo de iones). Los datos fueron expresados como ng ABA.g⁻¹ PF de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra el crecimiento sigmoideo como longitud de la parte aérea en plántulas de soja sometidas a salinidad por NaCl; Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, en sistemas de cultivo hidropónico provistos de nitrógeno a través de la inoculación con *B. japonicum* y su consecuente fijación biológica o por la fertilización con sales de nitrógeno adicionadas en la solución nutritiva.

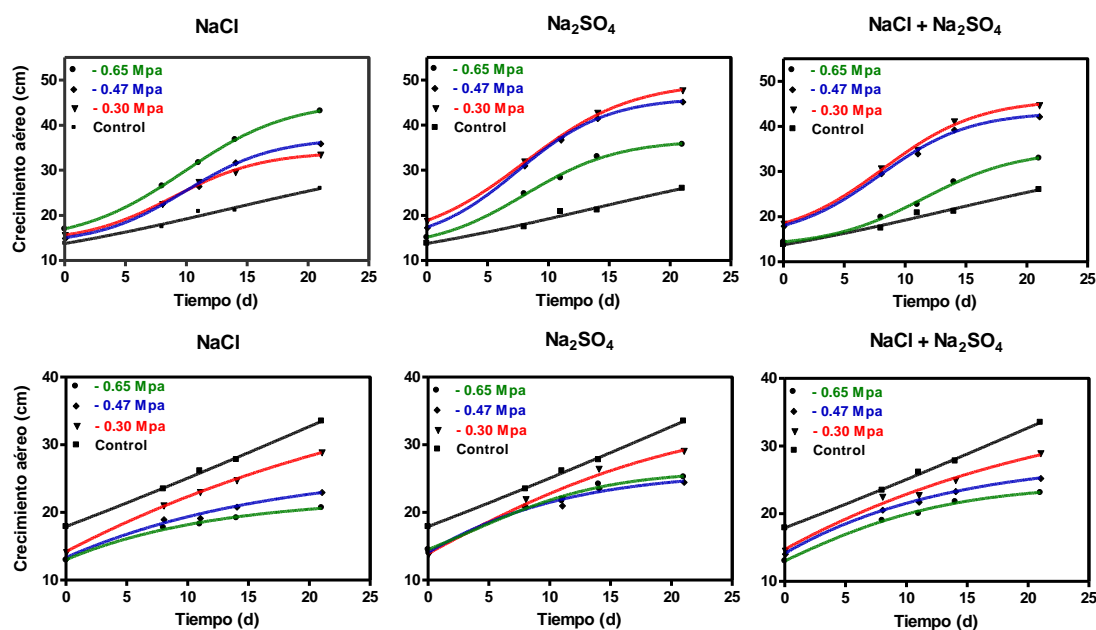
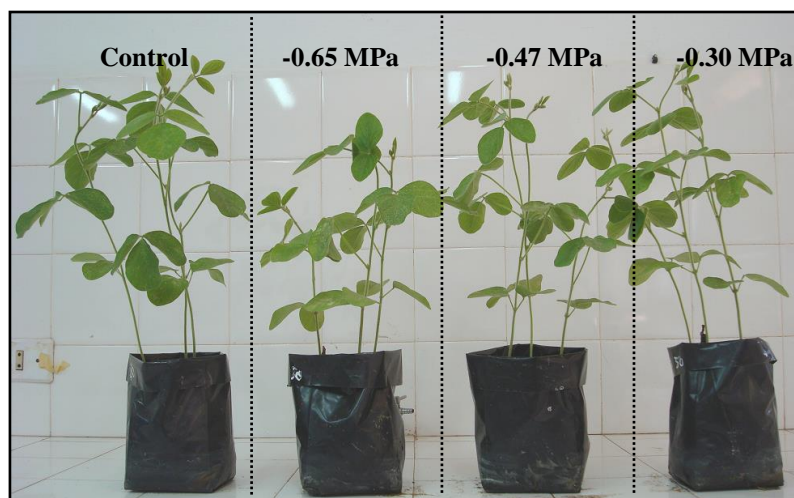


Figura 1: Crecimiento como longitud de la parte aérea en plántulas de soja cultivadas en solución nutritiva modificada por la adición de soluciones de NaCl; Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales con potenciales agua de -0.30 MPa (línea roja); -0.47 MPa (línea azul) y -0.65 MPa (línea verde). En la parte superior, se presentan las plantas fertilizadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) y en la inferior las semillas inoculadas con *B. japonicum* E109. Todos los valores fueron agrupados de acuerdo al tratamiento y ajustados con una regresión no-lineal en función del tiempo (días) para generar una curva sigmoide con $r^2 > 0.95$ de significancia.

Como se observa en la **Figura 1**, la mayor respuesta de crecimiento de la parte aérea en función del tiempo (crecimiento sigmoide), se obtuvo en aquellas plantas tratadas con la fuente mineral de nitrógeno, como solución de Hoagland y Arnon (1950). Desde el punto de vista nutricional, esto determinaría que la concentración de N aportada por la solución fue ampliamente superior a la obtenida por la planta a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN). En tal sentido, es necesario destacar que el proceso de FBN en esta especie comienza en emergencia (VE), incrementa de manera gradual desde V1 y se considera significativa en cuanto al aporte de nitrógeno, durante los estadios V2-V3.

En todos los casos de fertilización, la adición de NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica de sales, determinó una mayor respuesta de crecimiento que el control sin salinizar, por lo que se presupone que esta respuesta estuvo ligada a la condición misma de la salinización. Cuando la sal adicionada fue NaCl, la respuesta fue dependiente de la concentración del osmolito, siendo mayor el crecimiento vegetal con la mayor concentración de sal adicionada y menor el potencial agua de la misma (-0.65 MPa). En el caso del Na₂SO₄ la respuesta fue inversa y se observó un mayor crecimiento en presencia de la menor concentración y mayor potencial de la sal (-0.30 MPa). En el caso de la mezcla isosmótica de sales, la tendencia fue similar a la de las plantas tratadas con Na₂SO₄ y esto determinaría que su efecto individual sería dominante sobre el NaCl en el crecimiento de la parte aérea. En las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* la respuesta de crecimiento fue diametralmente inversa a las fertilizadas, debido a que en las inoculadas: (1) en cualquiera de los tratamientos salinizados, el crecimiento siempre fue menor al del control sin salinizar y (2) la respuesta de crecimiento fue siempre dependiente de la concentración de la sal adicionada, siendo menor cuando se adicionó la mayor concentración del osmolito o la mezcla isosmótica. El proceso de la bacterización determinó en la planta una respuesta uniforme a la concentración de sal adicionada, por lo que se presupone que la condición limitante radicaría en el componente osmótico generado por la sal. A diferencia de ello, la presencia de una fuente mineral de N determinaría una respuesta dependiente del componente iónico de la sal adicionada.

La **Fotografía 1** muestra de manera ilustrativa el crecimiento en altura, de la parte aérea de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* y tratadas con soluciones de NaCl de diferente potencial agua (ψ_w). Los valores se representan junto a los otros tratamientos en la **Figura 1**.



Fotografía 1: Efecto del tratamiento salino de plántulas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109 sobre el crecimiento de la parte aérea como altura total (cm). El orden de los tratamientos se resume a continuación de izquierda a derecha: Control; soluciones -0.65 MPa; -0.47 MPa; -0.30 MPa de NaCl.

Debido a que no se registran publicaciones específicas para la especie en estudio y considerando otros modelos experimentales en los que se evaluó de manera similar este parámetro, podemos mencionar que Krček *et al.* (2008) muestran que el crecimiento en no-leguminosas, como la cebada (*Hordeum vulgare* L.) sometida a condiciones de estrés hídrico es significativamente superior cuando se adiciona al medio una fuente mineral nitrogenada. Desde esta aproximación podríamos suponer que en una leguminosa, la condición de ausencia de nitrógeno o presencia del mismo de origen mineral (fertilización) o microbiano (FBN) podría determinar una respuesta diferencial de crecimiento en condiciones de salinidad.

