

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

**Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo**

Modalidad: Proyecto

**APLICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE
NITRÓGENO Y HORMONAS VEGETALES PARA
MAXIMIZAR LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO
TEMPRANO DE SEMILLAS DE SOJA**

Alumna: DI CESARE, Ornella Paola

DNI: 33.052.285

Director: CASSÁN, Fabricio

Río Cuarto-Córdoba

Abril 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

APLICACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y HORMONAS
VEGETALES PARA MAXIMIZAR LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO
TEMPRANO DE SEMILLAS DE SOJA

Autor: Di Cesare, Ornella Paola
DNI: 33.052.285

Director: Cassán, Fabricio

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Prof. Julieta Bonvillani _____

Prof. Javier Andrés _____

Prof. Fabricio Cassán _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

DICATORIA

A Nico, a mi familia y amigos que
han sido los que me han hecho
crecer como persona y guiado en
esta vida.

A DIOS, quien me regala los dones
de la sabiduría para enfrentar los
retos, las alegrías y los obstáculos
que se me presentan
constantemente.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente gracias a Dios nuestro Padre por ser nuestra guía, a Jesús por ser nuestra inspiración junto con la Virgen y sus Ángeles quienes son el ejemplo de amor más grande de este mundo.

A mi amor Nico,quién es mi compañero, guía y mi apoyo,gracias por tu paciencia y comprensión, hoy hemos alcanzado un triunfo más porque los dos somos uno y mis logros son tuyos. Gracias por ser el motor para que siempre siga adelante. Te amo.

A mi familia, papá Berti, mamá Moni, mis hermanos Cinthia, Franco y Lucia y mi cuñado Hernán por su fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mis años de carrera profesional. Gracias por cada día confiar y creer en mí y mis expectativas.

A mis suegros Dante y Silvia a mis cuñados Paula, vane, y Lucas y mi sobrina Agustina porque siempre están en las buenas y en las malas, gracias por su incondicionalidad, apoyo, consejos y comprensión.

A mis abuelos Delia, Ramón y en especial a Rosa que con sus rezos y apoyo moral es que llegue acá. También gracias a vos nono Adolfo porque sé que desde arriba siempre me ayudaste, gracias.

A mis tíos y primos, muchas gracias por su apoyo y cariño.

A mis amigos Tati, Caro, Gonza, Nano, Santi y Javi que son los que me ayudaron día a día a para que avanzara en mi carrera, ellos me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de esta trayectoria, lo hicieron de diferentes maneras. Gracias por los buenos momentos que hemos compartido.

A mis amigas Roci, Cynthia, Joha y Eli, han estado a mi lado desde que éramos chicas. El tiempo sigue pasando, y ahí están, cerca de mí ofreciendo lo mejor que tienen, gracias por su apoyo, por mantener esta amistad, por siempre estar.

A mi Director y todo su equipo, muchas gracias por su apoyo en la realización de mi tesis y porque además aprendí muchísimo de ellos. En especial, a Fabricio y Romina quiero agradecer por la confianza que depositaron en mí, su constante apoyo, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, que me abrió las puertas y brindó la oportunidad de estudiar la carrera Ingeniera Agrónoma.

A todos ellos GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS...

INDICE

<i>RESUMEN</i>	X
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1 Fundamentación	1
1.2 Características generales de la soja	2
1.3 La soja en nuestro país	3
1.4 Rizobacterias promotoras del crecimiento	3
1.5 Formulación de inoculantes en la República Argentina	5
1.6 Hormonas vegetales	6
1.6.1 Auxinas	7
1.6.2 Giberelinas	8
1.6.3 Citocininas	10
<i>2. HIPÓTESIS</i>	13
<i>3. OBJETIVOS</i>	13
3.1 Objetivos generales	13
3.2 Objetivos específicos	13
<i>4. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	14
4.1 Material vegetal	14
4.2 Inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
4.3 Hormonas vegetales	14
4.4 Tratamiento de las semillas y modelo experimental	15
4.5 Ensayo de germinación	15
4.6 Ensayo de crecimiento temprano	16
4.7 Diseño experimental	17
4.8 Análisis de datos	17
<i>5. RESULTADOS</i>	18
5.1 Ensayo de germinación en cámara	18
5.1.1 Energía y Poder germinativo	18

5.1.2 Longitud del hipocótilo _____	20
5.1.3 Longitud de la radícula _____	22
5.2 Ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo _____	26
5.2.1 Peso fresco y seco aéreo _____	26
5.2.2 Peso fresco y seco radical _____	28
5.2.3 Longitud aérea _____	30
5.2.4 Longitud laminar _____	35
5.2.5 Longitud radical _____	40
5.2.6 Número de hojas trifoliadas _____	43
5.2.7 Número y porcentaje de nódulos por planta _____	44
6. <i>DISCUSIÓN</i> _____	53
7. <i>CONCLUSIÓN</i> _____	60
8. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> _____	61
<i>ANEXO</i> _____	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Esquema de los tratamientos _____	17
Tabla 2: Resultados Energía Germinativa _____	72
Tabla 3: Resultados Poder Germinativo _____	72
Tabla 4: Resultados longitud del hipocótilo _____	73
Tabla 5: Resultado Kruskal-Wallis para longitud de hipocótilo _____	21
Tabla 6: Resultados longitud de la radícula _____	74
Tabla 7: Resultado Kruskal-Wallis para longitud de la radícula-control _____	24
Tabla 8: Resultado Kruskal-Wallis para longitud de la radícula-inoculante _____	25
Tabla 9: Resultados peso fresco aéreo 14 días _____	76
Tabla 10: Resultados peso seco aéreo 14 días _____	77
Tabla 11: Resultados peso fresco radical 14 días _____	79
Tabla 12: Resultados peso seco radical 14 días _____	79
Tabla 13: Resultado Kruskal-Wallis para peso seco radical-inoculante _____	29
Tabla 14: Resultados longitud aérea 7 días _____	81
Tabla 15: Resultados longitud aérea 14 días _____	82
Tabla 16: Resultado Kruskal-Wallis para longitud aérea 14 días-control _____	34
Tabla 17: Resultados longitud laminar 7 días _____	84
Tabla 18: Resultados longitud laminar 14 días _____	85
Tabla 19: Resultado Kruskal-Wallis longitud laminar 7 días-inoculante _____	38
Tabla 20: Resultado Kruskal-Wallis longitud laminar 14 días-control _____	39
Tabla 21: Resultado Kruskal-Wallis longitud laminar 14 días-inoculante _____	39
Tabla 22: Resultados longitud radical 14 días _____	88
Tabla 23: Resultado Kruskal-Wallis longitud radical 14 días-control _____	42
Tabla 24: Resultado Kruskal-Wallis longitud radical 14 días-inoculante _____	43
Tabla 25: Resultados N° de hojas trifoliadas/planta 14 días _____	90
Tabla 26: Resultados N° de nódulos en raíz primaria, secundaria y total por planta 14 días _____	90
Tabla 27: Resultados % de nódulos en raíz primaria, secundaria y total por planta 14 días _____	91
Tabla 28: Resumen de los resultados presentados en soja _____	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Embriogénesis y desarrollo de semillas de soja	7
Figura 2: Factores internos que afectan la germinación	10
Figura 3: Preparación de las bandejas de siembra	16
Figura 4: Vaso de siembra	16
Figura 5: Gráfico de barra Energía Germinativa (EG)	18
Figura 6: Gráfico de barras Poder Germinativo (PG)	19
Figura 7: Diagramas de cajas longitud del hipocótilo (cm)	20
Figura 8: Estructura de crecimiento posgerminativas	22
Figura 9: Diagramas de cajas longitud de la radícula (cm)	22
Figura 10: Gráfico de interacción longitud de la radícula (cm)	23
Figura 11: Estructura de crecimiento posgerminativas	26
Figura 12: Gráfico de interacción peso fresco y seco aéreo (g)	26
Figura 13: Gráfico de interacción peso fresco y seco radical (g)	28
Figura 14: Diagramas de cajas longitud aérea (cm)	30
Figura 15: Plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas	32
Figura 16: Plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas	32
Figura 17: Gráfico de interacción longitud aérea (cm)	33
Figura 18: Diagramas de cajas longitud laminar (cm)	35
Figura 19: Gráfico de interacción longitud laminar (cm)	37
Figura 20: Diagramas de cajas longitud radical (cm)	40
Figura 21: Raíces de plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas	41
Figura 22: Gráfico de interacción longitud radical (cm)	41
Figura 23: Gráfico de barras número de hojas trifoliadas	43
Figura 24: Gráfico de barras número de nódulos en raíz primaria, secundaria y total	44
Figura 25: Gráfico de barras porcentaje de plántulas de soja noduladas en raíz primaria, secundaria y total	45
Figura 26: Nódulos en raíces de plántulas de soja	46
Figura 27: Resumen de las respuestas de las semillas de soja a nivel de la germinación y crecimiento temprano	51

RESUMEN

Con el objetivo de promover la germinación, implantación y el crecimiento temprano en plántulas de soja [*Glycinemax* L. (Merr)] durante los primeros estadios del desarrollo vegetal, se evaluó el efecto de la aplicación de rizobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium*, en combinación con tres hormonas vegetales (auxinas, giberelinas y citocininas). Se realizó un experimento con un diseño completamente al azar con arreglo factorial con ocho tratamientos. Las semillas fueron cultivadas en dos condiciones experimentales, de acuerdo a su estado fenológico: 1-cámara de germinación en condiciones sugeridas por ISTA (International Seed Test Association) para evaluar energía germinativa (EG), poder germinativo (PG), longitud del hipocótilo y longitud de la radícula; 2- cámara de cultivo, durante 14 días con fotoperíodo de 16 hs de luz a 25° C y 8 hs de oscuridad a 20° C y con 80 % de humedad relativa (HR), para evaluar los siguientes parámetros de crecimiento temprano: (a) peso (fresco y seco) aéreo y radical, (b) longitud aérea y radical (c) longitud laminar (d) n° de hojas trifoliadas y (e) sistema de nodulación, como número de nódulos en raíz principal, secundaria y porcentaje de plantas noduladas, por el Test de eficiencia de Burton modificado. Nuestros resultados sugieren que la cepa E109 de *B. japonicum* posee la capacidad de promover la germinación, establecimiento y crecimiento temprano de semillas y plántulas de soja y que tal capacidad tendría como base fisiológica la actividad de compuestos reguladores del crecimiento vegetal del tipo fitohormonas.

PALABRAS CLAVE: *Bradyrhizobium japonicum*, fitohormonas, auxinas, giberelinas, citocinina, soja, *Glycinemax*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fundamentación

El cultivo de soja [*Glycine max* L. (Merr)], es uno de los más importantes en la producción de granos a nivel mundial, debido por una parte a la gran adaptabilidad que tiene la planta a diferentes climas, suelos, fotoperíodos y, por otra, a la gran cantidad de usos que posee después que es cosechada, estando entre los más relevantes la producción de aceite y harina de soja, de los que derivan una inmensa cantidad de productos alimenticios que cada día cobran más importancia tanto en la dieta humana como animal. Pero a medida que la población mundial aumenta, es necesario generar nuevas estrategias para mejorar la productividad agrícola y así elevar al máximo la producción y la calidad de los alimentos, aprovechando eficientemente los recursos disponibles. Una manera de lograrlo, es teniendo semillas de calidad, ya que es uno de los requerimientos esencial para lograr una buena implantación del cultivo, lo que tiene una incidencia directa sobre el rendimiento. Adicionalmente, al obtener una mayor cantidad de plantas logradas, se incorpora un importante volumen de rastrojo, sin ningún costo adicional. Sin embargo esta incidencia sobre el rendimiento no es fácil de cuantificar, debido a los factores agronómicos, ambientales y patológicos que pueden afectar la germinación, así como la emergencia, el vigor y el desarrollo de las plántulas. La semilla es un insumo básico para la obtención de un stand de plantas sanas y homogéneas *a campo*, permitiendo una emergencia rápida y uniforme, de ahí su importancia sobre la rentabilidad y el éxito del cultivo. Como todo insumo debe estar sujeto a un control de calidad que defina su eficiencia. Si no se parte de un buen stand de plantas, no se podrá sacar provecho del potencial del cultivar utilizado.

Los parámetros para estudiar la calidad de la semilla de soja son: pureza físico-botánica, pureza varietal, germinación, vigor, uniformidad, contenido de humedad y patógenos llevados por la semilla. A nivel mundial, la Asociación para la Evaluación Semillas, del inglés (International Seed Test Association) o ISTA es el organismo responsable de estandarizar todas las metodologías para el control de calidad de semillas y recomendar los diferentes protocolos para cada una de las especies. A nivel nacional, la referencia es el Instituto Nacional de las Semillas o INASE (Pérez y Volpi, 2004).

Algunas prácticas agronómicas relacionadas con la búsqueda de mejoras significativas sobre la implantación de los cultivos, se han relacionado con el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (bioinsumos o inculantes) y/o moléculas reguladoras del crecimiento vegetal (fitoestimulantes) (Boiero *et al.*, 2007; Davies, 1995), pero existe poca información referida al uso combinado de estos productos biológicos en condiciones agronómicas. En tal sentido, en este trabajo, abordaremos el estudio del tratamiento

combinado de semillas de soja con inoculantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento del género *Bradyrhizobium* y soluciones bio-estimulantes formuladas en base a compuestos reguladores del crecimiento del grupo de las auxinas, giberelinas y citocininas, como una alternativa tecnológica para mejorar la respuesta de los cultivos en los estadios iniciales del crecimiento.

1.2. Características Generales de la soja

La soja [*Glycine max* L. (Merr)], es una planta de origen chino cuyo nombre procede del vocablo japonés “de Shoy” que significa simplemente alimento (Jiménez, 2005). Taxonómicamente se la clasifica al orden *Fabales*, familia *Fabaceas*, sub-familia *Papilionoideas*, género *Glycine*. Es una hierba anual, estival, erecta, de hasta 1,5m de altura. Desde el punto de vista estructural, sus hojas son trifoliadas; foliolos oval-lanceolados, el terminal más grande. Posee flores de color blanco o violáceo, reunidas en racimos axilares. Su fruto es una legumbre, péndula, pluriseminada, hirsuta, solitaria o agrupadas. La plántula tiene germinación epigea, las dos primeras hojas (eófilos) son simples y las posteriores trifolioladas (Bianco *et al.*, 2007). La germinación comienza cuando la semilla absorbe agua del suelo hasta alcanzar aproximadamente un 50% de humedad. El primer signo externo de la germinación es la emergencia de la radícula (raíz primaria) que crece hacia abajo y ancla la planta al suelo. Luego, enseguida, comienza el crecimiento del hipocótilo (sección del tallo encima de la radícula) hacia arriba empujando los cotiledones (Melgar *et al.*, 2011).

Las semillas se desarrollan en vainas de 4 a 6 cm de longitud y cada vaina contiene entre 2 y 3 porotos. Se recolecta cuando la vaina se torna de color amarillo. (Monografías.com, 2012). Estas constan de dos partes, cutícula y embrión. La cutícula es la cubierta protectora del embrión. El embrión está completamente desarrollado y consiste en la radícula, el hipocótilo y el epicótilo; se incluyen además los cotiledones que son carnosos y que representan casi la totalidad del peso y volumen de la semilla. Varían de forma, color y tamaño. La forma va desde la esférica hasta la achatada y alargada. La cutícula presenta color amarillo, verde, negro y varios tonos de marrón o castaños. En cuanto al hilum varía en su tonalidad siendo negro, gris claro y diferentes tonalidades de marrón (CORPOICA, 1994).

Desde el punto de vista fisiológico, esta leguminosa puede establecer de manera natural o inducida, asociaciones del tipo simbiótico con alfaproteobacterias, principalmente de la Familia *Bradyrhizobiaceae* y otras betaproteobacterias. Tal interacción, le permite llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno y obtener así fuentes naturales del elemento en la atmósfera para su desarrollo. Tal proceso ha sido ampliamente estudiado y explotado desde el punto de vista agronómico en los últimos años en todo el mundo.

1.3. 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 semillas 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 a 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 en la campaña 2002/03. La producción, que en 1990 era de 10.000.000 toneladas, llegó a los 32 millones en 2003/04, convirtiendo a la Argentina en el cuarto productor mundial de grano, el primer exportador mundial de aceite y el segundo de harina de soja (Clarín, 2004). El cultivo de soja es el de mayor importancia en el país, la superficie sembrada en la campaña 2010/11 fue de 18,8 millones de hectáreas, y la producción cosechada llegó a 49,2 millones de toneladas (Bolsa de cereales de Buenos Aires, 2011). Estos datos indican que es el cultivo oleaginoso de mayor participación en la producción total de granos de nuestro país. La soja es el cultivo más importante para la Argentina, no sólo por su volumen de producción sino también por la exportación, siendo el primer exportador mundial de aceites y subproductos, lo que origina un importante ingreso de divisas (Bolsa de cereales de Rosario, 2011). En la actualidad, 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. Así Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires representan las provincias de dicha región con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos (Diaz-Zorita, 2004). Argentina, como tercer productor mundial de soja, en la campaña 2012/13 alcanzó un valor de 55,5 millones de toneladas, cifra record que superó los valores de la campaña 2009/10. Mientras que para la campaña actual se espera que la soja alcance los 60,8 millones de toneladas, caracterizada por el buen rinde de los granos y escasa presencia de dañados. (Producción agroindustrial del NOA, 2014).