La **Figura 2** muestra el crecimiento como peso fresco aéreo (g) de las plántulas de soja fertilizadas por la adición de nitrógeno mineral en la solución de Hoagland (25%) o inoculadas con *B. japonicum* con la consecuente obtención de nitrógeno por FBN.

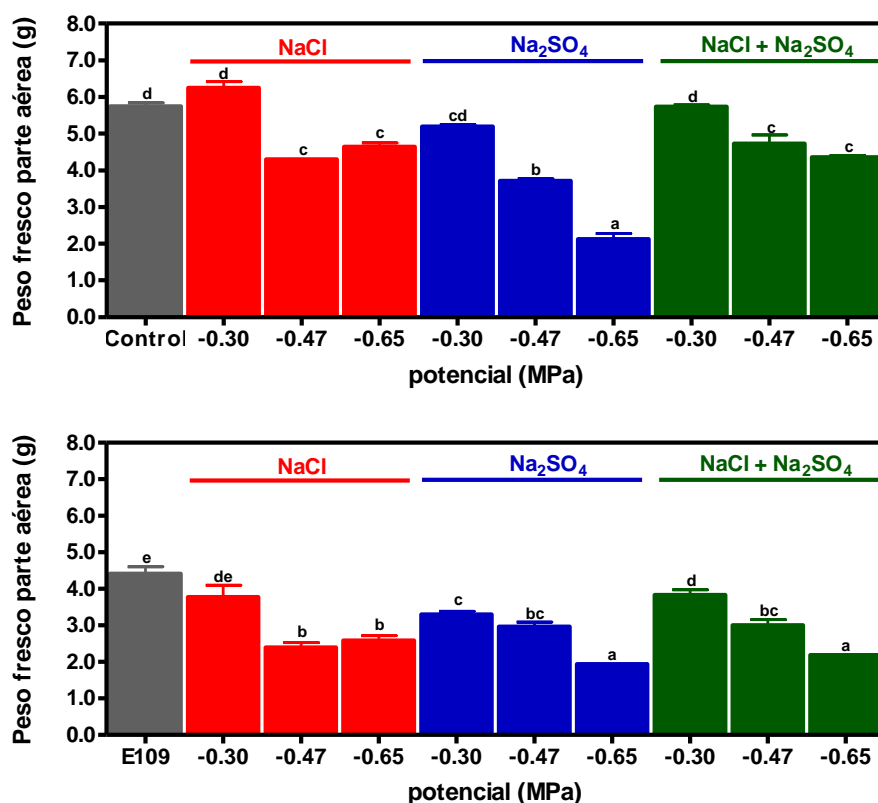


Figura 2: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el crecimiento como peso fresco de la parte aérea (g). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) donde Control (barra gris) no fue salinizado. En la parte inferior se presentan semillas inoculadas con *Bj* cepa E109 (barra gris). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Desde el punto de vista fisiológico, es necesario destacar que si bien la determinación de crecimiento como peso fresco (PF) es inadecuada como una medida del desarrollo de la planta, en condiciones de estrés salino, puede ser un indicador indirecto del estado hídrico de la misma y por eso fue considerado para este trabajo. Así, como podemos observar en la **Figura 2** el mayor peso fresco aéreo (PFA), fue obtenido en las plantas fertilizadas, en comparación con aquellas inoculadas con *B. japonicum* y esto adicionalmente se correlacionó con la mayor disponibilidad de N y la mayor producción de biomasa aérea de estas plantas, así como de la consecuente mayor captación de agua a nivel radical.

Particularmente, para los tratamientos fertilizados, se observó de manera sostenida un mayor peso fresco en las menores concentraciones y mayores potencial agua (-0.30 MPa), en comparación a los tratamientos de mayor concentración y menor potencial (-0.47 y -0.65 MPa). En el caso del NaCl o de la mezcla isosmótica de sales no hubo diferencias entre las plantas tratadas con soluciones de -0.47 y -0.65 MPa, mientras que en el caso del Na₂SO₄ la diferencia fue dependiente de la concentración del osmolito. Para todas las concentraciones utilizadas, los tratamientos con Na₂SO₄ presentaron un menor PFA que aquellos obtenidos en la mezcla isosmótica, de comportamiento intermedio o del NaCl de comportamiento superior. Este patrón parece determinar una mayor inhibición generada por el Na₂SO₄, que sería parcialmente revertida por la adición de NaCl. Similares resultados fueron obtenidos en nuestro laboratorio para la misma especie vegetal por Ramadú *et al.* (2007) en estadios tempranos del crecimiento y en la leguminosa halófito *Prosopis strombulifera* por Sosa *et al.* (2005) y Reginato (2003) en diferentes estadios fenológicos.

Se han informado resultados opuestos, aunque escasos, en otras especies halófitas cuyo crecimiento ha sido estimulado por la presencia de sales de sulfato, tal como en el género *Atriplex* (Ramos *et al.*, 2004). Estos resultados serían de gran importancia debido a que existe poca información bibliográfica referida a la toxicidad relativa de sales distintas al NaCl en suelos salinos de nuestro país.

En el caso de los tratamientos inoculados con *B. japonicum* se comprobó una respuesta de crecimiento similar a la de las plantas tratadas con la solución mineral de N; sin embargo, en las soluciones de -0.30 y -0.47 MPa no se comprobó una diferencia significativa entre cada sal y la mezcla isosmótica de ambas. En tal sentido, para la solución de -0.47 MPa, el tratamiento que presentó mayor inhibición al crecimiento fue el de las plantas tratadas con NaCl, mientras que con -0.65 MPa, la menor respuesta correspondió tanto al Na₂SO₄, como a la mezcla isosmótica de ambas sales. Esta respuesta parecería indicar que la inhibición generada por la presencia de Na₂SO₄ en las plantas fertilizadas, sería parcialmente revertida por la FBN.

La **Figura 3** muestra el crecimiento como peso fresco radical (g) de plántulas de soja fertilizadas por la adición de solución de Hoagland (25%) o inoculadas con *B. japonicum*.