1.4. Rizobacterias promotoras del crecimiento

El suelo es el soporte natural en el que proliferan comúnmente un gran número de microorganismos en los que se incluyen a las bacterias, hongos, virus, protozoos y algas

(Nannipieri y Badalucco, 2003). Las bacterias conforman el grupo metabólico más importante del suelo, y si bien se encuentran en menor cantidad que los virus y son menos voluminosas que los hongos, cumplen un rol fundamental en los ciclos de carbono, nitrógeno y otros elementos (Nannipieri y Badalucco, 2003). Se utiliza el término rizósfera para describir la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia e influencia del sistema radical de las plantas (Gárate y Bonilla, 2000). Las bacterias de la rizósfera denominadas rizobacterias, tienen capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces de muchas especies vegetales y se pueden separar entre las que forman una relación simbiótica con la planta y las no lo hacen, denominadas de vida libre, que se asocian cerca de las raíces, sobre o dentro de ellas como endofíticas (Kloepper, 1993). Las rizobacterias simbióticas como aquellas pertenecientes al Orden *Rizobiales* y que incluyen individuos de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, han sido extensamente estudiadas desde la perspectiva de su asociación con leguminosas, en términos del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, nuevas evidencias sugieren que gran parte de los miembros de este género tendrían además potencialidad para ser considerados como rizobacterias promotoras del crecimiento (Cassán *et al.*, 2009).

Cuando estas bacterias u otras de *vida libre* se consideran benéficas para el crecimiento de las plantas, se las denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1989). Bashan y Holguin (1998), introdujeron un nuevo concepto que divide este grupo entre las PGPR, que promueven el crecimiento mediante mecanismos directos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal por biocontrol o PGPB (del inglés, Plant Growth Promoting Biocontrol) que promueven el crecimiento por mecanismos indirectos mediados por la inhibición del desarrollo o actividad de organismos fitopatógenos.

La promoción directa del crecimiento se produce cuando una PGPR proporciona los compuestos que afectan al metabolismo de la planta o cuando se facilita la adquisición de nutrientes no disponibles en el suelo. En las PGPR los mecanismos directos más importantes que han sido propuestos, además de la fijación biológica del nitrógeno son: (a) la actividad nitrato reductasa ligada a la producción de óxido nítrico; (b) la solubilización de fosfatos; (c) la producción de sideróforos, que incrementan la disponibilidad de Fe en la rizosfera; (d) la biosíntesis de fitohormonas o compuestos reguladores del crecimiento, tales como el ácido indol acético (AIA) (Bastián *et al.*, 1998); el ácido giberélico (GA_3) (Bottini *et al.*, 1989) y ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007); (e) incremento en el volumen de la raíz con la consecuente absorción de minerales y nutrimentos (Crowley *et al.*, 1991; Bowen y Rovira, 1999), entre otros mecanismos menos estudiados. Así, los beneficios directos de la inoculación de semillas con PGPR incluyen incrementos en la tasa de germinación, aumento

del crecimiento de la raíz y del tallo (Cassán *et al.*, 2009); aumento en la absorción de nutrientes (Okon y Kapulnik, 1986) y tolerancia a la sequía (Glick, 1995). Por otro lado, los mecanismos indirectos dependen de la interacción de la PGPR con un fitopatógeno por la que se reducen los efectos dañinos en el vegetal. Esta capacidad estaría mediada por la biosíntesis de antibióticos y antifúngicos o por competencia directa con los patógenos de la rizósfera.

La identificación y posible manipulación de las asociaciones entre PGPR o PGPB y plantas superiores, ha sido considerada una estrategia fundamental de la agricultura moderna. Entre las asociaciones de interés creciente en la actualidad, se destacan las de leguminosas rizobacterias del Orden de los *Rhizobiales* como *Rhizobium* sp. o *Bradyrhizobium* sp. con leguminosas o con otras especies cultivables no-leguminosas. En tal sentido, se ha probado que *Rhizobium* sp. puede adherirse a la superficie de monocotiledóneas de la misma manera que se adhiere a las de poroto (Terouchi y Syono, 1990). Adicionalmente se ha establecido que *Bradyrhizobium* sp. puede crecer eficientemente sobre semillas de gramíneas o soja durante su germinación y además, desarrollarse en su sistema radical de manera endofítica de la misma manera que una bacteria de *vida libre* (Peña-Cabrales y Alexander, 1983). Parte de esta capacidad se debería a la producción bacteriana de metabolitos secundarios del tipo fitohormonas (Somasegaran y Hoben, 1994) tal como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido abscísico (ABA) y giberelinas (Boeiro *et al.*, 2007). Tien *et al.*, (1979) fueron los primeros en sugerir que bacterias rizoféricas, podrían mejorar el crecimiento vegetal por excreción de fitohormonas como ácido indol-3-acético (AIA), giberelinas (GAs), citocininas (CA) y etileno (Et) (Bottini *et al.*, 1989, Iosipenko y Ignatov 1995; Patten y Glick 1996; Rademacher, 1994; Strzelczyk *et al.*, 1994). El tratamiento de semillas con inoculantes microbianos también ha sido empleado para promover y acelerar la germinación de semillas y el crecimiento temprano de plántulas. Cassán *et al.*, (2009) indicaron que *B. japonicum* E109 tiene capacidad de promover la germinación de semillas y crecimiento temprano de plántulas de soja. Estas bacterias se han aplicado además a semillas, tubérculos o raíces y son capaces de colonizarlas, estimular su crecimiento y hasta su rendimiento en condiciones de cultivo (Chanway *et al.*, 1989).

1.5. Formulación de inoculantes en la República Argentina

En la década del 70, cuando se produjo la expansión del cultivo en nuestro país, se consideró la introducción de cepas seleccionadas de *B. japonicum*, como una alternativa posible para evitar el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, en semillas destinadas a la producción agrícola. Luego de un intenso programa de selección iniciado en 1980 por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA-INTA) de Castelar, se consideró a

la cepa E109 de *B. japonicum* como la más recomendable para la inoculación de semillas de soja (Peticari *et al.*, 1996). Recientemente Boiero *et al.*, (2006) y Cassán *et al.*, (2009) evaluaron *in vitro* e *in planta* los mecanismos de promoción del crecimiento que operan en *B. japonicum* E109. Esta bacteria tiene la capacidad de colonizar la rizósfera, lo cual es esencial para la liberación de compuestos, fitohormonas tales como auxinas (AIA), giberelinas (GAs), citocininas directamente en los tejidos vegetales, lo cual parece tener un rol fundamental en la promoción del crecimiento de la planta. En leguminosas, además de la capacidad bacteriana para fijar nitrógeno, podría esperarse la obtención de una respuesta diferencial en el establecimiento de la simbiosis, nodulación y eventualmente fijación biológica del N por la biosíntesis rizosférica de fitohormonas. Esto sería fundamental durante las etapas críticas de la colonización de la raíz, debido a que el aumento en el crecimiento específico del tejido vegetal relacionado con el sitio blanco de anclaje que provocaría un aumento de las posibilidades de interacción con el simbionte (Cassán *et al.*, 2009).

1.6. Hormonas vegetales

Cuando se reconoció el papel de las bacterias de la rizósfera en la promoción del crecimiento de las plantas, su efecto se atribuyó a la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, en las últimas décadas se ha destacado su importancia como promotoras del desarrollo, debido a su capacidad para sintetizar metabolitos, sustancias o moléculas reguladoras del crecimiento. Cuando estos metabolitos son producidos en forma endógena por las plantas, se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas. El término "reguladores del crecimiento de las plantas" es usado por la industria de agroquímicos para nombrar a los compuestos sintéticos que tienen propiedades para regular el crecimiento de las plantas; en general, este término se utiliza cuando las hormonas de las plantas son producidas por microorganismos de la rizósfera (Arshad y Frankenberger, 1998).

Las hormonas vegetales o fitohormonas, son un grupo químico de compuestos naturales que afectan procesos de las plantas a concentraciones más bajas de las que presentan nutrimentos o vitaminas. Son producidos por plantas, bacterias, hongos e incluso pueden ser sintetizados por el hombre con capacidad de promover, inhibir o regular casi todos los procesos fisiológicos en plantas superiores. Dentro de estas moléculas podemos considerar a las auxinas, giberelinas y citocininas como los grupos más representativos, además del ácido abscísico, el ácido jasmónico o el etileno. Las fitohormonas constituyen un grupo de compuestos orgánicos diverso que influyen en casi todos los procesos fisiológicos de las plantas, principalmente aquellos relacionados con el crecimiento, diferenciación y desarrollo (Asha *et al.*, 1979; Trewabas, 1983; Kutschera y Briggs, 1987; Kende y Zeevaart, 1997; Kucera *et al.*, 2005; Philosoph-Hadas *et al.*, 2005; Marchi *et al.*, 2007).

Cuando la planta germina, comienzan a actuar ciertas fitohormonas que regulan su crecimiento desde esa temprana fase de manera sincronizada: las giberelinas regulan la germinación; cuando la planta alcanza la superficie se sintetizan las auxinas, que aceleran su crecimiento vertical, y más tarde, comienza la síntesis de citocininas o citoquininas, que estimulan la división celular o citocinesis y la ramificación de la planta (Cuba educa, 2014).

La germinación y el crecimiento de las plántulas también pueden ser controladas por la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en concentraciones fisiológicas, que actuarían como promotoras e inhibidoras de ambos procesos (Amador *et al.*, 2013).

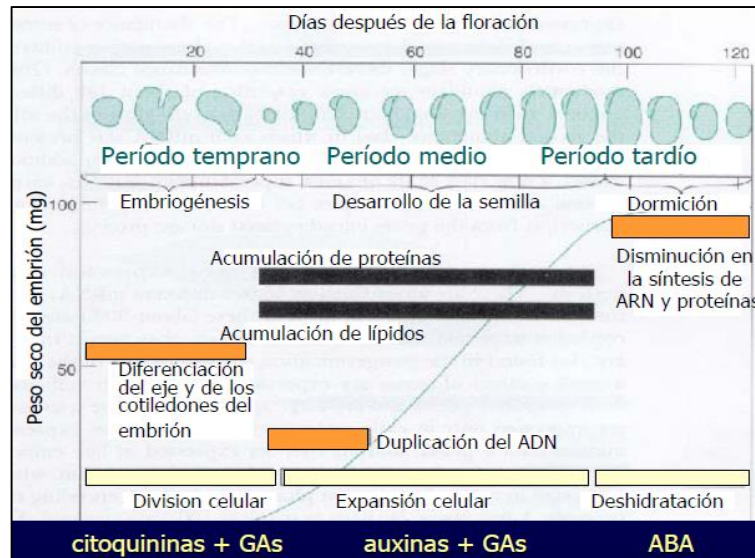


Figura 1: Etapas de la embriogénesis y desarrollo de semillas de soja y el rol de diferentes hormonas en el proceso. Fuente: www.slideshare.com.

1.6.1. Auxinas

Auxina, es el nombre genérico que representa a un grupo de compuestos químicos reguladores que se caracterizan por su capacidad de inducir la elongación de las células del tallo en la región subapical y que logran reproducir el efecto fisiológico del ácido indol-3-acético (AIA). Esta es la principal auxina de las plantas y es una de las fitohormonas de mayor relevancia dado que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal como la división, elongación y diferenciación celular (Zaho, 2010). Entre los procesos claves del desarrollo vegetal en el que han sido vinculados está la orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz (fototropismo) y gravedad (gravitropismo) (Kaufman *et al.*; 1995); diferenciación de tejidos vasculares; dominancia apical; iniciación de las raíces laterales y adventicias (Malamy y Benfey, 1997); estimulación de la división celular (Kende y Zeevaart, 1997) y elongación de tallos y raíces (Ross *et al.*, 2000), entre otros. Como otras fitohormonas, las auxinas también se sintetizan endógenamente por las plantas; sin embargo, sus efectos hormonales se han elucidado por sus aplicaciones exógenas (Contreras *et al.*, 2010). En algunas especies de plantas, se ha establecido que el AIA tiene un efecto

importante al promover una mayor longitud de brotes y raíces (Coello *et al.*, 2010). De acuerdo a Kutschera y Briggs (1987), la función del AIA es inducir el crecimiento por medio de una rápida estimulación de síntesis de los componentes de la pared celular de células en crecimiento. Así, por ejemplo, en plántulas de una variedad enana de *Pisum sativum* “arveja”, la aplicación continua de manera exógena de AIA (10^{-3} y 10^{-4} M) en los entrenudos de las plántulas incrementa el crecimiento total del tallo (Yang *et al.*, 1993). Según Amador *et al.*, (2013), un mayor diámetro de la raíz y parte aérea de las plántulas de las especies de *Ferocactus* provenientes del tratamiento con AIA, representa una ventaja para coadyuvar en el rápido establecimiento y crecimiento de la plántula en condiciones de campo, ya que una raíz relativamente más gruesa o de mayor diámetro facilitaría el “anclaje” en un sustrato determinado y por tanto, contribuir al éxito de su supervivencia.

En cuanto al rol fisiológico de las auxinas producido por rizobios, se sabe que la respuesta de la planta al AIA producido por microorganismos puede variar de benéfica a perjudicial, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del *contenido endógeno* de la hormona por la actividad microbiana del suelo ó sobre la planta, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador, modificar parcialmente el metabolismo celular, y por ello, promover el crecimiento. Hace más de 60 años, investigadores como Thiman (1936) y Link (1937), propusieron que las auxinas y otros compuestos reguladores jugarían un importante rol en la formación y desarrollo de los nódulos y en la actualidad trabajos indican que cambios en el balance de esta hormona son un pre requisito para la organogénesis de tales órganos (Mathesius *et al.*, 1997). Prinsen *et al.*, (1991), sugieren que la síntesis de factores *nod* y AIA en *Rhizobium leguminosarum* es disparada por flavonoides *nod*-derivados de la planta. Actualmente para las bacterias del género *Bradyrhizobium*, ha sido descrita la producción de auxinas como parte de la capacidad promotora del crecimiento, fundamentalmente a nivel del desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos durante la simbiosis.

1.6.2. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos), algunos de los cuales poseen actividad hormonal y regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la germinación, el alargamiento caular, la floración y la fructificación (Davies, 1995). Están constituidas al menos por más de 130 compuestos producidos tanto por plantas, hongos y bacterias (Hedden y Phillips, 2000) que son esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de todas las plantas superiores (Mander, 1991). De éstas la única con valor comercial es el ácido

giberélico o GA₃. Sobre todas las GAs conocidas en la naturaleza, al menos 13 son específicas de hongos, 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas (Crozier *et al.*, 2000). A pesar de su amplia distribución entre reinos y de la cantidad de formas conocidas, cabe destacar, que sólo algunas pocas moléculas tienen actividad biológica *per se* sobre tejidos vegetales. Tal es el caso de GA₁, GA₃ y GA₄ que son activas sobre tejidos vegetativos de distintas especies vegetales y GA₄, GA₇ que son activas en tejidos reproductivos (Hedden *et al.*, 2002).

Como se muestra en la Figura 2, las giberelinas tienen una función clave en el control de la germinación de las semillas; esto está directamente relacionado con la terminación de la latencia del embrión, con la velocidad de germinación de semillas y el crecimiento inicial de las plántulas (Hartmann y Kester, 1987) y por ello son ampliamente utilizadas para promover o inducir la geminación de semillas en diversas especies (Ikuma y Thimann, 1963; Lewak y Khan, 1977; Mehanna *et al.*, 1985; Karssen *et al.*, 1989; Baskin y Baskin, 1998; Tigabú y Odén, 2001). Karssen *et al.*, (1989) y Debeaujon y Koornneef (2000), han propuesto dos mecanismos diferentes de acción de las giberelinas en el proceso de germinación, el primero es que influyen en la hidrólisis de las reservas de alimento; y el segundo mecanismo de acción consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión. Además tienen varias respuestas en el crecimiento del tallo, la partenocarpia, la expansión foliar, la elongación de la raíz y la floración (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007). La inducción del crecimiento del tallo es probablemente el efecto más evidente, vía alargamiento celular (Ascon-Bieto y Taylon, 2003). Con respecto a los efectos generados por las giberelinas, Bakrim *et al.*, (2007) estudiaron el efecto de 20 reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación y crecimiento de plántulas de *Lycopersicon esculentum* “tomate” y advirtieron efectos positivos con la adición de GA₃. Para plántulas de *Carica papaya* “papaya” Furutani y Nagao (1987), mencionan un efecto positivo del GA₃, debido a que las plántulas provenientes de semillas tratadas con esta fitohormona muestran hipocótilos alargados. Y según Constantino *et al.*, (2010), se produjeron incrementos de forma significativa en la altura, diámetro del tallo, n° de hojas, biomasa fresca y seca. En especies cultivadas se ha demostrado que el efecto de las giberelinas sobre el alargamiento celular es dependiente de la presencia de auxinas (Ross y O’Neill, 2001).

En cuanto al rol fisiológico de las GA₃ producido por rizobacterias; esta hormona jugaría un rol clave en la estimulación del crecimiento temprano en plantas inoculadas. Al presente resulta difícil diferenciar el rol fisiológico de las GAs producidas por bacterias a nivel rizosférico o en contacto con los tejidos de la planta de otros mecanismos de promoción; sin embargo, parece lógico pensar que el estímulo en el crecimiento temprano tanto aéreo como radicular, podrían beneficiar a las poblaciones de microorganismos productores, desde el punto de vista de aumentar la biomasa vegetal y con ella la

disponibilidad de nutrientes en la rizósfera (Rademacher, 1994). A pesar de ello, atribuir este fenómeno sólo a la producción de una sustancia hormonal por parte del microorganismo, resulta muy simplista, sobre todo considerando la variabilidad de la respuesta y las numerosas especies vegetales que responden positivamente a la inoculación con un fenotipo similar. Con respecto a la producción de la hormona por rizobacterias Boiero *et al.*, (2007) determinaron la producción de GA₃ en cultivos puros de *B. japonicum* E109, USDA110 y SEMIA5080, a través de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).