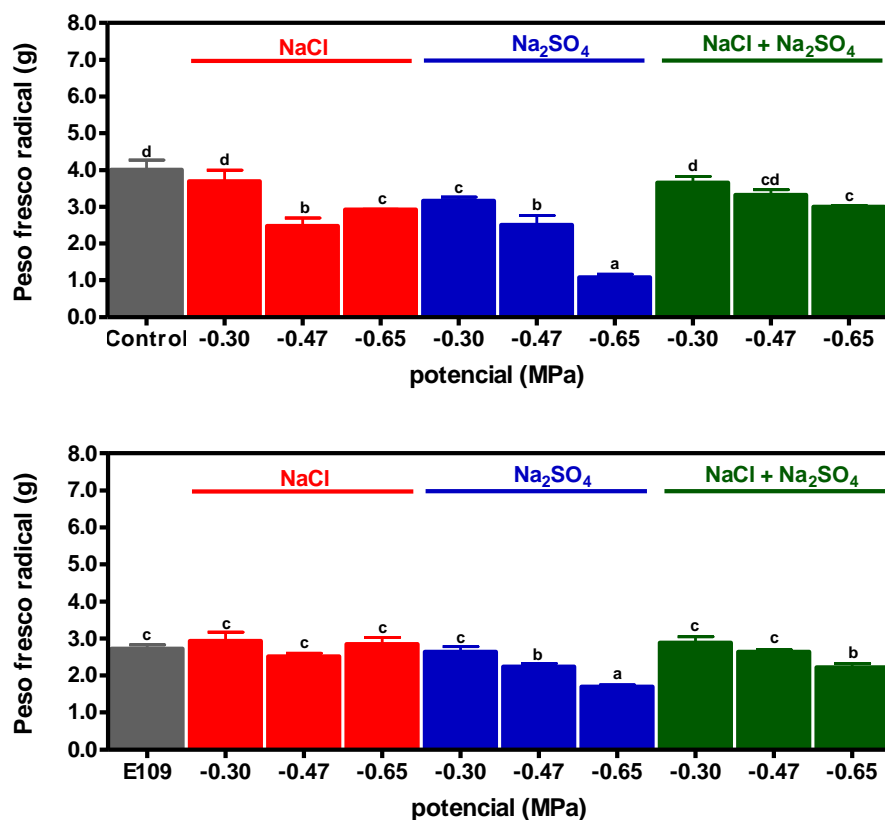


Figura 3: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el peso fresco radical (g). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) donde Control (barra gris) no fue salinizado. En la parte inferior se presentan las semillas inoculadas con *B. japonicum* cepa E109 (barra gris). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Como podemos observar en la **Figura 3** el mayor crecimiento, como peso fresco radical (PFR), fue obtenido en aquellas plantas fertilizadas, en comparación con las inoculadas con *B. japonicum*. En los tratamientos fertilizados, se observó de manera diferencial una mayor respuesta como peso fresco en las soluciones de -0.30 MPa para NaCl; sin embargo, en presencia de Na₂SO₄ y la mezcla isosmótica de sales este comportamiento se extendió a la solución de -0.47 MPa. En el caso del NaCl y de la mezcla isosmótica de sales, no hubo diferencias entre las plantas tratadas con soluciones de -0.47 y -0.65 MPa y ambas presentaron menor PF; mientras que en el caso del Na₂SO₄, la diferencia fue significativa en la mayor concentración del osmolito. Adicionalmente, esta sal mostró menor acumulación de material fresco (agua) que en las plantas tratadas con NaCl o la mezcla

isomónica, donde particularmente existió un efecto de reversión de la condición, con el consecuente aumento del peso fresco.

Con estos resultados y a diferencia de lo observado a nivel aéreo, el Na_2SO_4 parece ejercer su mayor efecto a nivel radical y solo en altas concentraciones. En el caso de los tratamientos inoculados con *B. japonicum* se comprobó una respuesta similar a la de las plantas tratadas con la solución mineral de N; sin embargo, en las soluciones de -0.30 y -0.47 MPa no se determinó una diferencia significativa entre cada sal y la mezcla isomónica. En la solución de -0.65 MPa, el tratamiento que presentó mayor peso fresco, fue el de las plantas tratadas con NaCl y con la mezcla isomónica de sales y esta respuesta parecería indicar que la menor acumulación de material fresco o agua generada a nivel radical por la presencia de Na_2SO_4 en plantas inoculadas, no podría ser revertida a través de la presencia del microorganismo en altas concentraciones del osmolito.

De manera general y en referencia al estado hídrico de la planta, estimado indirectamente como peso fresco (PF), podemos decir que ambas fracciones vegetales fueron mayormente afectadas por la presencia de Na_2SO_4 en comparación a NaCl y que este efecto fue parcialmente revertido por la adición de la mezcla isomónica de ambas. De acuerdo con Shannon *et al.* (1999) una parte del efecto de inhibición observado por la adición de cualquiera de estas sales se debería al componente osmótico de las mismas, responsables de reducir la tasa de crecimiento, principalmente en los estados de germinación y desarrollo temprano; sin embargo un efecto adicional de origen iónico, pudo ser el responsable de la mayor inhibición, solo observada en presencia de Na_2SO_4 . Este fenómeno ha sido previamente descrito por otros autores. Lone (1988) determinó la mayor toxicidad del ión SO_4^{2-} a nivel del crecimiento y desarrollo de embriones de cebada; Bie *et al.* (2004) determinaron que el Na_2SO_4 podía disminuir y afectar considerablemente el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.); Shi y Sheng (2005) determinaron una respuesta similar en girasol (*Helianthus annuus* L.) y Reinoso *et al.* (2004) demostraron una notable tolerancia a NaCl pero no a la misma concentración de Na_2SO_4 en *Prosopis strombulifera*.

La **Figura 4** muestra la relación del peso fresco radical y aéreo (IC-R.PA⁻¹) de plántulas de soja sometidas a salinidad y en sistemas de cultivo hidropónico.

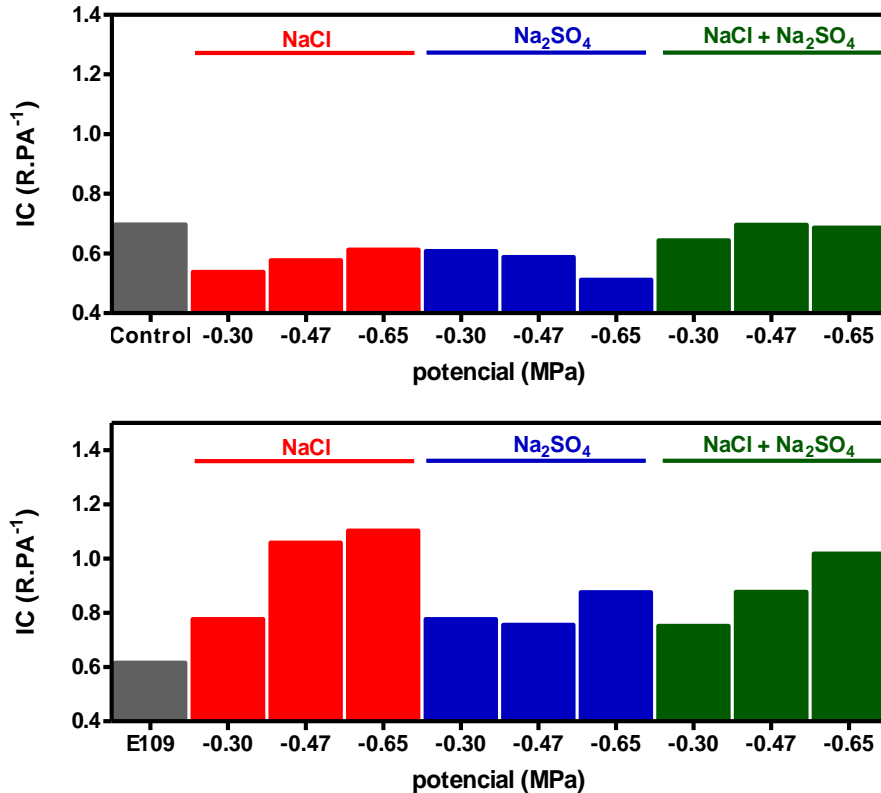


Figura 4: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre la relación de peso fresco radical y aéreo (R.PA⁻¹). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) donde Control (barra gris) no fue salinizado. En la parte inferior se presentan las semillas inoculadas con *Bj* cepa E109 (barra gris).

Desde el punto de vista fisiológico, la relación de peso fresco de la raíz sobre la parte aérea (IC-R.PA⁻¹) determinaría la tendencia de acumulación de agua hacia la fracción aérea o radical de una planta. Así, como podemos observar en la **Figura 4**, este parámetro fue mayor en los tratamientos inoculados, en comparación con los fertilizados. Esta diferencia, nos podría indicar que el aumento del contenido hídrico de cada fracción fue direccionado hacia la raíz, en detrimento de la parte aérea. Desde el punto de vista microbiológico, resultados previos muestran la capacidad de bacterias del género *B. japonicum* de promover el crecimiento y la acumulación de agua temprana en plántulas de maíz y soja (Cassán *et al.* 2009) y que parte de este efecto se debería a la capacidad del microorganismo de producir compuestos del tipo fitohormonas (Boiero *et al.*, 2006), tal como las auxinas (AIA) o citocininas (Z), con una fuerte respuesta a nivel del desarrollo radical y la consecuente incorporación de iones y agua en tales órganos. En las plantas fertilizadas, los tratamientos con NaCl o Na₂SO₄ en todas las concentraciones evaluadas, determinaron una tendencia de acumulación a nivel radical, menor al control sin salinizar; sin embargo, esta tendencia fue

revertida por la mezcla isosmótica de sales, en la que se determinó un comportamiento similar al control, sobre todo en las soluciones de -0.47 y -0.65 MPa. En las plántulas tratadas con NaCl, el aumento de la concentración salina determinó una tendencia de acumulación direccionada hacia la raíz; mientras que en las plantas tratadas con Na₂SO₄ esta tendencia fue revertida, indicando una relación favorable al crecimiento aéreo. En las plantas inoculadas, podemos observar que el control sin salinizar tuvo el menor índice de crecimiento de todos los tratamientos, en los que el crecimiento radical fue estimulado casi de manera general. En el caso del NaCl, se observó una respuesta relacionada con la concentración del osmolito y este patrón se repitió en las plantas tratadas con la mezcla isosmótica de sales. En el caso del Na₂SO₄, el índice de crecimiento, sólo se diferenció en -0.65 MPa por lo que se supone que el aumento de la relación de crecimiento radical sólo fue direccionada en altas concentraciones de la sal.

La **Figura 5** muestra el crecimiento como peso seco aéreo (PSA) de plántulas de soja fertilizadas con la adición de nitrógeno mineral en la solución de Hoagland (25%) o inoculadas con *B. japonicum*.

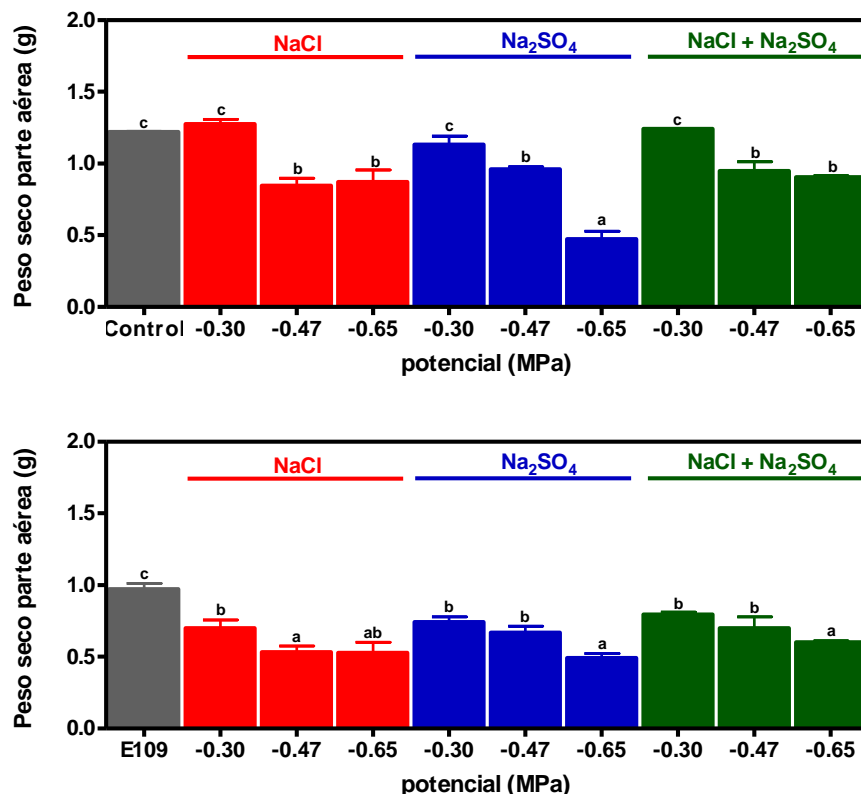


Figura 5: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el crecimiento como peso seco de la parte aérea (g). En la parte superior, las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950). En la parte inferior, semillas inoculadas con *Bj* cepa E109 (barra gris). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Desde el punto de vista fisiológico, consideraremos el crecimiento en peso seco (PS), como el resultado de la producción de biomasa por parte de la planta para cada una de las fracciones evaluadas, aérea (PSA) y radical (PSR). Como se observa en la **Figura 5**, la mayor respuesta de crecimiento de la parte aérea se obtuvo en las plantas tratadas con la fuente de N mineral, por lo que la concentración del elemento aportada por la solución nutritiva, fue ampliamente superior a la obtenida por la planta a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Como se mencionó previamente, es necesario destacar que el proceso de FBN en esta especie tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa a partir de los estadios V2-V3, por lo que existió una ventaja nutricional en los tratamientos fertilizados.

Desde la perspectiva de la respuesta vegetal a la salinización, podemos decir que en ambas condiciones de captación de nitrógeno (fertilización e inoculación), cuanto mayor fue la concentración de sal adicionada (independientemente de la sal), menor fue el peso seco de la parte aérea. En las plantas fertilizadas, los tratamientos de -0.30 MPa de cada sal adicionada de manera independiente o de la mezcla isosmótica de ambas, determinaron una respuesta similar al control sin salinizar y no se observaron diferencias significativas entre ellos. Un patrón similar fue observado en -0.47 MPa pero con una menor respuesta comparado con el control sin salinizar. Sólo en la concentración de -0.65 MPa, las plantas tratadas con Na₂SO₄ mostraron una fuerte inhibición de la producción de biomasa, por lo que nuevamente comprobamos la mayor toxicidad de esta sal sobre el NaCl y la capacidad de revertir esta condición en la mezcla isosmótica de ambas sales. Fisiológicamente, esta respuesta podría explicarse desde la existencia de un proceso de antagonismo iónico a nivel de los transportadores de membrana, tal como propone Sosa *et al.* (2005). Adicionalmente, podría correlacionarse con la síntesis de compuestos orgánicos osmo-compatibles, tal como prolina, pinitol, sorbitol, etc., tal como propone Llanes *et al.* (2006). En el caso de los tratamientos inoculados, se comprobó una respuesta de crecimiento similar a la de las plantas fertilizadas pero en todos los casos, inferior al control sin salinizar. En las plantas tratadas con NaCl, la inhibición fue significativa para los tratamientos de mayor concentración (-0.47 y -0.65 MPa); mientras que en las plantas tratadas con Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica este comportamiento solo se restringió a las mayores concentraciones adicionadas (-0.65 MPa). Desde el punto de vista comparativo y a diferencia de lo observado en las plantas fertilizadas, no se comprobó un efecto de mayor toxicidad para el Na₂SO₄ en ninguna de las concentraciones evaluadas, por lo que se podría suponer que la estrategia de tolerancia a esta sal sería diferencial, de acuerdo a la fuente de N. En tal sentido, Cordovilla *et al.* (1999) propusieron que la asimilación de amonio de las enzimas el nódulo de poroto (*Vicia faba* L.) parece ser diferencial en condiciones de salinidad, poniendo de manifiesto que la glutamina

La sintetasa sería más tolerante a salinidad que la glutamato sintasa y con ella la asimilación de amonio en esta estructura. En otros trabajos, Han y Lee (2005), probaron que la co-inoculación de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y una rizobacteria promotora del crecimiento del género *Bacillus* aumentaban la tolerancia, vía un aumento de la actividad antioxidante de plántulas de soja sometidas a estrés salino por NaCl. Similares resultados fueron informados por Ramadú *et al.* (2007) en sistemas de co-inoculación de soja con *Azospirillum brasilense* Az39 y en plántulas de maíz inoculadas con la misma cepa PGPR en condiciones de estrés salino generadas por NaCl o Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales (Calcagno *et al.*, 2007). Finalmente, Lodeiro *et al.* (2000) lograron probar que el estrés hídrico en poroto era mitigado de manera más eficiente cuando la planta se encontraba en condiciones de FBN con su socio natural *Rhizobium* sp., en comparación con plantas fertilizadas con diferentes fuentes minerales y orgánicas de nitrógeno.

La **Figura 6** muestra el crecimiento como peso seco radical (PSR) de plántulas de soja fertilizadas o inoculadas con *B. japonicum*.