Figura 2: Esquema de algunos factores intrínsecos y extrínsecos que afectan la germinación. Fuente: www.slideshare.com.

1.6.3. Citocininas

Las citocininas son un grupo de compuestos que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Este grupo de fitohormonas es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular (Klee y Estelle, 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos, el desarrollo y elongación de la raíz, la formación de pelos radicales, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas (Sakakibara, 2006). Por definición, son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales. El primer regulador con actividad específica del tipo citocinina, fue descubierto por Miller *et al.*, (1955), y se denominó *cinetina* (K) la cual fue considerada como una forma no natural de la hormona. En 1963, Letham, identificó una forma natural que se denominó *zeatina* (Z) y desde entonces más de 40 moléculas y sus metabolitos han sido clasificados.

Las citoquininas son un grupo de fitohormonas con importantes funciones en todas las fases del desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2010), desde la germinación de las semillas hasta la senescencia (Mok *et al.*, 2005; Segura, 2008), desde la división celular hasta la elongación de las células, por lo cual se encuentran en mayor concentración en los meristemas de embriones y frutos inmaduros, en donde normalmente las concentraciones son inferiores a la mayoría de fitohormonas y el efecto fisiológico que genera depende de la especie (Smith y Atkins, 2002). Durante el desarrollo temprano de las semillas, las citoquininas se acumulan principalmente en el endosperma (Mok y Mok, 2001), y se ha propuesto que desde allí se moviliza la concentración necesaria para promover la división celular en el embrión (Fischer-Iglesias y Neuhaus, 2001). Posteriormente la fitohormona se redistribuye dentro del embrión a las regiones donde dirige el crecimiento de la raíz (Kucera *et al.*, 2005). Muchos de los conocimientos sobre el papel de las citoquininas en el desarrollo vegetal provienen de la observación de los cambios o respuestas inducidas por la aplicación de citoquininas exógenas (Moncaleán *et al.*, 2005; Cortizo *et al.*, 2010; Cuesta, 2010 y 2012). Jaiswal *et al.*, (1982) informaron que la aplicación de zeatina exógena aumento la actividad de la nitrogenasa en nódulos de *Vigna mungo*, lo que sugiere que esta fitohormona puede desempeñar un papel esencial en el inicio del proceso de nodulación. Giraud *et al.*, (2007), demostraron que los factores nod no son estrictamente necesarias en ciertas especies de leguminosas, ya que *Bradyrhizobium sp.* puede utilizar una vía de comunicación alternativa, en la que un compuesto de citoquininas es el responsable de desencadenar la formación de nódulos de la raíz de la planta huésped.

Con respecto al rol fisiológico de las citocininas producidas por rizobacterias se sabe que esta hormona, podría suplementar el contenido endógeno de la planta y en ciertos casos promover el crecimiento vegetal. En la actualidad sabemos que las plantas, responden a la adición exógena de citocininas (Frugier *et al.*, 2008). A pesar de que la producción microbiana de citocininas en plantas superiores comenzó con modelos de microorganismos fitopatógenos, en la actualidad los investigadores se han volcado a la comprensión de este proceso en grupos de bacterias promotoras del crecimiento. El modelo más estudiado en este sentido ha sido el de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se ha investigado tanto la producción de la hormona en el microsimbionte como en la planta. En este sentido, Nandwall *et al.*, (1981), estudiaron que el efecto de la adición exógena de kinetina, promovía la iniciación de los nódulos e incrementaba el contenido de *leg* hemoglobina en plantas de porotos inoculadas. En otros ensayos (Yahalom *et al.*, 1990), probaron que la adición exógena de BAP como la co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum sp.* incrementaba el número de nódulos formados en *Medicago polymorpha*. Con respecto a la producción de la hormona por rizobacterias, Boiero *et al.*, (2007), determinaron la presencia de zeatina en

cultivos puros de las cepas E109, USDA110 y SEMIA5080 de *B. japonicum* que son normalmente utilizadas en la formulación de inoculantes para soja en todo el continente.

Considerando que el crecimiento de las plantas se encuentra condicionado por la calidad y estado fisiológico de las semillas y esto es aún más importante durante las primeras etapas del desarrollo vegetal, este trabajo se desarrolló con el objetivo de establecer si la inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento sola o junto a la aplicación exógena de fitohormonas podrían generar un efecto benéfico individual o combinado sobre la germinación y crecimiento temprano de semillas de soja.

2. HIPOTESIS

La aplicación de inoculantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno y hormonas vegetales exógenas maximizará la respuesta de germinación, implantación y crecimiento temprano de semillas de soja.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Mejorar los procesos de germinación, implantación y crecimiento temprano en semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] por el tratamiento combinado de rizobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* y hormonas vegetales.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la germinación de semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] naturales o tratadas exógenamente con soluciones de fitohormonas e inoculadas con la rizobacteria *B. japonicum*.
- Evaluar la implantación y crecimiento temprano de semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] naturales o tratadas exógenamente con soluciones de hormonas vegetales e inoculadas con *B. japonicum* en dosis agronómicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para los ensayos de germinación se utilizaron semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] RG DM4440 de la empresa Don Mario, resistentes a glifosato, ciclo intermedio-largo y de crecimiento determinado obtenidas durante la campaña 2011-2012. Para los ensayos de crecimiento temprano en plántulas, se utilizaron semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] 5.1 *i* de la empresa Don Mario, ciclo corto y de crecimiento Indeterminado. Antes de realizar los ensayos se evaluó su energía y poder germinativo de acuerdo a las normas de la *International Seed Test Asociation* (ISTA) (Peretti, 1994); para así comparar el porcentaje de germinación y pureza declarado por la empresa proveedora en el marbete de la bolsa y aquel obtenido en el laboratorio, al momento de recibir las semillas.

4.2 Inoculante a base rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las semillas se inocularon con productos de origen comercial formulados con la cepa E109 de *B. 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 cantidad de bacterias aportadas por unidad de siembra (dosis) se estableció de acuerdo a las recomendaciones del marbete del producto con una recomendación de aplicación de 150 ml.50 kg⁻¹ semillas para una concentración estimada de 1.10⁹ ufc.ml⁻¹. De acuerdo a las recomendaciones de SENASA los parámetros para determinar la aptitud comercial de tales productos comerciales determinan un recuento de bacterias superior a 1.10⁹ ufc.ml⁻¹ a la fecha de elaboración del producto y un aporte teórico por semilla superior a 8.10⁴ ufc.semilla⁻¹ al momento de la inoculación. Nuestra dosis de trabajo se ajustó a 5 ml inoculante.kg⁻¹ semilla.

4.3 Hormonas vegetales

Para la preparación de las soluciones de fitohormonas de uso exógeno sobre las semillas, se utilizaron los siguientes reactivos comerciales: ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA₃) y cinetina (K), todos de la firma Olchemin (Checoslovaquia) y con un 98.0% de pureza. Las soluciones se prepararon en base acuosa y en concentraciones comprendidas entre 1 y 10 ppm. Todas las soluciones se almacenaron hasta su utilización en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 4 °C. Las soluciones se adicionaron en una relación volumétrica del 10 % con el inoculante empleado en el momento de la siembra.

4.4 Tratamiento de las semillas y modelo experimental

Previo a la siembra, las semillas fueron inoculadas con la dosis de rizobacterias promotoras del crecimiento recomendada y descrita en 4.2. y fitohormonas según el apartado 4.3 y de acuerdo al tratamiento. Adicionalmente se consideró un tratamiento control, sin la adición exógena de hormonas e inoculación.

Sobre la base de estas consideraciones se realizaron los siguientes tratamientos de las semillas de soja:

- T 1 (AH0):** tratadas con 540 µl de H₂O cada 100 g de semilla.
- T 2 (IH0):** inoculadas con *B. japonicum* E109 (500 µl) + Agua (40 µl) cada 100 g.
- T 3 (AH1):** tratadas con AIA (40 µl) + Agua (500 µl) cada 100 g.
- T 4 (AH2):** tratadas con GA₃ (40 µl) + Agua (500 µl) cada 100 g.
- T 5 (AH3):** tratadas con K (40 µl) + Agua (500 µl) cada 100 g.
- T 6 (IH1):** inoculadas con *B. japonicum* E109 (500 µl) + AIA (40 µl) cada 100 g.
- T 7 (IH2):** inoculadas con *B. japonicum* E109 (500 µl) + GA₃ (40 µl) cada 100 g.
- T 8 (IH3):** inoculadas con *B. japonicum* E109 (500 µl) + K (40 µl) cada 100 g.

4.5 Ensayo de germinación

Para el desarrollo del ensayo, se tomó como base experimental, el protocolo de germinación propuesto por el Internacional Seed Test Association (ISTA, 2007), para semillas de soja [*Glycine max* L. (Merr)] con la metodología denominada entre papel "between paper". La experiencia se llevó a cabo con un diseño aleatorio de dos réplicas por tratamiento (n=200). Para ello, se utilizaron bandejas de plástico (15 x 25 cm) en las que se sembraron individualmente, 100 semillas sobre papel de servilleta (doble hoja) empapado con agua destilada estéril) y se cubrieron con el mismo sustrato. Las bandejas se colocaron dentro de bolsas plásticas transparentes cerradas con clip para evitar la pérdida de humedad y se llevaron a una cámara de germinación con fotoperiodo de 16 hs de luz a 30° C y 8 hs de oscuridad a 20° C con 80 % de HR durante 8 días. Durante el desarrollo de la experiencia se evaluó el número de semillas germinadas (con una radícula mayor a 5 mm) después de 5 días desde la siembra, correspondientes al valor de energía germinativa (EG) propuesto por normas ISTA. Al final de la experiencia se evaluó: (a) número de semillas germinadas a los 8 días, correspondientes al valor de poder germinativo (PG) propuesto por las normas ISTA; (b) longitud del hipocótilo; (c) longitud de la radícula, como parámetros representativos del crecimiento embrionario temprano.

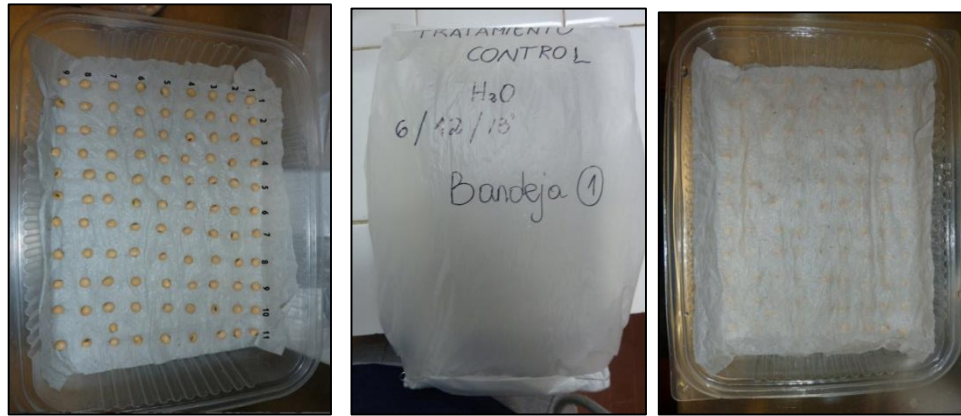


Figura 3: Esquema de la preparación de bandejas de acuerdo a normas ISTA

4.6 Ensayo de crecimiento temprano

La experiencia se llevó a cabo con un diseño aleatorio, de tres réplicas por tratamiento (n=24). Para ello, 5 semillas de soja (*Glycine max.* L) fueron sembradas en vasos plásticos de 220 ml de capacidad, conteniendo arena y vermiculita (relación 1:1) como sustrato estéril y solución nutritiva de Hoagland deficiente en nitrógeno (10 %) (Hoagland y Boyer, 1936) suministrada por riego capilar. Todos los vasos de cada tratamiento se mantuvieron por 14 días en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 hs de luz a 30° C y 8 hs de oscuridad a 20° C con 80 % de HR. Durante el desarrollo de la experiencia se midieron los siguientes parámetros de crecimiento, según Burton *et al.*, (1972). A los 7 días desde la siembra se evaluó el número de plántulas germinadas por vaso, se midió la longitud aérea y la longitud de las primeras hojas. Al final de la experiencia (14 días) se evaluó: (a) peso (fresco y seco) aéreo y radical, (b) longitud aérea y radical (c) longitud laminar (d) n° de hojas trifoliadas y (e) sistema de nodulación, como número de nódulos en raíz principal, secundaria y porcentaje de plantas noduladas.



Figura 4: Soporte plástico para el cultivo de soja

4.7 Diseño experimental

En ambos ensayos, como las semillas fueron sembradas de manera homogénea (en cuanto a temperatura ambiente y preparación) y se tomaron igual número de repeticiones por tratamiento y en cada tratamiento igual cantidad de semillas, el diseño adecuado para el análisis fue un *Diseño Completo al Azar*. Debido a que el interés de este trabajo fue el de estudiar si existió interacción entre la inoculación y el tratamiento hormonal, los datos se analizaron a través de un *Arreglo Factorial sobre un DCA*, donde hubo dos replicas (bandejas) y tres (vasos) por tratamiento y ocho tratamientos por ensayo. En la **Tabla 1** se muestra un esquema de campo de los tratamientos.

Tabla 1: Esquema de campo de los tratamientos.

IH2	AH2
AH0	AH1
AH3	IH0
IH1	IH3

4.8 Análisis de datos

Con los datos obtenidos se hizo un análisis descriptivo de los ocho tratamientos y, se verificó el cumplimiento de los supuestos del análisis de la variancia donde se usó el test de Shapiro-Wilks para normalidad y test de Levene para homogeneidad de variancias. Al no cumplirse estos supuestos ($p < 0.0001$), se realizaron nuevos análisis de la variancia con variables obtenidas por transformaciones a log decimal, pero tampoco se verificaron, por lo que se realizó un análisis no paramétrico, test de Kruskal Wallis con contrastes *a posteriori*, para los 8 tratamientos. Estas pruebas, junto con los estadísticos descriptivos se realizaron usando el programa InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2013). En todas las pruebas estadísticas se trabajó con un nivel de significación α del 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Ensayo de germinación en cámara

5.1.1 Energía y Poder germinativo

La **Figura 5** y la **Tabla 2** (del **Anexo 1**), representan la Energía Germinativa (EG) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) a base de *B. japonicum* E109, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 5 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

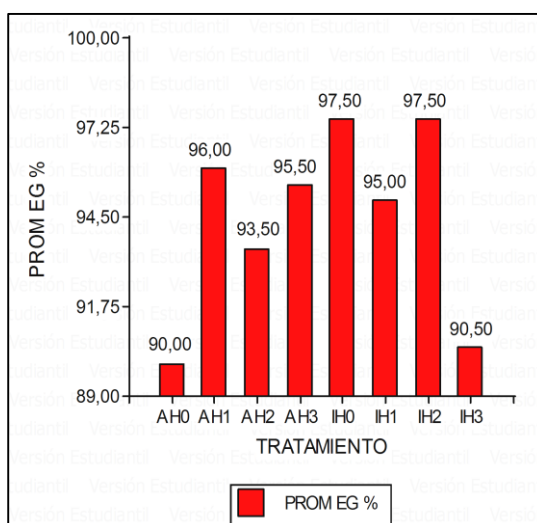


Figura 5: Evaluación de la Energía Germinativa (EG) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) con *B. japonicum* y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de las siguientes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 5 días de crecimiento. Cada barra representa la media del tratamiento.

Como se observa en la **Figura 5** y en la **Tabla 2** del **Anexo 1**, la mayor cantidad de semillas germinadas se obtuvieron cuando a las mismas se las inoculó y no se agregó hormona (IH0) e inoculó y aplicó exógenamente la fitohormona giberelinas (IH2), alcanzando el máximo valor de 97,5%. Luego siguieron las semillas no inoculadas más la adición de auxinas (AH1) con un valor de 96% y citocininas (AH3) con 95,5%, donde estos tratamiento tuvieron una mayor cantidad de semillas germinadas que el control sin inocular (AH0) el cual presentó el menor porcentaje de germinación con un valor del 90%, junto con el tratamiento inoculado con citocinina (IH3) que presentó un valor de 90,5%. Por lo que se podría concluir que la inoculación con *B. japonicum* E109 provoca una tendencia de aumento (sin diferencia estadísticamente significativa) sobre la germinación de semillas de soja.

La **Figura 6** y la **Tabla 3** del **Anexo 1**, representan el Poder Germinativo (PG) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) a base de *B. japonicum* E109, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

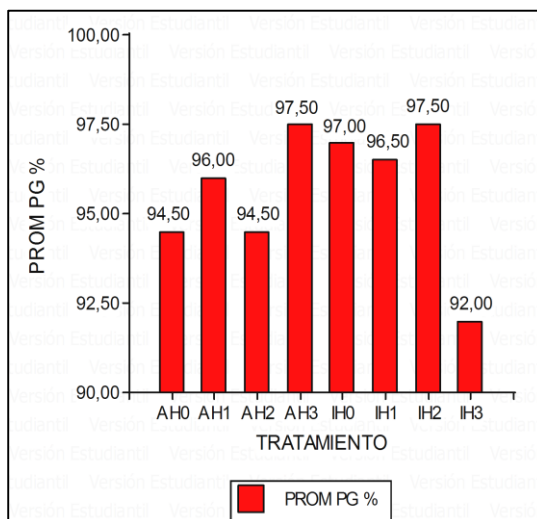


Figura 6: Evaluación de Poder Germinativo (PG) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) con *B. japonicum* y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de las siguientes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 8 días de crecimiento. Cada barra representa la media del tratamiento.

Como se observa en la **Figura 6** y **Tabla 3** del **Anexo 1**, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo en las semillas inoculadas y tratadas de manera exógena con giberelinas (IH2) y aquellas sin inocular más la adición de citocininas (AH3), ambas con el mismo valor de 97,5%. A continuación, siguieron las semillas inoculadas sin tratamiento hormonal (IH0) con un valor de 97% (la disminución en el número de semillas germinadas con respecto a los 5 días se debió a la muerte de semillas por ataque de hongos en las mismas) e inoculadas con auxinas (IH1) con 96,5%, mientras que el tratamiento que menor velocidad de germinación presentó fue el inoculado con citocininas (IH3) con 92%, cuyo porcentaje incluso fue menor que el control sin inocular (AH0) que presentó un valor de 94,5%.

Analizando los resultados obtenidos de la EG y el PG en semillas de soja, se podría decir que los tratamientos inoculados sin aplicación hormonal y con adición de giberelinas, a los 5 días presentaban el máximo porcentaje de semillas germinadas. Por otro lado, el tratamiento sin inocular pero con adición de citocininas alcanzó el mismo valor a los 8 días desde la siembra, donde el control presentó un comportamiento opuesto. Desde el punto de vista biológico, esto determinaría que la inoculación con *B. japonicum* E109 sería suficiente

para promover la germinación y se produciría sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de giberelinas.

5.1.2 Longitud del hipocótilo

La **Figura 7** y **Tabla 4** del **Anexo 2**, representan la longitud del hipocótilo (cm) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) a base de *B. japonicum* E109, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

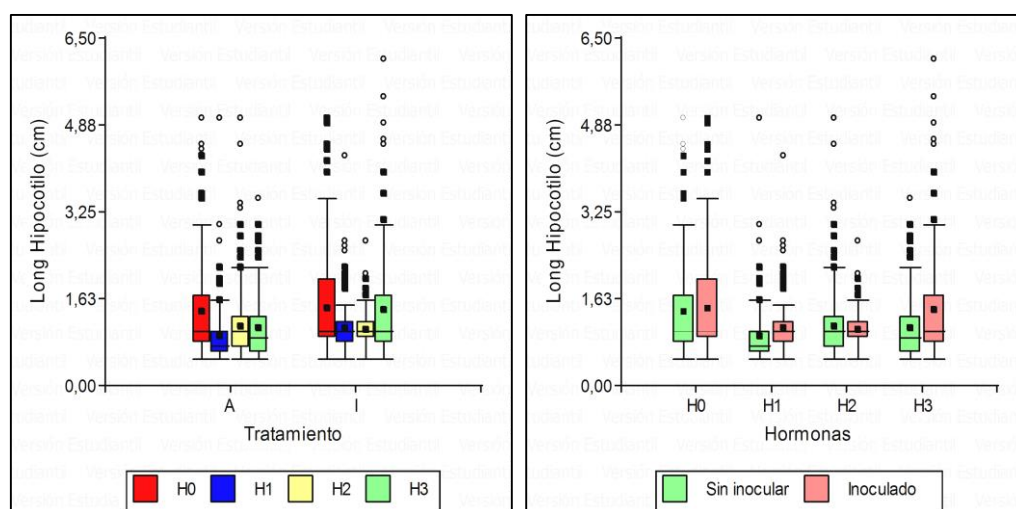


Figura 7: Diagramas de cajas (box-plot) obtenidos para la longitud del hipocótilo (cm) en semillas de soja inoculadas o sin inocular y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, luego de 8 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana, el punto la media y los círculos y rectángulos negros representan los datos extremos y atípicos para cada tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Como se observa en la **Figura 7** y **Tabla 4** del **Anexo 2**, la longitud del hipocótilo (considerada como crecimiento del hipocótilo) mostró datos atípicos y extremos en todos los tratamientos. Ninguna de las aplicaciones demostró un efecto sobresaliente sobre el crecimiento, ya que la mediana de la mayoría de los casos fue igual al control sin inocular (AH0) con un valor máximo de 1,0 cm en todos los casos. Las excepciones de este comportamiento se observaron en los tratamientos sin inocular con adicción exógena de auxina (AH1) con una disminución de 0,25 cm y citocininas (AH3) con una disminución de 0,10 cm. Así se concluye, que ninguno de los tratamientos generó un efecto en el crecimiento longitudinal del hipocótilo, ya que todos presentaron una longitud igual o menor al control sin inocular.

Debido a la cantidad de datos atípicos, la media no resultó apropiada para resumir la interacción de los tratamientos a través de gráficos. Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de fitohormonas en semillas no inoculadas e inoculadas. Los resultados determinaron que hubo evidencias estadísticamente significativas para que al menos un tratamiento produzca un efecto diferente sobre la longitud del hipocótilo ($p < 0,0001$ del **Anexo 2**). Para determinar que tratamiento se comportó mejor en cada caso particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios de todos los tratamientos. Los resultados de esta prueba se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 2: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis para los ocho tratamientos, a nivel de la longitud de hipocótilo.

Test a Posteriori					
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>				
AH1	492,16	A			
AH3	599,58		B		
AH2	639,20		B	C	
IH1	676,28		B	C	
IH2	695,70			C	D
AH0	762,69				D E
IH3	769,31				D E
IH0	802,64				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

De acuerdo con los resultados de la **Tabla 5**, hubo cinco grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos fueron: grupo A: AH1; grupo B: AH3, AH2, IH1; grupo C: AH2, IH1, IH2; grupo D: IH2, AH0, IH3 y grupo E: AH0, IH3, IH0. De los cinco grupos que se formaron los tratamientos que sobresalieron por presentar el menor rango fueron no inoculado más la adición exógena de auxinas (AH1) y citocininas (AH3) por lo que se puede asumir que estos tratamientos no tienen efecto en la longitud del hipocótilo. Por otro lado, los tratamientos que mostraron los rangos más grandes fueron inoculado sin adición de hormonas (IH0) que fue el mayor, luego inoculado con citocininas (IH3) y por último el tratamiento control sin inocular (AH0).

Así, podemos resumir que la variable longitud del hipocótilo no presentó mayores cambios para los tratamientos evaluados; sin embargo, los tratamientos que presentaron una tendencia de incremento de la longitud del hipocótilo mayor que el control no inoculado,

fueron inoculado sin aplicación de hormonas e inoculado más adición exógena de citocininas a pesar de que no se diferenciaron estadísticamente.

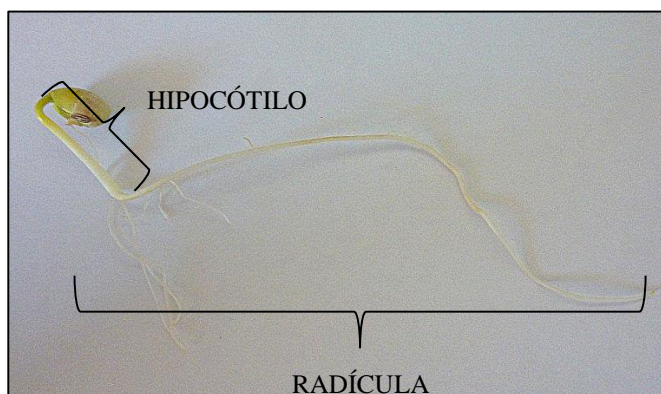


Figura 8: Estructuras de crecimiento post-germinativo (hipocótilo y raíz) de plántulas de soja luego de 8 días desde la siembra.

5.1.3 Longitud de la raíz

La **Figura 9** y **Tabla 6** del **Anexo 3**, representan la longitud de la raíz (cm) en semillas de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) a base de *B. japonicum* E109, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

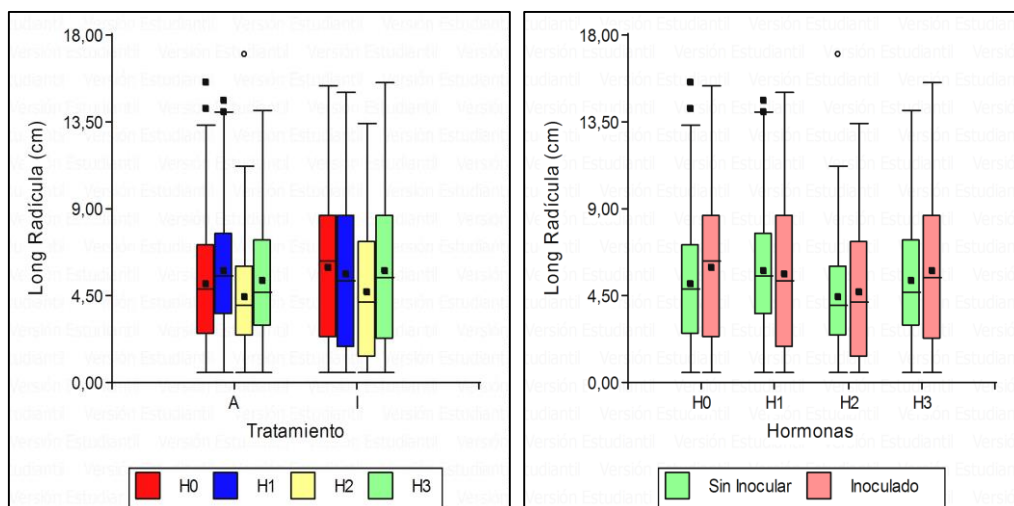


Figura 9: Diagramas de cajas (box-plot) obtenidos para la longitud de la raíz (cm) en semillas de soja inoculadas o sin inocular y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, luego de 8 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana, el punto la media y los círculos y rectángulos negros representan los datos extremos y atípicos para cada tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

La **Figura 9** y la **Tabla 6** del **Anexo 3** muestran la longitud de la raíz (cm) como parámetro de crecimiento radical. Se observó en los tratamientos sin inoculación datos atípicos (AH0, AH1) y datos extremos (AH2). Esto no ocurrió en los tratamientos inoculados, pero en ellos si se determinó una mayor dispersión de datos del parámetro, tanto en el 50% de los valores centrales como en el 25 % de los valores superiores. El efecto de mayor promoción del crecimiento se observó en los tratamientos inoculado sin hormonas (IH0) con un valor de 6,30 cm, no inoculado con auxinas (AH1) con un valor de 5,50 cm; inoculado con citocininas (IH3) con 5,45 cm e inoculado con auxinas (IH1) con 5,30 cm. A modo general, la menor mediana se manifestó en las semillas en las que se aplicó giberelinas (H2), independientemente si se inoculó o no, tal como cuando no se inoculó con un valor de 4,00 cm e inoculado con un valor de 4,20 cm, que presentaron menor longitud incluso que el control no inoculado (AH0) con 4,80 cm. Este comportamiento fue además observado en el tratamiento no inoculado con citocininas (AH3), con un valor de longitud de 4,70 cm, por lo que ambas fitohormonas parecerían tener un efecto inhibitorio sobre la elongación de la raíz. Por lo que se concluye que las hormonas giberelinas y citocininas (cuando no se inoculó) generaron un efecto inhibitorio en el crecimiento radicular de semillas de soja, mientras que cuando se aplicó auxinas en semillas inoculadas o no, produjo aumentos en la longitud de la raíz. A pesar de esto el mayor crecimiento longitudinal radicular se determinó en el tratamiento inoculado sin la aplicación de hormonas, donde la longitud de este fue aproximadamente 1 cm más larga que en las que se aplicó auxinas.

La **Figura 10** representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas sobre la longitud radicular de semillas de soja luego de 8 días de crecimiento.

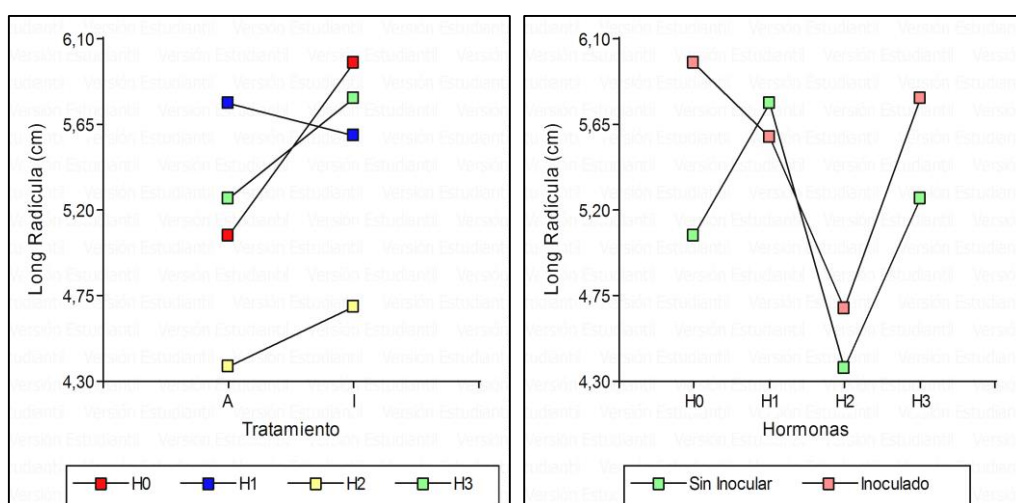


Figura 10: Interacción entre la aplicación exógena de hormonas e inoculación obtenidos para la longitud de la raíz (cm) en semillas de soja, luego de 8 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los

rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 10** se observa que en el ensayo hubo indicios de interacción entre la inoculación (A o I) y la aplicación exógena de hormonas. De manera general se observa que el ácido giberélico, tiene un efecto inhibitor sobre la longitud de la radícula, independientemente de que si las semillas se inocularon o no. Todos los tratamientos inoculados con excepción auxinas, presentaron mayor longitud de radícula en comparación con sus controles no inoculados. Cuando las semillas fueron inoculadas, se observó una tendencia de aumento de la longitud media de la radícula, pero sin evidenciarse una diferencia marcada por la adición exógena de alguna de las hormonas (H1, H2 y H3), ya que cuando no se aplicó hormona se obtuvo la mayor elongación de radícula. Lo que determinaría que la inoculación sería suficiente para promover el crecimiento radicular no haciendo falta la aplicación exógena de alguna hormona. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se produjo mayor longitud media con la adición exógena de auxinas y citocininas, en comparación con el control. Lo que determinaría que la adición exógena de auxinas y citocininas, sin la inoculación tendría un efecto promotor en el crecimiento.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular e inoculadas. Los resultados determinaron que ambos tratamientos (A e I), tuvieron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjera un efecto diferente sobre la longitud de la radícula ($p=0,0002$, $p=0,0115$ del **Anexo 3**). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios de la longitud de la radícula. Los resultados de esta prueba se resumen en las **Tablas 7 y 8**.

Tabla 3: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas no inoculadas, a nivel de la longitud radicular.

Test a Posteriori			
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>		
H2	330,01	A	
H0	378,76		B
H3	391,73		B C
H1	430,48		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 7**, hubo 3 grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí, que fueron: A: H2; B: H0, H3 y C: H3, H1. La hormona en

la que se observó el rango más pequeño fue con el ácido giberélico, por lo que se podría asumir que la aplicación de este compuesto provocaría una menor elongación de la radícula; contrariamente, la hormona que presentó el mayor rango de elongación fue auxina. El tratamiento de no inoculación de las semillas, más la aplicación de esta hormona, generó efectos positivos sobre la elongación de la radícula, que se diferenció estadísticamente del tratamiento control.

Tabla 4: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas inoculadas, a nivel de la longitud de la radícula.

Test a Posteriori		
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>	
H2	339,86	A
H1	386,26	B
H3	397,59	B
H0	409,42	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 8**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H2 y B: H1, H3, H0. La hormona en el que se observó el rango más pequeño al igual que cuando no se inoculó fue giberelina, por lo que se puede asumir que el ácido giberélico es la fitohormona que generó menor elongación de la radícula. El tratamiento que presentó un efecto positivo fue el control, seguido del tratamiento con citocininas y por último con auxinas. Por lo tanto la inoculación sin adición de hormonas sería suficiente para promover el crecimiento de la radícula.

En resumen, en los tratamientos con giberelinas se generó una disminución en la longitud de la radícula, sin importar la condición de inoculación, lo que determinaría que la presencia de la hormona es condicionante del efecto de la bacteria. Desde el punto de vista biológico, esto determinaría que la inoculación con *B. japonicum* E109 sin aplicación de hormonas, sería suficiente para promover el crecimiento de la radícula, ya que estadísticamente no se comprobó evidencias de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de auxinas y citocininas pero si se comprobó un efecto antagónico por la aplicación con giberelinas. Por lo que se presupone que el inoculante contendría auxinas y citocininas, las que determinaron un aumento de la longitud de la radícula cuando a las semillas no se las inoculó.

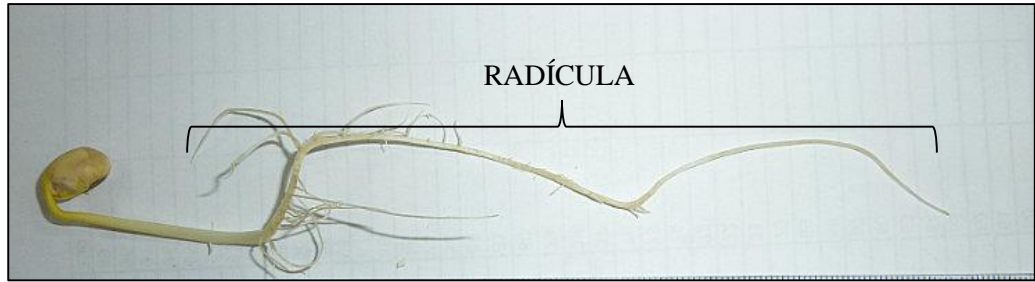


Figura 11: Estructuras de crecimiento post-germinativo (radícula) de plántulas de soja luego de 8 días desde la siembra.