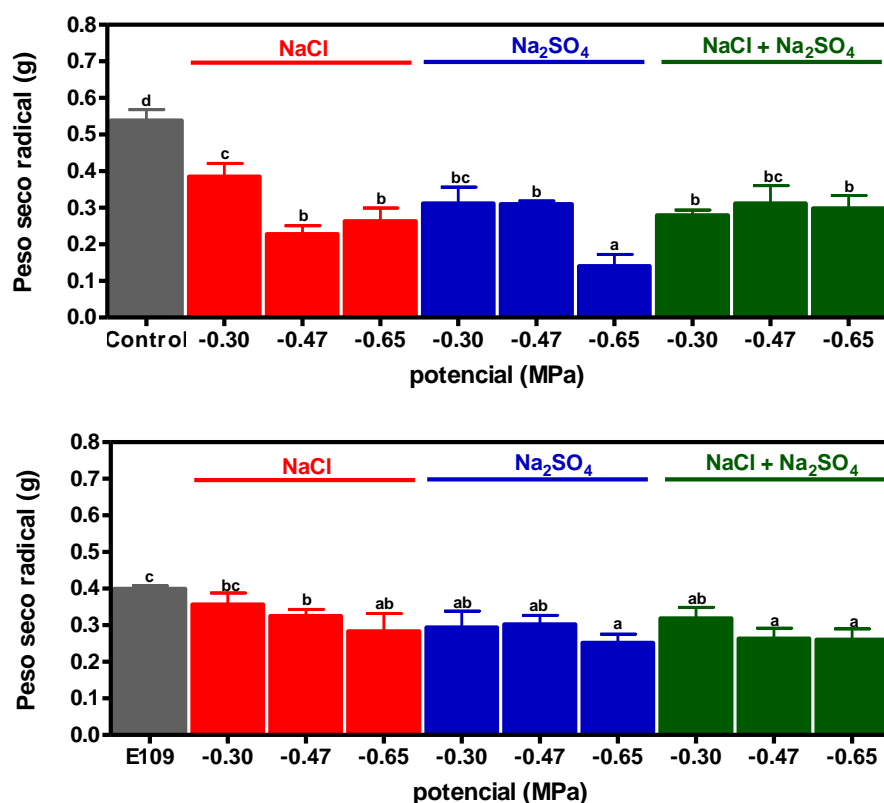


Figura 6: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el crecimiento como peso seco radical (g). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) donde el Control (barra gris) no fue salinizado. En la parte inferior se presentan las semillas inoculadas con *Bj* cepa E109 (barra gris). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Como se observa en la **Figura 6**, no se determinaron diferencias significativas de peso seco de la raíz (PSR), entre plantas fertilizadas e inoculadas, con excepción de los tratamientos control para los que la producción de biomasa fue superior en el fertilizado. En el caso de de la mezcla isosmótica de sales, no se determinaron diferencias significativas entre cada una de las concentraciones adicionadas (-0.30; -0.47 y -0.65 MPa); mientras que en las plantas tratadas con NaCl, sólo en soluciones de potencial agua menor a -0.30 MPa se determinó una inhibición relativa del crecimiento y aquellas tratadas con Na₂SO₄ solo fue observada en soluciones de -0.47 y -0.65 MPa. Desde el punto de vista comparativo, el tratamiento con mayor concentración de Na₂SO₄ en plantas sin inocular, fue el más inhibitorio para el desarrollo de la raíz, como se comprobó previamente sobre otros parámetros de crecimiento. En el caso de las plantas inoculadas con *B. japonicum*, la producción de biomasa radical en condiciones de salinidad de manera independiente al tratamiento y a la concentración de sal adicionada, se mantuvo en proporciones similares al control.

La **Figura 7** muestra el índice de crecimiento en base al peso seco (R.PA⁻¹) de las plántulas de soja fertilizadas e inoculadas con *B. japonicum*.

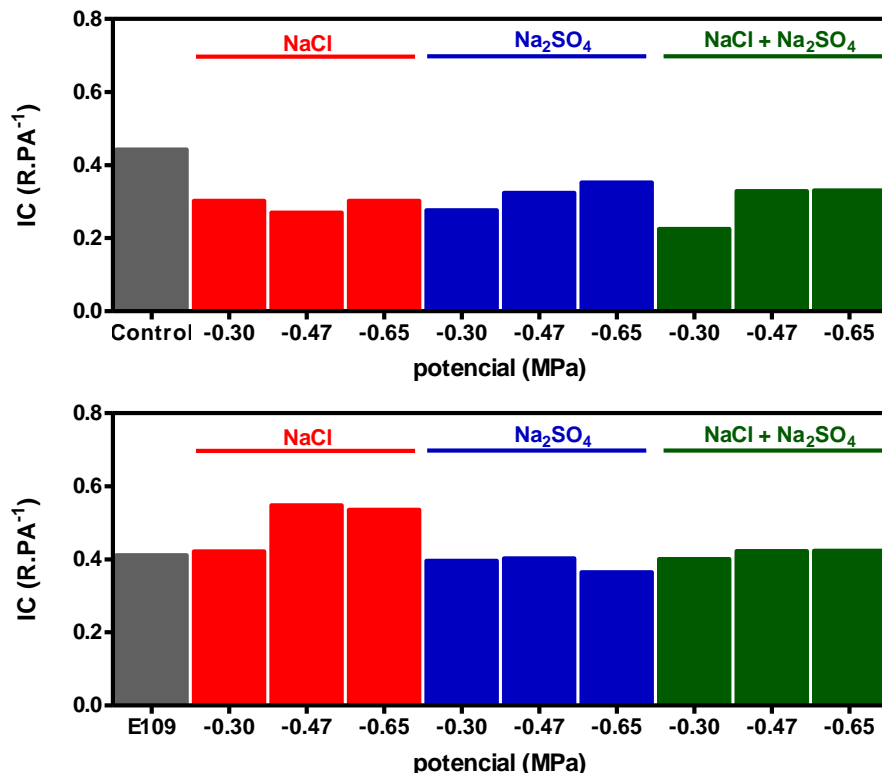


Figura 7: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el índice de crecimiento evaluado como peso seco (R.PA⁻¹). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950). Control (barra

gris). En la parte inferior se presentan las semillas inoculadas con la cepa E109 (barra gris). Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Desde el punto de vista fisiológico, el índice de crecimiento de la raíz sobre la parte aérea ($IC-R.PA^{-1}$) determina la tendencia de crecimiento hacia la fracción aérea o radical de una planta. Como el parámetro fue generado en base al peso seco, que indirectamente relaciona la producción de biomasa, lo que se determina con esta relación es la fracción de la planta con mayor respuesta de crecimiento a partir de la presencia de un elemento limitante como el N, tanto por fertilización mineral como biológica. Como se observa en la **Figura 7**, los tratamientos fertilizados poseen un menor índice de crecimiento con respecto al control, por lo que la producción de biomasa aérea en las plantas fertilizadas parece ser superior que en las inoculadas. En el caso de las plantas fertilizadas, la relación de crecimiento radical fue superior a -0.30 MPa cuando se adicionó cada sal de manera independiente, observándose una respuesta menor en el tratamiento con la mezcla isosmótica de ambas. En el caso de la adición de -0.47 y -0.65 MPa de Na_2SO_4 la relación de crecimiento radical fue mayor que en las plantas tratadas con NaCl en las mismas concentraciones y particularmente en el caso del Na_2SO_4 pareció estar relacionada con la concentración del osmolito. En el caso de las plantas inoculadas, la respuesta fue similar al control no salinizado para la mayoría de los tratamientos, determinando la ausencia del efecto de salinidad. Sólo en las plantas tratadas con NaCl en soluciones de -0.47 y -0.65 MPa se determinó una tendencia de aumento de la relación a favor del crecimiento de la raíz con respecto a la parte aérea. Estos resultados, permitirían evidenciar que la obtención de N a través de la FBN determinaría de manera diferencial la acumulación biomasa en la planta salinizada, en la que se obtiene un comportamiento similar al control. Por otro lado, sería necesario destacar que para probar de manera inequívoca esta hipótesis, sería necesario establecer una dosis de fertilización que aporte una cantidad de N mineral equivalente a la obtenida por la inoculación. Este aspecto no ha sido considerado hasta el momento en la mayoría de los trabajos en leguminosas en condiciones de estrés salino, en los que de manera generalizada se han utilizado soluciones minerales con una cantidad de N ampliamente superior a la que la planta podría obtener (luego de 21-28 días), a través de la FBN.