5.2 Ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo

5.2.1 Peso fresco y seco aéreo

La **Figura 12** y las **Tablas 9-10** del **Anexo 4**, representan el peso fresco y seco aéreo (cm), en plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

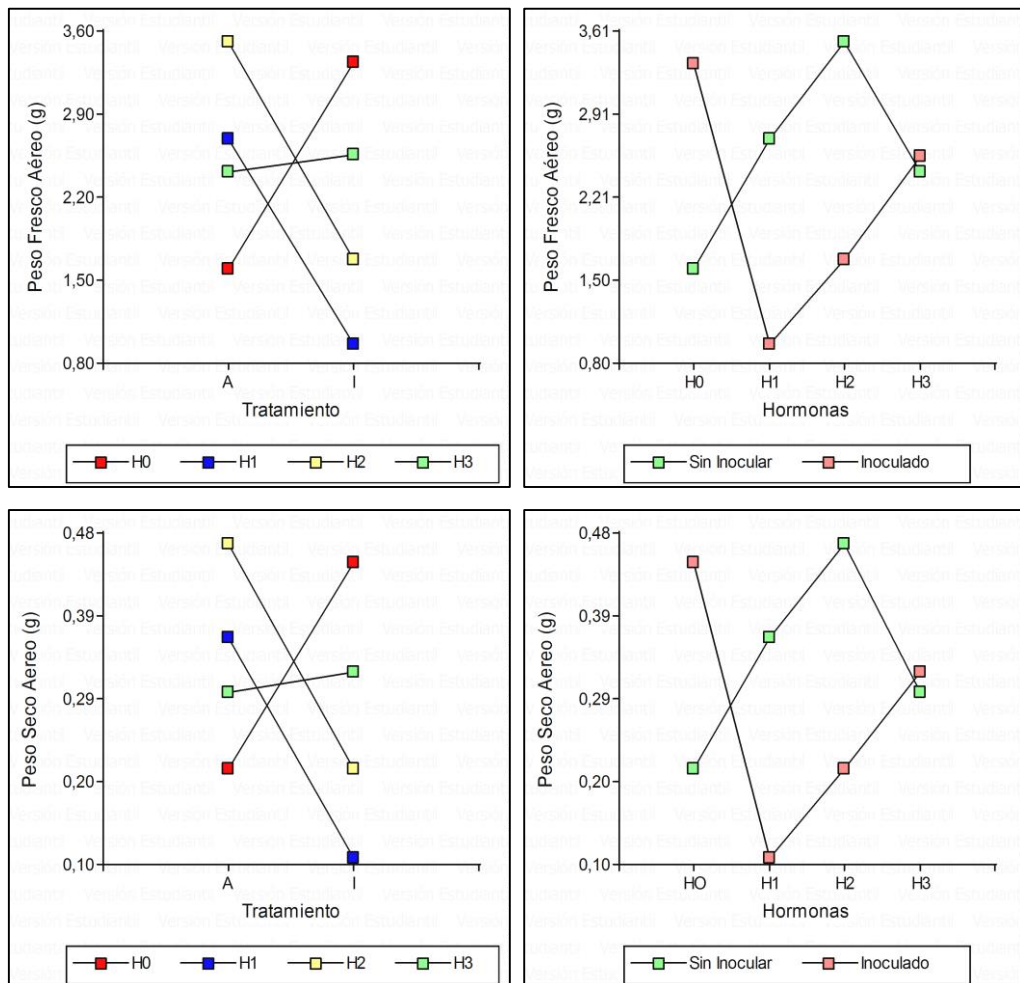


Figura 12: Interacción entre aplicación exógena de hormonas e inoculación obtenidos para el peso fresco y seco aéreo (g) de plántulas de soja, luego de 14 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 12** y **Tablas 9-10** del **Anexo 4**, se observa que en el ensayo hubo indicio de interacción, entre tipo de inoculación (A o I) y la aplicación de hormonas. Tanto el peso fresco como seco aéreo tuvieron el mismo comportamiento. El mayor incremento de la producción de biomasa, expresado como peso fresco y seco aéreo (g), se determinó en el tratamiento no inoculado con adición exógena de giberelinas (AH2) con valores de 3,51 g - 0,47 g respectivamente e inoculado sin aplicación de hormonas (IH0) con 3,33 g - 0,45 g. El menor crecimiento medio se manifestó en el tratamiento inoculado con aplicación de auxinas (IH1) con 0,96 g - 0,11 g, donde este incluso presentó menor peso aéreo que el tratamiento control (AH0) con valores de 1,59 g - 0,21 g. En el caso en que se aplicó la hormona citocinina (H3), el peso fresco y seco medio aéreo fue similar para los dos tipos de tratamientos (AH3:2,42 g – IH3: 2,55 g - AH3: 0,30 g – IH3: 0,32 g). Así, podemos resumir que cuando las semillas no fueron inoculadas la aplicación de giberelina (H2) fue el tratamiento que presentó mayor peso tanto fresco como seco aéreo, mientras que las otras hormonas (H1, H3) presentaron una tendencia de aumento del peso, con respecto al control (H0) que fue el tratamiento que manifestó el menor peso. En el caso de los tratamientos inoculados ocurrió todo lo contrario, el tratamiento sin aplicación hormonal es el que presentó el mayor peso, en comparación con los tratamientos en los que se aplicó las distintas hormonas (H1, H2, H3), por lo que desde el punto de vista biológico, esto determinaría que la inoculación con *B. japonicum* E109 sería suficiente para promover un aumento de la biomasa aérea. Mientras que las hormonas auxinas y giberelinas, junto con la inoculación parecen tener un efecto antagónico en el aumento de la biomasa.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular o inoculadas. Los resultados determinaron que en ambos tratamientos (A o I) no hubo evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjera un efecto diferente sobre el peso fresco ($p=0,1129$, $p=0,0703$ del **Anexo 4**) y seco aéreo ($p=0,1112$, $p=0,0695$ del **Anexo 4**).

5.2.2 Peso fresco y seco radical

La **Figura 13** y las **Tablas 11-12** del **Anexo 5**, representan el peso fresco y seco radical (cm) en plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

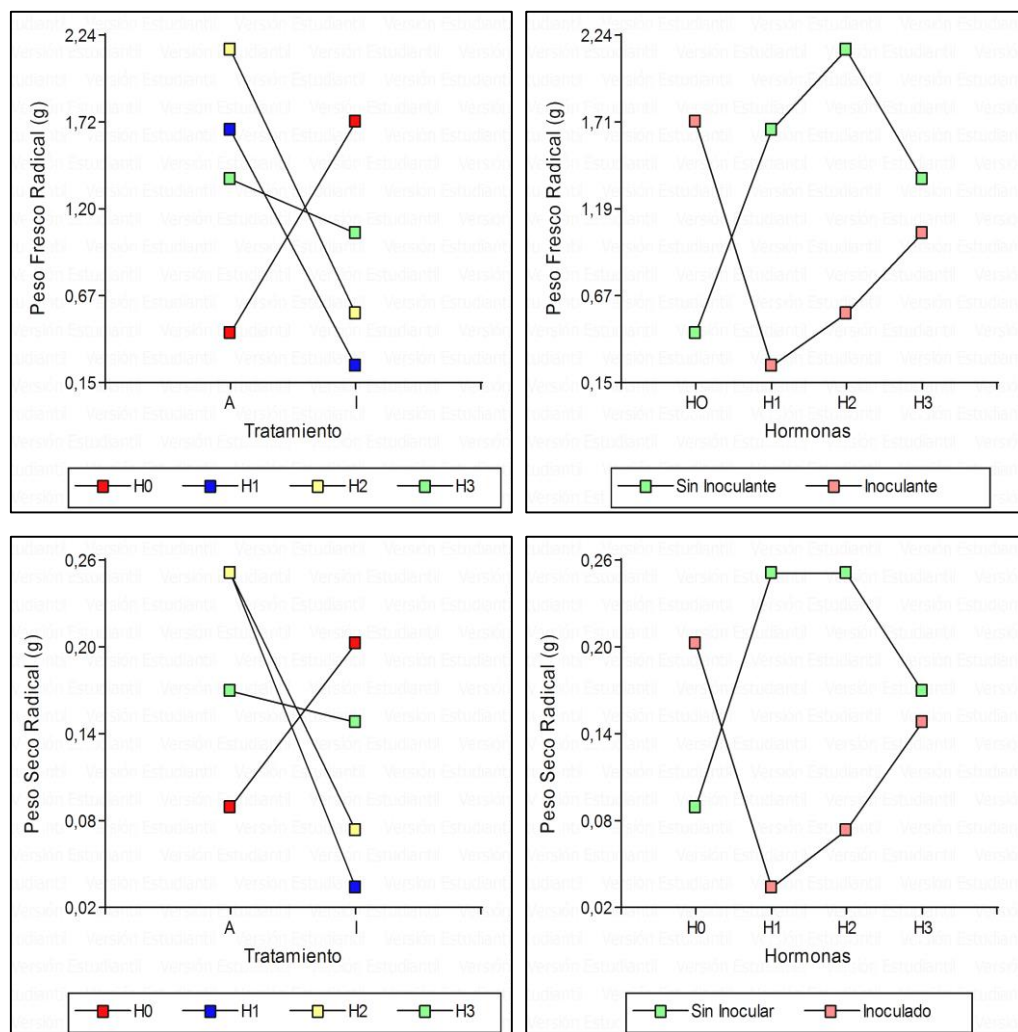


Figura 13: Interacción entre aplicación exógena de hormonas e inoculación obtenidos para el peso fresco y seco radical (g) de plántulas de soja, luego de 14 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 13** y las **Tablas 11-12** del **Anexo 5**, se observa que en el ensayo hubo indicio de interacción, entre tipo de inoculación (A o I) y la aplicación de hormonas. El comportamiento de los tratamientos en cuanto al peso fresco y seco radical fue muy similar. La mayor promoción en el crecimiento como peso fresco radical (g), se determinó en los tratamientos sin inocular con giberelinas (AH2) con un valor de 2,15 g e inoculado sin la

aplicación de hormonas (IH0) con 1,72 g. Y el menor crecimiento se manifestó en el tratamiento inoculado con auxinas (IH1) con 0,25 g, donde este incluso presentó menor peso fresco que el tratamiento control (AH0) con un valor de 0,45 g. La mayor promoción en el crecimiento como peso seco radical (g), se manifestó en el tratamiento no inoculado con adición auxinas (AH1), giberelinas (AH2) con igual valor de 0,25 g e inoculado sin aplicación de hormonas (IH0) con 0,20 g. El menor crecimiento se determinó en el tratamiento inoculado con auxina (IH1) con 0,03 g y con giberelina (IH2) con 0,07 g, donde estos incluso presentaron menor peso seco radical que el tratamiento control (AH0) con 0,09cm. En el caso en que se aplicó citocininas (H3), el peso fresco y seco radical medio fue similar para los dos tipos de tratamientos (AH3:1,37 g – IH3: 1,04 g - AH3: 0,17g – IH3: 0,15g). Analizando, se destaca que cuando a las semillas no se inocularon, hubo un incremento de la producción de biomasa expresado como peso fresco y seco radical, con la adición de las distintas soluciones de hormonas (H1, H2, H3). Donde las hormonas auxinas y giberelinas fueron la que presentaron el mayor aumento de biomasa como peso seco y el ácido giberélico como peso fresco. Mientras que cuando a las semillas se las inoculó, se generó una disminución en el peso fresco y seco radical con la aplicación de hormonas (H1, H2, H3). Lo que determinaría en este caso que la inoculación sin la aplicación de hormonas es el tratamiento que generó la mayor biomasa radical.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular e inoculadas. Los resultados determinaron que en ambos tratamientos (A o I) no hubo evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjera un efecto diferente sobre el peso fresco radical ($p=0,0902$, $p=0,0522$ del **Anexo 5**). Por otro lado, para el peso seco radical en el tratamiento sin inocular (A) no hubo evidencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de alguna hormona fue distinto ($p=0,0862$ del **Anexo 5**), mientras que en el tratamiento inoculado (I) hubo evidencias estadísticamente significativas ($p=0,0476$ del **Anexo 5**). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso en particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios del peso seco radical. Los resultados de esta prueba se resumen en la **Tabla 13**.

Tabla 5: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas inoculadas, a nivel del peso seco radical.

Test a Posteriori

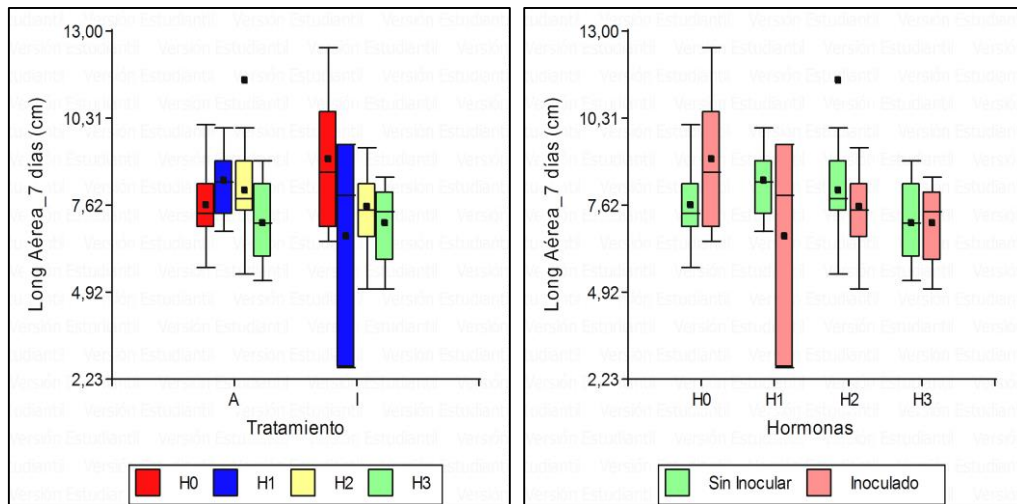
Tratamiento	Ranking		
H1	2,67	A	
H2	4,67	A	B
H3	9,00		B
H0	9,67		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 13**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son, A: H1, H2 y B: H2, H3, H0. La hormona en el que se observó el rango más pequeño es H1, por lo que se puede asumir que la hormona auxina es la generó el menor peso de la raíz. Mientras que los tratamientos que muestran los rangos más grandes son H0 que es el mayor, luego siguen H3 y por último H2. La inoculación sin el agregado de hormonas, fue suficiente para estimular el crecimiento de la raíz, por lo que se determinaría que el inoculante sería capaz de inducir el crecimiento en volumen de la raíz independiente de la presencia de tales hormonas.

5.2.3 Longitud aérea

La **Figura 14** y las **Tablas 14-15** del **Anexo 6**, representan la longitud aérea (cm), en plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.



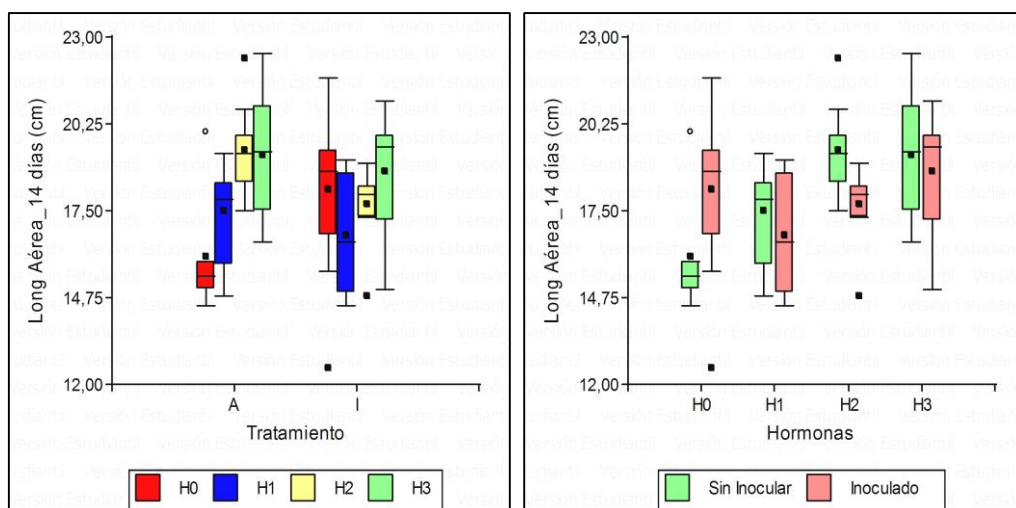


Figura 14: Diagramas de cajas (box-plot) obtenidos para la longitud aérea (cm) en plántulas de soja inoculadas o sin inocular y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, luego de 7 y 14 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana, el punto la media y los círculos y rectángulos negros representan los datos atípicos para cada tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En la **Figura 14** y las **Tablas 14-15** del **Anexo 6**, se puede observar que efecto de los tratamientos en el crecimiento aéreo de las plántulas de soja a los 7 y 14 días fue distinto. A los 7 días la mayor promoción en el crecimiento como longitud aérea se manifestó en los tratamientos inoculado sin adición de hormona (IH0) con un valor de 8,65 cm y no inoculado con aplicación de auxinas (AH1) con 8,35 cm. Mientras que a los 14 días fueron los tratamientos con adición exógena de citocininas cuando se inoculó (IH3) con 19,50 cm y no se inoculó (AH3) con 19,35 cm y así como no inoculado con giberelinas (AH2) con 19,30 cm. La menor mediana se manifestó a los 7 días en el tratamiento no inoculado con citocininas (AH3) con 7,05 cm, en el control (AH0) con 7,35 cm, inoculado con citocininas (IH3) con 7,40 cm e inoculado con ácido giberélico (IH2) con 7,45 cm; mientras que a los 14 días con 15,45 cm en el tratamiento control (AH0) que se alejó bastante de los demás. A modo de resumen, se concluye que a los 7 días la aplicación exógena de auxinas y giberelinas, sin inoculación tendría un efecto promotor en el crecimiento a nivel de la longitud aérea; mientras que la aplicación de citocininas parecería no tener efecto, ya que mostró valores menores que el control (AH0); en contrapartida a los 14 días la fitohormona citocinina tuvo un comportamiento totalmente opuesto al de los 7 días, mostró los mayores valores de mediana junto con giberelinas. Cuando las semillas fueron inoculadas, a los 7 días el tratamiento sin aplicación exógena de alguna fitohormona fue suficiente para promover la longitud aérea de las plántulas de soja; mientras que a los 14 días, la hormona citocinina mostró la mayor longitud aérea de las plántulas de soja incluso mayor que el tratamiento inoculado sin adicción de fitohormonas.