La **Figura 8** muestra el sistema de nodulación, como la cantidad nódulos en raíz principal (PNRP) y de nódulos por planta (PNP) de los tratamientos inoculados con la bacteria simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*.

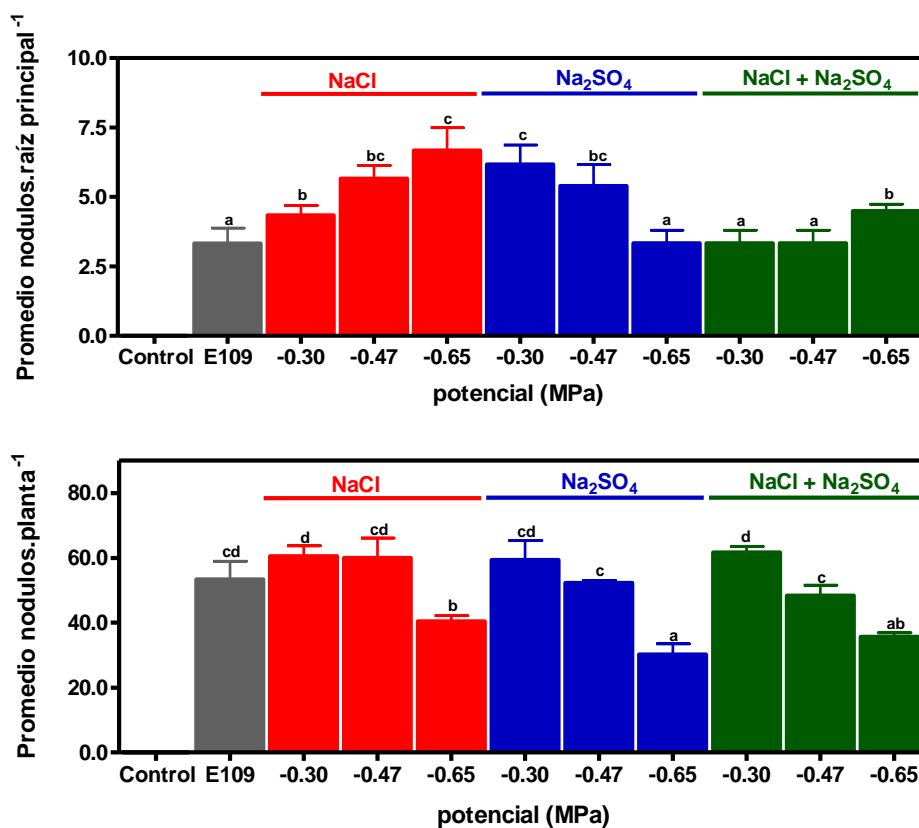


Figura 8: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares potenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), sobre el establecimiento de la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja. En la parte superior, se presenta el promedio de nódulos obtenidos en raíz principal. En la parte inferior se presenta el promedio de nódulos obtenidos por planta. Tratamiento Control: plantas no inoculadas y no salinizadas; Tratamiento E109 (barra gris): plantas inoculadas con *B. japonicum* E109 sin salinizar. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tuckey $p < 0.05$).

Se puede observar en la **Figura 8**, las plantas que no fueron inoculadas (control), no presentaron formación de nódulos en el sistema radical. Por el contrario, todas las plantas que fueron inoculadas con *B. japonicum* cepa E109 presentaron estas estructuras en la raíz. De manera comparativa, podemos observar que las plantas tratadas con NaCl presentaron una tendencia de aumento en el promedio de nódulos en la raíz principal (PNRP) con el aumento de la concentración de la sal, que solo fue significativa entre -0.30 y -0.65 MPa. De manera opuesta, el aumento de la concentración de Na₂SO₄ determinó una disminución solo significativa entre -0.30 y -0.65 MPa. En el caso de la mezcla de sales, la respuesta fue similar al control inoculado sin salinizar en todas las concentraciones. La importancia de considerar la evaluación de nódulos en la raíz principal se basa en el hecho de que la mayor fijación de N de una planta colonizada, ocurre en los nódulos establecidos en esta estructura

(Burton *et al.*, 1972). A nivel del promedio de nódulos por planta (PNP), que determina la capacidad de la planta de establecer en mayor o menor cantidad la relación simbiótica con el microorganismo, podemos decir que en el caso de la salinización con NaCl o Na₂SO₄ se determinó una respuesta significativa inferior al control inoculado y no salinizado (E109), sólo para la mayor concentración de sal adicionada en la solución nutritiva (-0.65 MPa). Resultados contrastantes fueron obtenidos en *Lotus glaber* en la que se determinó que la nodulación (tanto en número y ubicación de nódulos), así como la FBN (actividad nitrogenada) eran significativamente inhibidas por concentraciones crecientes de NaCl en cultivo hidropónico (Cassán *et al.*, 2006). Cabe destacar que la principal diferencia de este trabajo, fue que la salinización fue impuesta desde el comienzo de ensayo. En tal sentido, Gonzalez *et al.* (2001) han propuesto que la fijación y metabolismo de nitrógeno en nódulos de leguminosas sometidas a condiciones ambientales limitantes como la sequía, salinidad, oscuridad, baja temperatura y disponibilidad de nitrato estarían seriamente comprometidas. Por otro lado, Balasubramanian y Sinha (1976) sugieren que el total de nódulos, peso y contenido de nitrógeno por planta de caupí y frijol disminuyen debido a la salinización interfiriendo sólo con el inicio de la ontogenia de estos órganos, pero no con su futuro desarrollo. En tal sentido, cabe destacar que en estos ensayos, la salinización comenzó luego de 15 días de la emergencia de las plantas, por lo que el establecimiento de los sistemas de nodulación tuvo un estado avanzado en su ontogenia y la evaluación sólo consideró las modificaciones generadas en el desarrollo funcional de estas estructuras a nivel de la FBN. En tal sentido, Singleton y Ben Bohlool (1984) probaron que en *Glycine max* (L.) Merr., la aplicación retardada de NaCl, provocaba un aumento en el número y peso de nódulos, así como de la FBN y propusieron que la iniciación del nódulo es extremadamente sensible, incluso a bajas concentraciones de NaCl y que la sensibilidad no está relacionada con la supervivencia microbiana o a su capacidad de infección o posterior fijación de nitrógeno. En este trabajo, el mayor establecimiento de nódulos en tratamientos salinizados podría relacionarse con un mecanismo compensatorio para sostener la misma fijación biológica, por un aumento del número de nódulos en condiciones restrictivas.

La **Figura 9** muestra la respuesta vegetal a la salinización, como producción de ácido abscísico (ABA) (ng.g⁻¹ PF) en plántulas de soja fertilizadas e inoculadas.

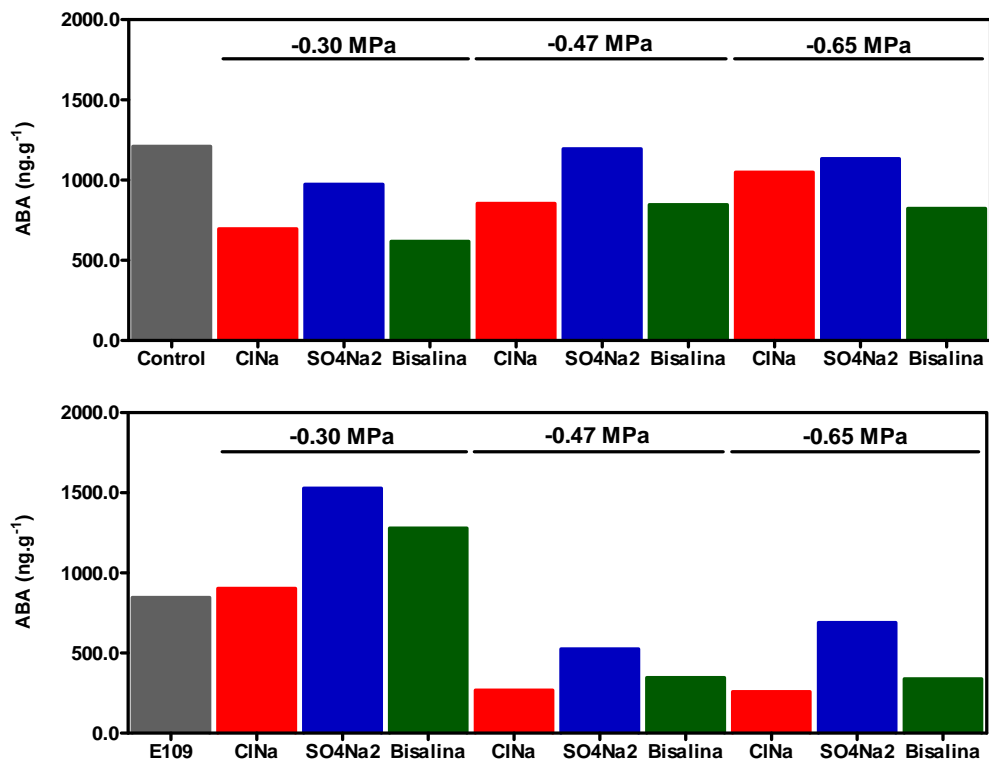


Figura 9: Efecto de soluciones de ψ_w -0.30 MPa; -0.47 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), similares portenciales de Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes), a nivel de la producción de ácido abscísico (ABA) (ng.g⁻¹ PF). En la parte superior, se presentan las plantas tratadas con solución completa de Hoagland y Arnon (1950) donde Control (barra gris) no fue salinizado. En la parte inferior se presentan las semillas inoculadas con *B. japonicum* cepa E109 (barra gris).

La **Fotografía 2** presenta el estado general de las plantas de soja de todos los tratamientos al momento de la finalización del ensayo.



Fotografía 2: En la fotografía se observa el estado fenológico de las plantas de todos los tratamientos al momento de la finalización del ensayo, en el que se tomó la muestra correspondiente a la determinación de la hormona ABA.

Como se observa en la **Figura 9**, en las plantas fertilizadas y tratadas con concentraciones crecientes de NaCl, se determinó una producción de ABA proporcional a la concentración de la sal adicionada en el medio de cultivo. Desde el punto de vista fisiológico, podemos mencionar que los niveles de esta hormona incrementan como resultado de una condición de estrés hídrico, jugando un papel clave en la respuesta vegetal a distintos tipos de estrés, tal como sequía, salinidad o frío, condiciones que en sí, involucran una condición de estrés hídrico celular. Considerando que los niveles endógenos de ABA incrementan en los tejidos sometidos a estrés salino (Mohapatra *et al.*, 1988), esta molécula se presenta como un intermediario de los procesos fisiológicos desarrollados en la planta en respuesta a esta condición desfavorable y como tal puede ser considerado un marcador de la respuesta vegetal a esta condición.

Con respecto al tratamiento de las plantas con Na₂SO₄ podemos mencionar que la producción de la hormona, independientemente de la concentración, siempre fue mayor que en los tratamientos salinizados con NaCl o la mezcla isosmótica de sales, determinando con mayor grado de aproximación, que el componente iónico de esta sal generó una mayor respuesta por parte de la planta, como ng de ABA.g⁻¹ PF y que esta respuesta se mantuvo constante en -0.47 y -0.65 MPa de sal. Por otro lado, en los tratamientos con la mezcla isosmótica se observó una menor respuesta al estrés que por la adición de cada sal de manera individual y en el caso de los tratamientos con Na₂SO₄ esta respuesta podría considerarse una reversión a su toxicidad. Resultados similares a nivel de la producción de este regulador del crecimiento han sido descritos por Llanes *et al.* (2007) para la leguminosa halófila *P. strombulifera*.

En el caso de las plantas inoculadas, se determinó patrón de producción similar al de las plantas fertilizadas y la presencia de Na₂SO₄ aumentó comparativamente el contenido de la hormona, con respecto a las plantas tratadas con NaCl o con la mezcla isosmótica de ambas. En las mayores concentraciones de cada sal (-0.47 y -0.65 MPa), la producción de ABA fue ampliamente inferior en aquellas plantas inoculadas en comparación a las fertilizadas y esto quizás se debería a que en la planta inoculada se realizó un uso más eficiente de las fuentes nitrogenadas en relación con la respuesta al estrés salino. De igual manera, a nivel de los controles sin salinizar de ambos tratamientos (fertilizados e inoculados), el correspondiente al tratamiento inoculado determinó una menor producción de la hormona. Esto nos indica que el método hidropónico utilizado para el crecimiento de soja (la especie vegetal en evaluación), es generador *per se* de una condición de estrés y que en el caso de la inoculación es relativamente minimizada por la presencia de la bacteria. De manera sorpresiva, la producción de ABA fue muy alta, comparada con los controles sin inocular, en los tratamientos inoculados y con la menor concentración de sales adicionadas (-0.3 MPa), lo que parece tener relación con una señal de activación radical en presencia de

bajas concentraciones de cada osmolito o una condición de sub-óptima de estrés. Un modelo similar ha sido propuesto en ciertos cultivos para el estrés hídrico por Davies *et al.* (2005) en el que la señalización por ABA puede ser intensificada por la aplicación de una técnica de irrigación denominada secado parcial de la raíz (del inglés, PRD o parcial root drying).

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que:

1. La salinización con NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de sales, afectó de manera diferencial los parámetros de crecimiento, estado hídrico, así como la respuesta al estrés abiótico de las plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* o fertilizadas con N mineral.
2. Nuestros resultados permiten diferenciar el comportamiento osmótico del iónico de cada una de las sales, siendo el Na₂SO₄ el de mayor toxicidad para la especie y la concentración de -0.65 MPa la de mayor efecto osmótico en todos los tratamientos.
3. En el caso de las plantas inoculadas, se determinó una respuesta superior a nivel de la acumulación de agua como peso fresco aéreo y radical e inferior a nivel de la producción de ABA y biomasa de ambas fracciones vegetales. En el caso de la biosíntesis de ABA, determinaríamos que las plantas inoculadas con *B. japonicum* tuvieron menor estrés que aquellas fertilizadas. En el caso de la producción de biomasa, esto indicaría que la cantidad de nitrógeno aportado a través de la fertilización química, estuvo por encima del generado por el aporte biológico de la simbiosis.