Figura 15: Plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.



Figura 16: Plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

La **Figura 17** representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de soja, luego de 7 y 14 días de crecimiento.

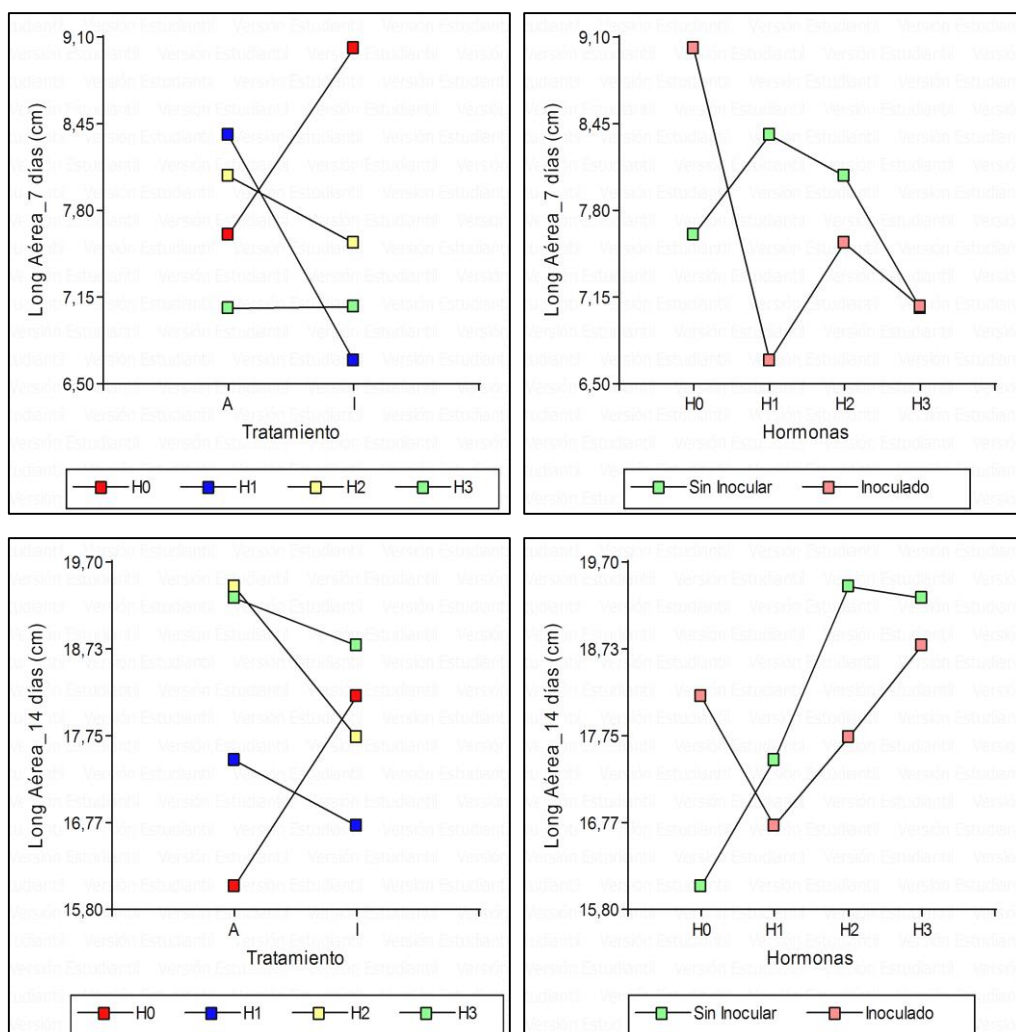


Figura 17: Interacción entre aplicación exógena de hormonas e inoculación, obtenidos para la longitud aérea (cm) de plántulas de soja, luego de 7 y 14 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 17** se observa que en el ensayo hubo indicios de interacción entre la inoculación (A o I) y la aplicación exógena de hormonas. Al igual que en la **Figura 14**, la mayor media la presentaron los tratamientos inoculado sin hormonas con un valor de 9,02 cm y no inoculado con auxinas con 8,36 cm a los 7 días; mientras que a los 14 la presentaron los tratamientos no inoculado con adición exógena de ácido giberélico con 19,43 cm y citocininas con 19,29 cm. El menor crecimiento a los 7 días se manifestó en los tratamientos inoculado con adición de auxinas con 6,67 cm, no inoculado e inoculado con aplicación exógena de citocininas con 7,06 cm (AH3) y 7,08 cm (IH3) e inoculado con giberelinas con

7,55 cm, donde incluso estos tratamientos mostraron menor longitud media aérea que el tratamiento control (AH0) con 7,62 cm. A los 14 días el menor crecimiento correspondió al tratamiento control (AH0) con 16,05 cm, y a los tratamientos en los que se aplicó exógenamente auxinas, con 16,74 cm (IH1) y con 17,48 cm (AH1). Así, se concluye que cuando las semillas no se inocularon y se aplicaron las distintas fitohormonas se generaron respuestas positivas sobre el crecimiento temprano de las plántulas de soja a los 14 días; mientras que a los 7 días la excepción fue la hormona citocinina que presentó el menor crecimiento longitudinal aéreo. No fue así a los 7 días, cuando a las semillas se las inoculó y agregó las diferentes fitohormonas tuvieron un efecto negativo en el crecimiento medio aéreo, mientras que a los 14 días, la hormona citocinina mostró un aumento de la longitud aérea.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular e inoculadas. Los resultados demostraron que para variable la longitud aérea en ambos tratamientos no hubo evidencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de alguna de las hormonas fue distinto ($p=0,3039$, $p=0,1816$ del **Anexo 6**) a los 7 días; mientras que a los 14 días en los tratamientos inoculados tampoco hubo evidencias estadísticamente significativas ($p=0,1008$ del **Anexo 6**), pero si la hubo en el tratamiento sin inocular ($p=0,0087$ del **Anexo 6**). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso en particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios de la longitud aérea. Los resultados de esta prueba se resumen en la **Tabla 16**.

Tabla 6: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas no inoculadas, a nivel de la longitud aérea a los 14 días desde la siembra.

Test a Posteriori				
Tratamiento	Ranking			
H0	8,50	A		
H1	13,75	A	B	
H3	23,25		B	C
H2	23,81			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 16**, hay tres grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son, A: H0, H1; B: H1, H3 y C: H3, H2. El tratamiento en el que se observó el menor crecimiento fue sin aplicación de hormonas, por lo que se puede asumir que la aplicación de cualquier hormona generó un aumento a nivel longitudinal aérea. Por otro lado, las hormonas que mostraron los rangos más grandes fueron giberelinas, luego seguido de citocininas. En el caso de las semillas inoculadas no se

registraron diferencias estadísticas significativas, pero se puede asumir que la inoculación más la aplicación exógena de la fitohormona citocinina mostró efectos positivos en la promoción del crecimiento de la longitud aérea.

5.2.4 Longitud láminar

La **Figura 18** y las **Tablas 17-18** del **Anexo 7**, representan la longitud laminar o longitud de la lámina foliar (cm) en plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

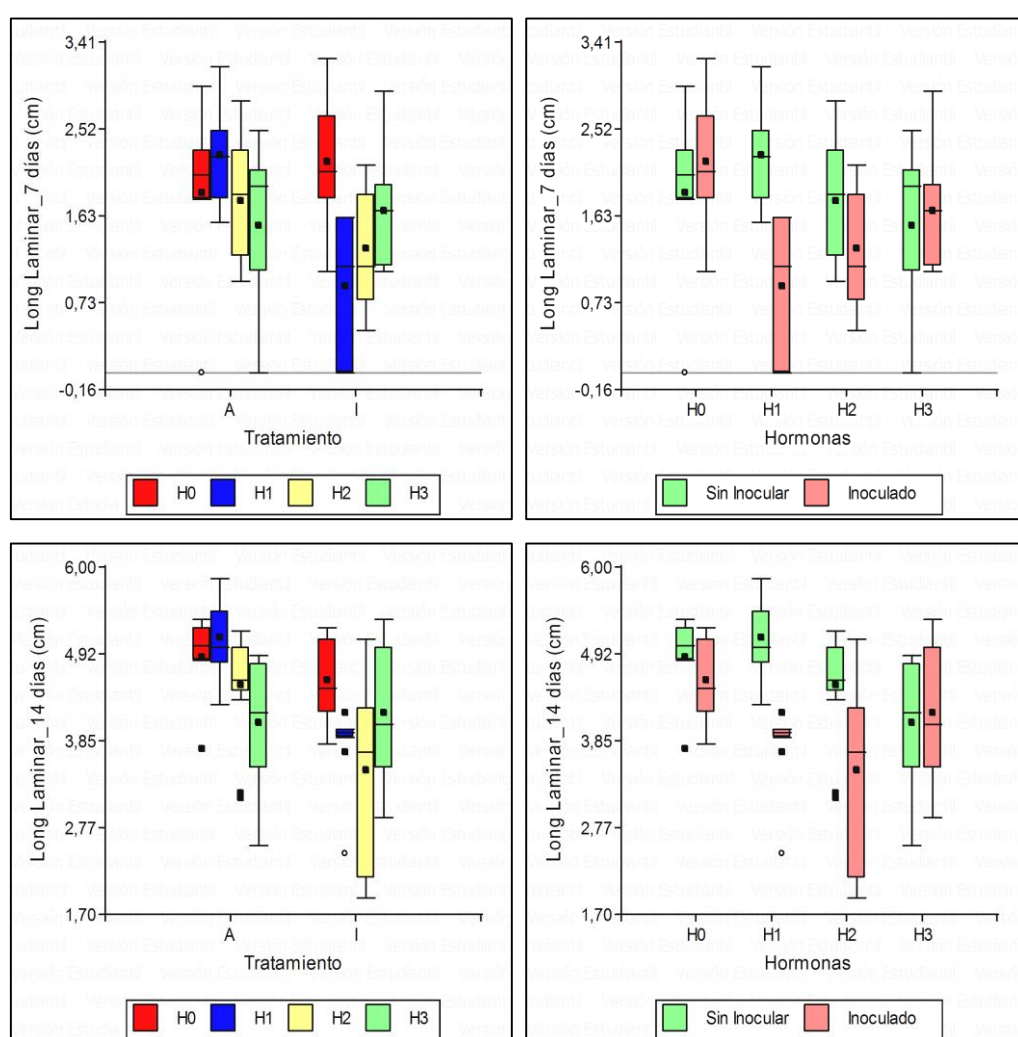


Figura 18: Diagramas de cajas (box-plot) obtenidos para la longitud laminar (cm) en semillas de soja inoculadas o sin inocular y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, luego de 7 y 14 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana, el punto la media y los círculos y rectángulos negros representan los datos extremos y atípicos para cada tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En la **figura 18** y las **Tablas 17-18** del **Anexo 7**, se observa que algunos tratamientos presentaron datos atípicos y el efecto de cada tratamiento sobre el crecimiento laminar fue diferencial. La mayor promoción de crecimiento laminar se verificó en los tratamientos no inoculado con auxinas (AH1) con un valor de 2,23 cm, inoculado sin adicción de hormonas (IH0) con 2,08 cm y en el control (AH0) con 2,05 cm a los 7 días; mientras que a los 14 fueron los tratamientos control (AH0) con 5,03 cm y no inoculado con auxinas (AH1) con 5,00 cm, lo que determinaría que la inoculación a los 7 días y la adición sola de la fitohormona auxina a los 7 y 14 días tendrían una tendencia de aumento del crecimiento, donde el tratamiento control (AH0) presentó valores muy similares a estos tratamientos. Tanto a los 7 como a los 14 días, los valores más bajos para las medianas se obtuvieron en los tratamientos inoculado con giberelinas (IH2) con 1,10 cm (7 días) y 3,70 cm (14 días) e inoculado con auxinas (IH1) con 1,10 cm (7 días) y 3,95 cm (14 días), lo que determinaría que la inoculación más la aplicación de fitohormonas auxinas o giberelinas tendrían un efecto negativo sobre este parámetro. Aquellos tratamientos en los que se aplicaron citocininas mostraron resultados similares en plantas sin inocular (AH3) con un valor de 1,93 cm e inoculadas (IH3) con 1,68 cm ocurriendo esto tanto a los 7 como a los 14 días, donde los valores de los 14 días fueron no inoculado (AH3) con un 4,20 cm e inoculado (IH3) con 4,05 cm. En resumen, la aplicación de fitohormonas independientemente del tratamiento de inoculación (A o I), parece no tener efectos en el crecimiento longitudinal laminar, por lo que se podría suponer que la interacción del inoculante (A o I) con ciertas fitohormonas, provocaría un retraso del crecimiento de la lámina foliar en hojas verdaderas de plántulas de soja ya que en ambos tratamientos las mayores longitudes se obtuvieron cuando no se aplicaban fitohormonas. La única excepción se manifestó con la aplicación de auxinas cuando las semillas no se inocularon, donde esta fitohormona a los 7 días mostró resultados superiores al control y a los 14 similares.

La **Figura 19** representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas sobre la longitud de la lámina foliar de semillas de soja luego de 7 y 14 días de crecimiento.

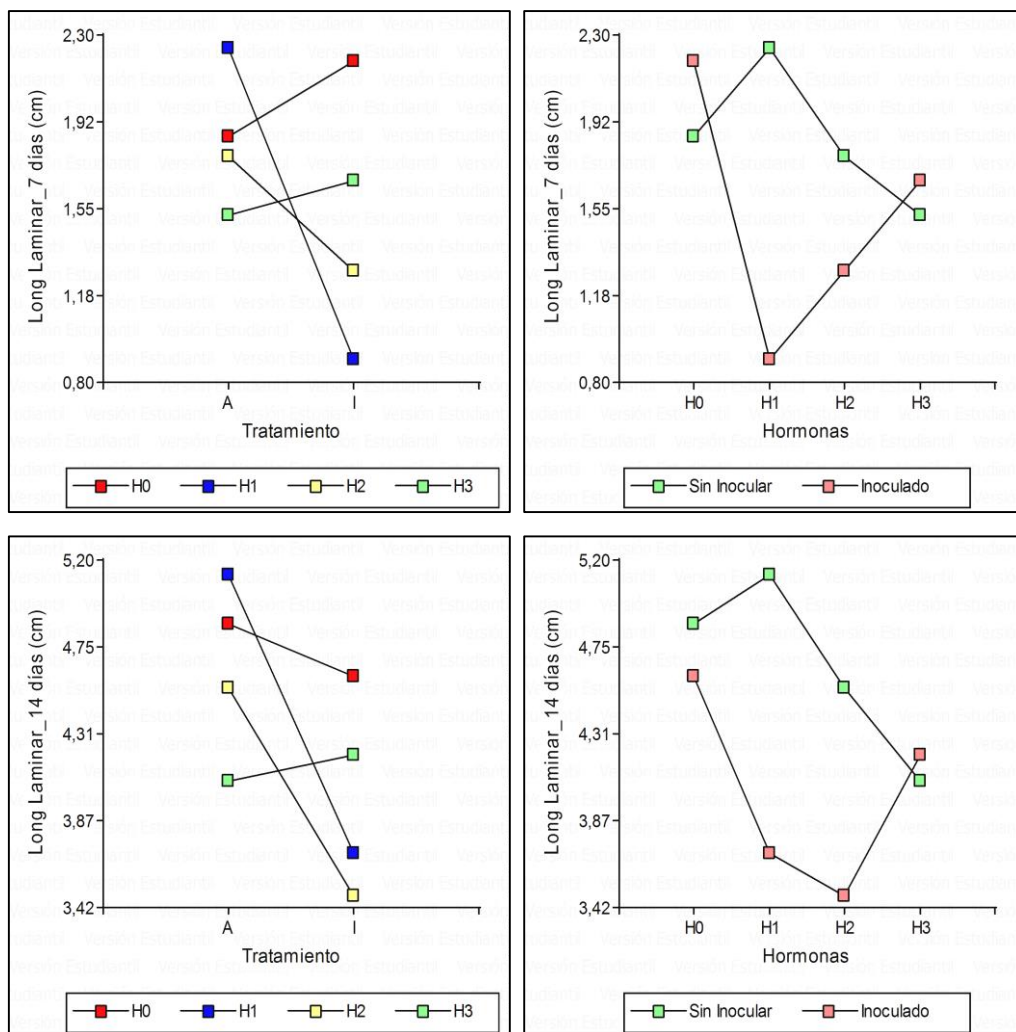


Figura 19: Interacción entre aplicación exógena de hormonas e inoculación obtenidos para la longitud laminar (cm) de plántulas de soja, luego de 7 y 14 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 19**, se observa que en el ensayo hubo indicio de interacción, entre tipo de inoculación (A o I) y la aplicación de hormonas. El mayor valor de la media lo presentaron los tratamientos no inoculado con auxinas con un valor de 2,24 cm e inoculado sin aplicación de fitohormonas con 2,18 cm, a los 7 días; mientras que a los 14 días, los tratamientos no inoculado con auxinas con un valor de 5,13 cm y el tratamiento control con 4,88 cm, lo que determinaría que la adición de auxinas, aún sin inoculación tendría un efecto positivo sobre el parámetro evaluado. En contrapartida, la menor elongación de la lámina foliar se manifestó en el tratamiento inoculado con auxinas con 0,90 cm a los 7 días desde la siembra, el que se diferenció marcadamente de los demás. A los 14 días los tratamientos con menor valor de la media fueron el tratamiento inoculado con giberelinas con un valor de 3,48

cm y auxinas con 3,70 cm, por lo que se podría remarcar que las semillas no inoculadas mostraron mayores longitudes laminares que los tratamientos en los que se las inoculó, tanto a los 7 como 14 días. Por otro lado, en las semillas sin inocular y con la adición exógena de giberelinas y citocininas tampoco se evidenció un efecto promotor en el crecimiento por lo que se desprendería que las únicas hormonas con capacidad de inducir un efecto promotor de este parámetro cuando las semillas no se inocularon serían las auxinas.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular e inoculadas. Los resultados determinaron que en los tratamientos sin inocular no hubo evidencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de alguna hormona fue distinto ($p=0,3510$ del **Anexo 7**); mientras que en el caso de las semillas inoculadas si tuvieron evidencias estadísticamente significativas a los 7 días desde la siembra ($p=0,0254$ del **Anexo 7**). Por otro lado, a los 14 días se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0183$, $p=0,0404$ del **Anexo 7**) en ambos tratamientos. Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios de la longitud laminar. Los resultados de esta prueba se resumen en las **Tablas 19, 20 y 21**.

Tabla 7: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas inoculadas, a nivel de la longitud laminar a los 7 días desde la siembra.

Test a Posteriori		
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>	
H1	8,17	A
H2	12,13	A
H3	16,30	A B
H0	23,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 19**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H1, H2, H3 y B: H3, H0. Las hormonas en las que se observaron los rangos más pequeños fueron auxinas y ácido giberélico; mientras que el control inoculado sin adición de hormonas mostró el rango más grande. En base a estos resultados, se podría asumir que la aplicación de auxinas y giberelinas junto a la inoculación no determinarían cambios sobre el crecimiento de la lámina foliar; mientras que la inoculación sin la aplicación de hormonas si los generaría. Desde el punto de vista biológico, esto determinaría que la inoculación con *B. japonicum* E109 sería suficiente para promover el crecimiento de la longitud laminar ya que no se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición

exógena de citocininas pero si se comprobó un efecto antagónico por la aplicación combinada con auxinas o giberelinas.

Tabla 8: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas no inoculadas, a nivel de la longitud laminar a los 14 días desde la siembra.

Test a Posteriori			
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>		
H3	11,35	A	
H2	18,04	A	B
H0	24,50		B
H1	26,00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 20**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H3, H2 y B: H2, H0, H1. La fitohormona en la que se observó el menor rango fue citocinina; mientras que la hormona que mostró el rango más grande fue auxina, junto con el tratamiento control. Con estos resultados se podría asumir que la aplicación de giberelinas y citocininas no inducirían cambios en la longitud laminar a los 14 días desde la siembra; mientras que la aplicación de auxinas a pesar que no se diferenció estadísticamente del tratamiento control, parece tener un efecto positivo manifestando una tendencia de aumento del crecimiento longitudinal laminar.

Tabla 9: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas inoculadas, a nivel de la longitud laminar a los 14 días desde la siembra.

Test a Posteriori			
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>		
H1	11,80	A	
H2	12,88	A	
H3	19,05	A	B
H0	24,54		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 21**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H1, H2, H3 y B: H3, H0. Las hormonas en las que se observaron los menores rangos fueron auxinas y ácido giberélico; mientras que la no aplicación de hormonas mostró el rango más grande. La inoculación, más la aplicación de auxinas y giberelinas no tuvo efecto sobre la longitud laminar a los 14 días de crecimiento. Por lo que se concluye lo mismo que a los 7 días la inoculación de las semillas sin el agregado de fitohormonas sería suficiente para producir efectos sobre este parámetro.

5.2.5 Longitud Radical

La **Figura 20** y la **Tabla 22** del **Anexo 8**, representan la longitud radical (cm), en plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

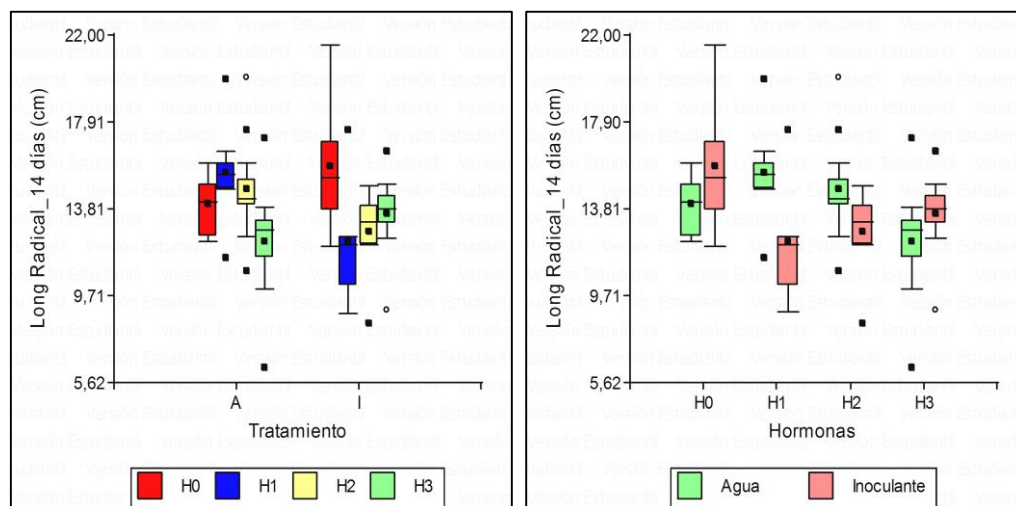


Figura 20: Diagramas de cajas (box-plot) obtenidos para la longitud radical (cm) en semillas de soja inoculadas o sin inocular y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, luego de 14 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana, el punto la media y los círculos y rectángulos negros representan los datos extremos y atípicos para cada tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En la **figura 20** y la **Tabla 22** del **Anexo 8** se observa que algunos tratamientos presentaron datos atípicos y extremos. La mayor promoción en el crecimiento como longitud radical se comprobó en los tratamientos no inoculado con auxinas (AH1) con un valor de 15,40 cm e inoculado sin la adición exógena de hormonas (IH0) con 15,25 cm; mientras que las menores medianas las tuvieron los tratamientos inoculado con auxinas (IH1) con 12,10 cm y no inoculado con citocininas (AH3) con 12,80 cm. Éstos, junto con los tratamientos inoculado con giberelinas (IH2) con 13,20 cm e inoculado con citocininas (IH3) con 13,80 cm presentaron un valor de mediana menor al control (AH0) con un valor de 14,15 cm. Analizando estos resultados se determinaría que el comportamiento de los dos tipos de tratamiento (A o I) cuando se aplicó las distintas soluciones de fitohormonas, fue opuesto. Cuando las semillas no se inocularon, una de las mayores medianas de la longitud radical, se alcanzó cuando se aplicó auxinas, en tanto que cuando se inocularon se obtuvo una de las menores medianas. Esta situación también se determinó con la adición de giberelinas.



Figura 21: Raíces obtenidas de plántulas de soja emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

La **Figura 22** representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de soja, luego de 14 días de crecimiento.

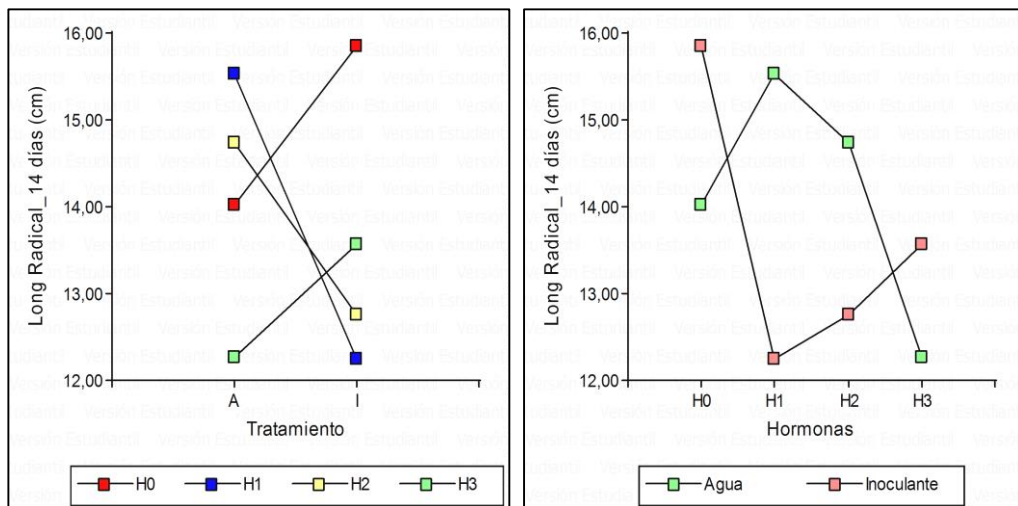


Figura 22: Interacción entre aplicación exógena de hormonas e inoculación, obtenidos para la longitud radical (cm) de plántulas de soja, luego de 14 días de crecimiento. La línea representa la tendencia positiva o negativa de la interacción entre cada tipo de aplicación; mientras que los rectángulos de color la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

En el **Figura 22** se observa que a nivel de ensayo hubo indicio de interacción entre la inoculación y la aplicación de hormonas. Al igual que la **Figura 20**, la mayor media la presentaron los tratamientos inoculado sin aplicación de hormonas con 15,84 cm y no inoculado con auxinas con 15,54 cm; mientras que la menor fue para los tratamientos inoculado con auxinas con 12,24 cm, no inoculado con citocininas con 12,27 cm e inoculado con giberelinas con 12,75 cm. Éstos a su vez presentaron menor longitud radical que el

control con un valor de 14,02 cm y el tratamiento inoculado con citocininas con 13,57 cm. Tanto en las semillas inoculadas como en las no inoculadas se destacan diferencias entre la aplicación o no de hormonas. La inoculación sin aplicación de hormonas generó mayor longitud radical que la aplicación de las distintas fitohormonas sin inoculación. En el caso que no se inoculó, el comportamiento se invirtió y la aplicación de auxinas así como de giberelinas produjo mayor longitud radical que la aplicación de citocininas o que el control.

Para determinar si las diferencias en torno a los tratamientos eran válidas a nivel poblacional y estadísticamente significativas, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se analizó el efecto de la adición de fitohormonas en semillas sin inocular e inoculadas. Los resultados determinaron que ambos tratamientos, tuvieron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjo un efecto diferente ($p=0,0204$, $p=0,0371$ del **Anexo 8**). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso en particular, se realizó una prueba *a posteriori* en la que se compararon los rangos medios de la longitud radical. Los resultados de esta prueba se resumen en las **Tablas 23 y 24**.

Tabla 10: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas no inoculadas, a nivel de la longitud radical luego de 14 días desde la siembra.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H3	10,80	A	
H0	18,33	A	B
H2	21,23		B
H1	26,13		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 23**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H3, H0 y B: H0, H2, H1. La hormona en la que se observó el rango más pequeño fue citocinina; mientras que las hormonas que mostraron los rangos más grandes fueron auxinas y giberelinas. Así, la aplicación de citocininas en semillas sin inocular no tuvo efecto en el crecimiento longitudinal de la raíz; mientras que auxinas y giberelinas si lo tuvieron. El tratamiento de las semillas no inoculadas con auxinas o giberelinas generó un efecto positivo sobre el crecimiento de la longitud radicular, que se diferenció estadísticamente del tratamiento control o de la aplicación exógena de citocininas, que redujo significativamente el desarrollo de la longitud de este órgano.

Así, podemos resumir que el tratamiento hormonal que más impacto sobre la longitud de la raíz fue el de la aplicación exógena de citocininas, que redujo significativamente su

tamaño. Por otro lado, la adición de auxinas o giberelinas determinaron una mayor longitud de la raíz.

Tabla 11: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba Kruskal-Wallis, para semillas inoculadas, a nivel de la longitud radical luego de 14 días de crecimiento.

Test a Posteriori			
<u>Tratamiento</u>	<u>Ranking</u>		
H1	11,20	A	
H2	13,88	A	
H3	18,14	A	B
H0	24,96		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 24**, hay dos grupos de tratamientos estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son: A: H1, H2, H3 y B: H3, H0. Las hormonas en las que se observó el menor rango fueron auxinas y giberelinas; mientras que la inoculación sin adición de hormonas tuvo el rango más grande. Así, se podría concluir que la aplicación de auxinas y giberelinas junto con el inoculante, no tendría efecto aditivo o sinérgico a nivel de la longitud radical luego de 14 días de crecimiento y por otro lado, la inoculación sería suficiente para producir un aumento de la longitud radical.

5.2.6. Número de hojas trifoliadas

La **Figura 23** y **Tabla 25** del **Anexo 9**, representan el número de hojas trifoliadas por planta en semillas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

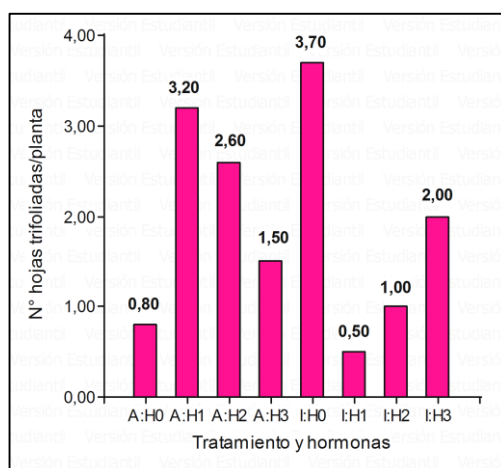


Figura 23: Evaluación del número de hojas trifoliadas por planta de soja sin inocular (A) e inoculadas (I) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de las siguientes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. Cada barra representa la media.

En la **Figura 23** y **Tabla 25** del **Anexo 9**, se puede observar que la mayor cantidad de hojas trifoliadas se observó en los tratamientos inoculado sin adición de hormonas (IH0) con un valor de 3,7 hojas/planta y no inoculado con adición exógena de auxinas (AH1) con 3,2 hojas/planta; mientras que la menor cantidad se verificó en los tratamientos inoculado con auxinas (IH1) con 0,5 hojas/planta y el control (AH0) con 0,8 hojas/planta. Considerando la aparición de trifolios, como un parámetro relacionado con la velocidad de crecimiento o desarrollo de esta especie (estado fenológico), podríamos decir que la aplicación de cualquier hormona en plántulas de soja sin inocular, aumentó el número de hojas trifoliadas, siendo la aplicación de auxinas la que mayor número de trifolios presentó. Por otro lado, la aplicación de fitohormonas en semillas inoculadas, determinó un efecto opuesto, siendo el tratamiento inoculado (pero sin hormonas) el que mayor número de hojas trifoliadas presentó, aún en comparación con todos los tratamientos del experimento.