Los resultados obtenidos en el ensayo en condiciones semi-controladas de cultivo hidropónico, permiten aceptar la hipótesis planteada, y proponer la utilización de la bacteria del género *Bradyrhizobium*, como una alternativa potencialmente funcional en condiciones de campo (luego de nuevos ensayos que validen estos resultados en tales condiciones) y en consecuencia moderar el efecto de las sales NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla isosmótica, en comparación con la obtención del mineral a partir de una fuente inorgánica por absorción radical, por lo que se concluye que la simbiosis con la bacteria podría mejorar la respuesta vegetal al estrés salino y así sostener una condición de crecimiento similar a la de las plantas sin salinizar.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ARGENBIO, 2009. Cuadernillo N° 81. El centro de origen de los cultivos. En: http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_81.asp?cuaderno=81. Fecha de consulta: 31/08/2009.
- AV NATURAL, 2009. Origen e historia de la soja. En: <http://www.avnatural.com/art/10/origen-e-historia-soja>. Fecha de consulta: 31/08/2009.
- AZHAR NAEEM, M. y R. QURESHI. 2005. Rice growth and ionic composition under saline hydroponic conditions: II. Supplemented with Cl⁻: SO₄²⁻ ratios. **Pak. J. Agri. Sci.**, 42 (1-2).
- BALASUMBRAMANIAN, V. y SK. SINHA 1976 Effects of salt stress on growth, nodulation, and nitrogen fixation in cowpea and mung bean. **Plant Physiol** 36: 197-200.
- BIE, Z., T. ITO y Y. SHINOHARA. 2004. Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas exchange and mineral composition of lettuce. **Scientia Horticulturae** 99: 215–224.
- BRAY, E. 1997. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science** 2: 48-54.
- BOIERO, L., D. PERRIG, O. MASCIARELLI, C. PENNA, F. CASSAN y V. LUNA. 2006. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74 (4): 874-880.
- BURTON, J., C. MARTINEZ y R. CURLEY 1972. Methods of testing and suggested standards for legume inoculants and pre-inoculated seed. **Nitragin Corporation**. USA.
- CALCAGNO, M., D. MOLINA, F. CASSÁN y V. LUNA. 2007. Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a salinidad por NaCl y Na₂SO₄, mediada por la inoculación con PGPRs o la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA). **VI REBIOS**. ISBN: 978-950-665-438-2. Río Cuarto. Argentina.
- CANTERO, J., J. CANTERO A. y CISNEROS J. M. 1996. **La vegetación de los paisajes hidro-halomórficos del centro de Argentina**. Ed. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- CASSÁN, F., F. PIECKENSTAIN, F. PALMA, J. ESTRELLA, J. SANJUAN, C. LLUCH-PLÁ y O. RUÍZ. 2006. Regulación de la respuesta a salinidad de *Lotus glaber* por la inoculación con *Azospirillum brasilense* y *Mesorhizobium*. **XX Congreso Argentino de las Ciencias del Suelo**. ISBN 987-21419-5-9. Salta, Argentina.
- CASSÁN, F., D. PERRIG, V. SGROY, O. MASCIARELLI, C. PENNA Y V. LUNA. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**. 45: 28-35.

- CISNEROS, J. J., A. CANTERO y J. M. CANTERO. 1999. Vegetation soil hydrophysical properties, and grazing relationships in saline-sodic of Central Argentina. **Canadian Journal of Soil Science** 1-11.
- CORDOVILLA, M., F. LIGERO y C. LLUCH. 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.
- DAVIES, WJ., G. KUDOYAROVA y W. HARTUNG. 2005. Long-distance ABA signalling and its relation to other signalling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. **Journal of Plant Growth Regulation** 24, 285–295.
- EGAN, T. y I. UNGAR. 1998. Effects of different salts of sodium and potassium on the growth of *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae). **Journal of Plant Nutrition** 21(10): 2193-2205.
- FEHR, W. y C. CAVINESS. 1977. **Stages of soybean development**. Special Report 80. Iowa State University, Ames, Iowa. 11p.
- GARCÍA, F. 2009. **Manual del cultivo de soja**. Ed: García F.; Ciampitti, I.; Baigorri, H. Buenos Aires: International Plant Nutrition Institute.
- GRATTAN, S. y C. GRIEVE. 1999. Mineral nutrient acquisition and response by plants in saline environments **En: Pesarakli M. (ed.) Handbook of Plant and Crop Stress**. University of Arizona, Tucson, Arizona.
- GONZALEZ, E., L. GALVEZ y C. ARRESE-IGOR. 2001. **Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity**. *J. Exp. Bot.* 52: 285-293.
- HAN, H. y K. LEE. 2005. Physiological Responses of Soybean - Inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in Saline Soil Conditions. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences** 1(3): 216-221.
- HARTUNG, W. y W. JESSCHKE. 1999. Abscisic Acid: A Long-Distance Stress Signal in Salt-Stressed Plants. **En: Lerner H. (ed.) Plant responses to Environmental Stresses**. Marcel Dekker, Inc. New York.
- HOAGLAND, D. Y D. ARNON. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station Circular 347:1-32.
- ISTA (International Seed Test Association). 2007. **International Rules for Seed Testing**. ISTA Editorial. USA.
- KRĚEK, M., P. SLAMKA, K. OLŠOVSKÁ, M. BRESTĚ y M. BENĚICOVÁ. 2008. Reduction of drought stress effect in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen fertilization. **Plant Soil Environ.**, 54, (1): 7–13

- LODEIRO, A., P. GONZÁLEZ, A. HERNÁNDEZ, L. BALAGUÉ y G. FAVELUKES. 2000. Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grown common beans. **Plant Science** 154: 31–41.
- LONE, M. 1988. Ionic relations of barley embryos response to equisomolar salts. **Managing Soil Resources**. Proceedings of First National Congress of Soil Science.
- LLANES, A., C. CASALE, M. REGINATO y V. LUNA 2006. Contenido de aminoácidos, prolina, glicinbetaína y proteínas en plántulas de *Prosopis strombulifera* bajo salinidad. Actas de la **XXVI Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal**. Pág. 130.
- MOHAPATRA, S., R. POOLE y R. DHINDSA. 1988. Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. **Plant Physio** 187: 468-473
- MUJERIEGO, R. 1990. **Manual Práctico de Riego con Agua Residual Municipal Regenerada**. Ediciones de la Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona.
- RAMADÚ, M., L. LÉPORE., F. CASSÁN y V. LUNA. 2007. Respuesta de la soja (*Glycine max* L.) a salinidad por NaCl y Na₂SO₄, mediada por la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento o la aplicación exógena de ácido ABA. **VI REBIOS**. ISBN: 978-950-665-438-2. Río Cuarto. Argentina.
- RAMOS, J. M.J. LOPEZ y M. BENLLOCH 2004. Effect of NaCl and KCl salts on the growth and solute accumulation of the halophyte *Atriplex nummularia*. **Plant and Soil** 259, 163–168.
- REGINATO, M. 2003. **Efectos de NaCl y Na₂SO₄ sobre el crecimiento, contenido de iones y pigmentos de plántulas de *Prosopis strombulifera* (Lam) Benth**. Trabajo final para optar al grado de lic. en Ciencias Biológica. Biblioteca UNRC.
- REINOSO, H., L. SOSA, L. RAMÍREZ y V. LUNA. 2004. Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). **Canadian Journal of Botany**, 82: 618-628.
- RHOADES, J. y J. LOVEDAY. 1990. Salinity in irrigated agriculture. **En:** Stewars, B. and Nielsen, D. (Eds.). **Irrigation of Agricultural Crops**. ASA-CSAA-SSSA, Madison, WI.
- SAGPyA. 2008. **Estimaciones agrícolas en cultivos. Oleaginosas: Soja**. **En:** <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/resoja.php>. Fecha de consulta: 12/09/2008.
- SHANNON, M., C. GRIEVE y L. FRANCOIS. 1999. Whole plant response to salinity. **En:** Shannon, M. (ed.) **Plant responses to enviromental stress**. Editorial Marcel Dekker. New York.
- SHI, D. y Y. SHENG B. 2005. Effect of various salt–alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. **Environmental and Experimental Botany** 54: 8–21.

- SINGLETON, P.W. and B.B. BOHLOOL. 1984. Effect of salinity on the nodule formation by soybean. **Plant Physiol.**, 74: 72-76.
- SOMASEGAREN, P. y H. HOBEN. 1994. **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer Verlag. New York.
- SOSA, L. A. LLANES, H. REINOSO, M. REGINATO Y V. LUNA. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. **Annals of botany** 96: 261-267
- WARNE, P., R. GUY, L. ROLLINS y M. REID. 1990. The effects of sodium sulphate and sodium chloride on growth, morphology, photosynthesis, and water use efficiency of *Chenopodium rubrum*. **Canadian Journal of Botany**. 68: 999-1006.