5.2.7. Número y porcentaje de nódulos por planta

La **Figura 24** y **Tabla 26** del **Anexo 10**, representan el número de nódulos en raíz primaria, secundaria y total en plántulas de soja inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

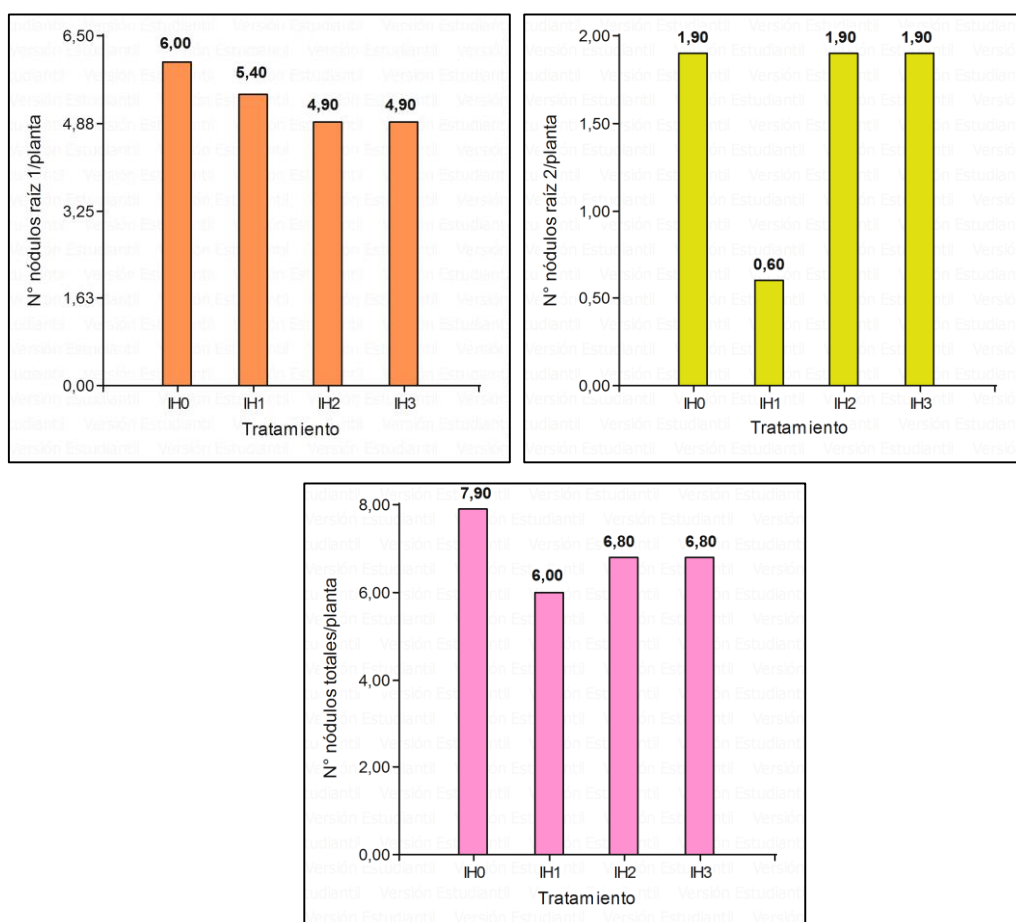
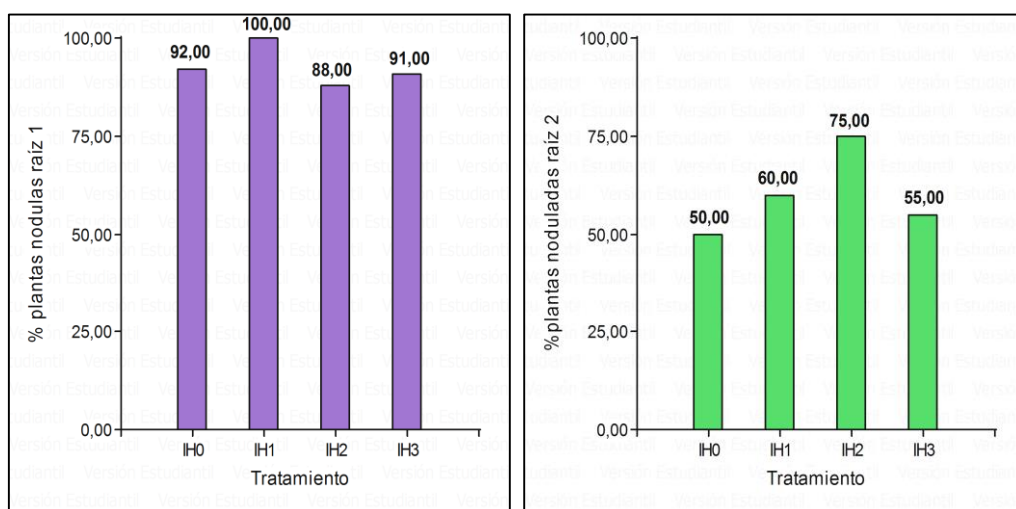


Figura 24: Evaluación del número de nódulos en raíz primaria, secundaria (arriba) y total (abajo) por planta de soja inoculada con *B. japonicum* E109 y tratadas exógenamente con diferentes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento.

En la **Figura 24** y **Tabla 26** del **Anexo 10**, se puede observar que la cantidad de nódulos en raíz primaria, secundaria y total fue mayor en el tratamiento sin adición exógena de fitohormonas, con 6; 1,9 y 7,9 nódulos/planta respectivamente. En el caso de la raíz primaria el tratamiento con auxinas presentó mayor número de nódulos (5,4 nódulos/planta) que para el resto de las hormonas y a nivel de la raíz secundaria, los tratamientos con giberelinas y citocininas presentaron el mismo número de nódulos que el control inoculado sin adición de hormonas (1,9 nódulos/planta). Finalmente, el tratamiento con adición exógena de auxinas obtuvo el menor número de nódulos totales por planta (0,6 nódulos/planta) y una relación inversa de nodulación en la raíz primaria con respecto a la secundaria. En el experimento, se contó con un control no inoculado y sin la adición exógena de hormonas, que no presentó nódulos en ninguna de las fracciones de la raíz.

La **Figura 25** y la **Tabla 27** del **Anexo 10**, representan el porcentaje de plantas noduladas en raíz primaria, secundaria y total, luego de 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.



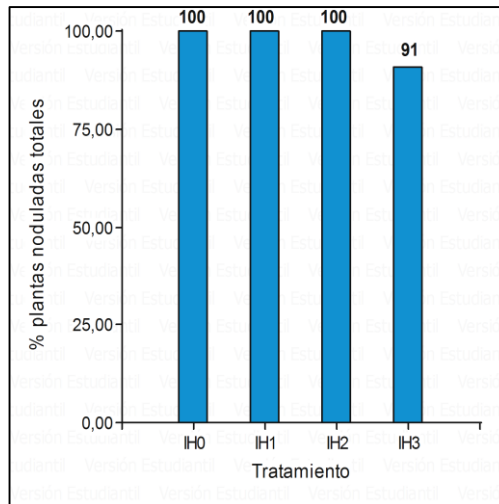


Figura 25: Porcentaje de plántulas de soja nóduladas en raíz primaria, secundaria y total luego de 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado.

En la **Figura 25** y **Tabla 27** del **Anexo 10**, se puede observar que en el caso de la raíz primaria el tratamiento inoculado con adición de auxinas (IH1) presentó un 100 % de plántulas nóduladas; mientras que los tratamientos inoculado sin aplicación de hormona (IH0) e inoculados con adición de citocininas (IH3) presentaron un valor similar (92-91%), pero inferior al del tratamiento con adición de auxinas. El tratamiento con giberelinas (IH2) fue el que menor porcentaje presentó (88%). A nivel de la raíz secundaria, el tratamiento con giberelinas (IH2) revirtió la tendencia anterior y presentó el mayor porcentaje de plántulas nóduladas con un 75%, luego el tratamiento con auxinas con 60%, citocininas (IH3) con 55% y por último el tratamiento inoculado y sin adición de hormonas (IH0) con 50% de plantas nóduladas. En el caso de % de nódulos totales los tratamientos sin aplicación hormonal, con aplicación de auxinas y giberelinas presentaron el máximo porcentaje (100%), mientras que el tratamiento en que se aplicó citocininas presentó menor % (91%).

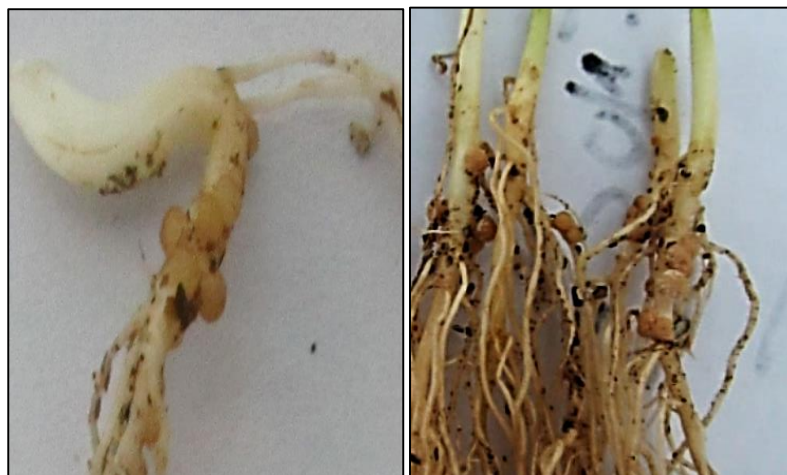


Figura 26: Nódulos en raíz primaria, secundaria y terciaria de plántulas de soja.

En la **Figura 19** y en la **Tabla 28** se resumen los principales resultados de este trabajo para semillas de soja sin inocular(A) e inoculadas (I) con *B. japonicum* E109 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de las siguientes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3).

Tabla 28: Resumen de los resultados presentados en soja tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *B. japonicum* E109 y tratadas de manera exógena e individual con auxinas, giberelinas y citocininas.

ENSAYO DE GERMINACIÓN [I]	
<p>1. BACTERIA</p> <p style="background-color: yellow; border: 1px solid red; padding: 5px;"><i>B. japonicum</i> E109 (I)</p>	<p style="background-color: #d9ead3; padding: 5px;"><u>Germinación</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Máxima germinación por la inoculación con <i>B. japonicum</i> E109. 2. Máxima germinación por la adición exógena de citocininas. La adición de auxinas generó efectos positivos. 3. Sinergismo por la inoculación y adición de giberelinas. Efecto antagónico por la aplicación combinada con citocininas.
<p>2. HORMONAS</p> <p style="background-color: purple; color: white; padding: 5px;">Auxinas (H1)</p> <p style="background-color: red; color: white; padding: 5px;">Giberelinas (H2)</p> <p style="background-color: green; color: white; padding: 5px;">Citocininas (H3)</p>	<p style="background-color: #d9ead3; padding: 5px;"><u>Long. del hipocótilo</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tendencia de aumento de la longitud por la inoculación con <i>B. japonicum</i> E109. 2. Menor crecimiento por la adición de auxinas/citocininas. La adición giberelinas, no tuvo efecto sobre la longitud del hipocótilo. 3. Tendencia de aumento de la longitud por la inoculación y aplicación de citocininas. La aplicación combinada con auxinas/giberelinas, no tuvo efectos sobre la longitud.
<p>3. BACT + HORM</p> <p style="background-color: red; color: white; padding: 5px;">Bj E109 (I) + Auxinas (H1)</p> <p style="background-color: green; color: white; padding: 5px;">Bj E109 (I) + Giberelinas (H2)</p> <p style="background-color: blue; color: white; padding: 5px;">Bj E109 (I) + Citocininas (H3)</p>	<p style="background-color: #d9ead3; padding: 5px;"><u>Long. de la Radícula</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mayor crecimiento longitudinal por la inoculación con <i>B. japonicum</i> E109. 2. Tendencia de aumento por auxinas/citocininas. Menor longitud por la adición de giberelinas. 3. Tendencia de aumento entre la inoculación y la aplicación de auxinas/citocininas. Antagonismo con la aplicación de giberelinas.

ENSAYO DE CRECIMIENTO TEMPRANO [II]

1. BACTERIA

***B. japonicum* E109
(I)**

2. HORMONAS

Auxinas (H1)

Giberelinas (H2)

Citocininas (H3)

3. B ACT + HORM

**Bj E109 (I) +
Auxinas (H1)**

**Bj E109 (I) +
Giberelinas (H2)**

**Bj E109 (I) +
Citocininas (H3)**

Peso Fresco y Seco Aéreo

1. Tendencia de aumento del peso por la inoculación con *B. japonicum* E109.
2. Mayor peso por la adición de giberelinas. Tendencia de aumento con auxinas/citocininas.
3. La adición exógena de cualquier hormona disminuyó el crecimiento y fue más severo con auxinas/giberelinas.

Peso Fresco y Seco Radical

1. Tendencia de aumento del peso fresco y seco por la inoculación con *B. japonicum* E109.
2. Mayor peso fresco por la adición de giberelinas. Tendencia de aumento con auxinas/citocininas. Mayor peso seco por la adición de auxinas/giberelinas. Tendencia de aumento con citocininas.
3. La adición exógena de cualquier hormona disminuyó el crecimiento y fue más severo con auxinas/giberelinas.

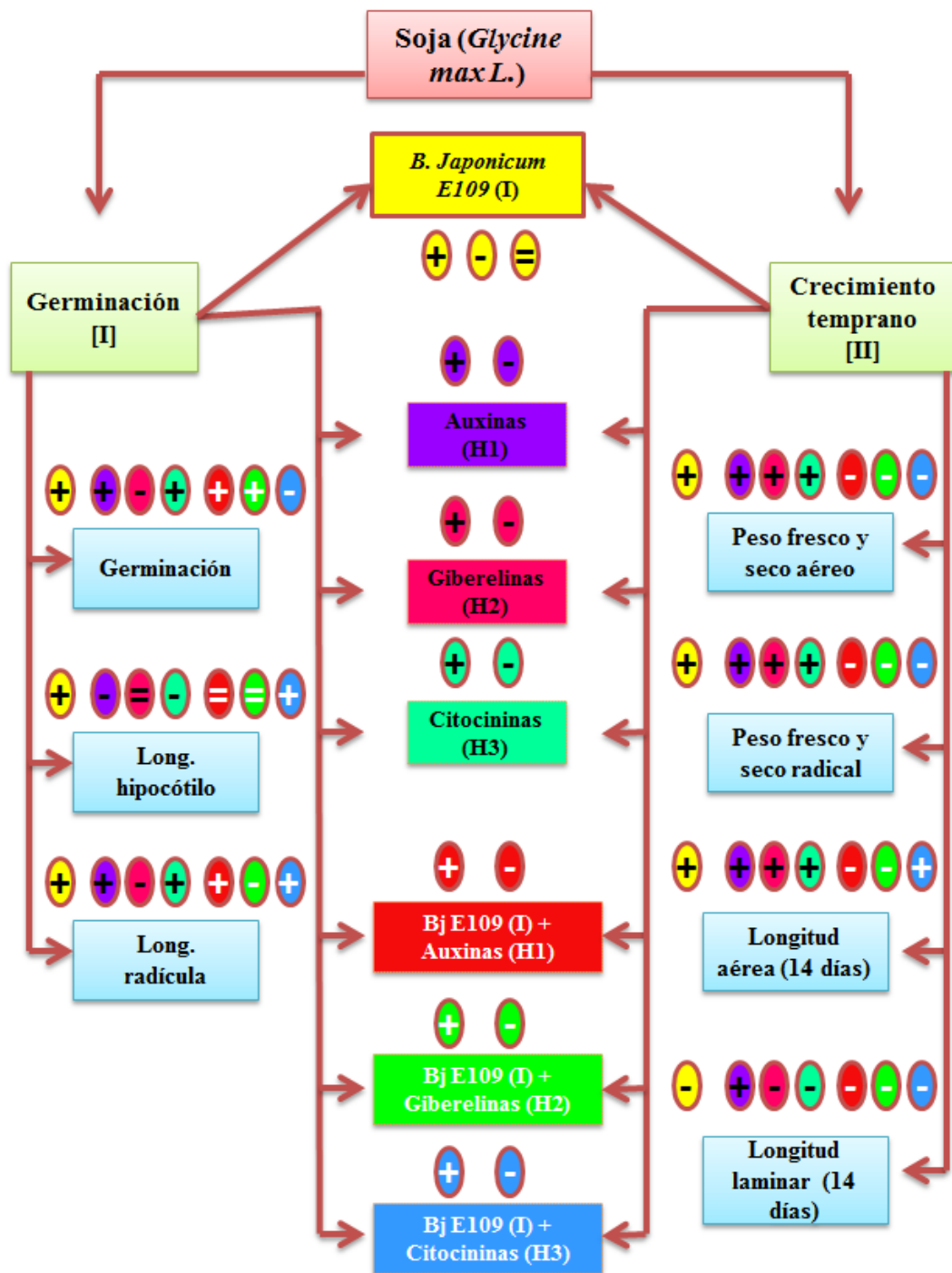
Longitud Aérea

1. A los 7 días mayor crecimiento longitudinal por la inoculación con *B. japonicum* E109. A los 14 días tendencia de aumento de la longitud con *B. japonicum* E109.
2. A los 7 días mayor promoción del crecimiento con auxinas/giberelinas, inhibición del crecimiento con citocininas. A los 14 días la adición exógena de cualquier hormona aumentó el crecimiento y fue mayor con giberelinas/citocininas.
3. A los 7 días la aplicación exógena de cualquier hormona disminuyó el crecimiento. A los 14 días mayor crecimiento con citocininas.

Longitud Laminar

1. A los 7 días tendencia de aumento con la inoculación con *B. japonicum* E109. A los 14 días inhibición del crecimiento por *B. japonicum* E109.
2. Tanto a los 7 como a los 14 días máxima longitud por la aplicación de auxinas. Inhibición del crecimiento por giberelinas/citocininas.

<p>1. BACTERIA</p>	<p>3. Disminución del crecimiento ante la aplicación de cualquier fitohormona.</p>
<p><i>B. japonicum</i> E109 (I)</p>	<p><u>Longitud Radical</u></p> <p>1. Máximo crecimiento con la aplicación de <i>B. japonicum</i> E109. 2. Tendencia de aumento por la adición de auxinas/giberelinas. Inhibición del crecimiento por la aplicación de citocininas. 3. Disminución del crecimiento ante la aplicación de cualquier fitohormona.</p>
<p>2. HORMONAS</p>	<p><u>Nº de hojas Trifoliadas</u></p> <p>1. Mayor número de hojas con <i>B. japonicum</i> E109. 2. Aumento del número de hojas ante la aplicación de cualquier fitohormona, sobre todo con auxinas. 3. Disminución del número de hojas con la aplicación de cualquier hormona. Efecto más marcado con auxinas.</p>
<p>Auxinas (H1)</p>	
<p>Giberelinas (H2)</p>	
<p>Citocininas (H3)</p>	<p><u>Nº de nódulos por planta</u></p> <p>1. Mayor número de nódulos en raíz primaria, secundaria y total con <i>B. japonicum</i> E109. 3. En raíz primaria y número de nódulos totales tendencia de aumento con la aplicación de fitohormonas. En raíz secundaria mayor número con giberelinas/citocininas, disminución del número con auxinas.</p>
<p>3. B ACT + HORM</p>	<p><u>% de nódulos por planta</u></p> <p>1. Tendencia de aumento del % de nódulos en raíz primaria. En secundaria menor % y en total mayor % de nódulos con <i>B. japonicum</i> E109. 3. En raíz primaria mayor % con auxinas y tendencia de aumento con giberelinas/citocininas. En raíz secundaria mayor % con giberelinas y tendencia de aumento con auxinas/citocininas. En total mayor % con auxinas/giberelinas, tendencia de aumento con citocininas.</p>
<p>Bj E109 (I) + Auxinas (H1)</p>	
<p>Bj E109 (I) + Giberelinas (H2)</p>	
<p>Bj E109 (I) + Citocininas (H3)</p>	



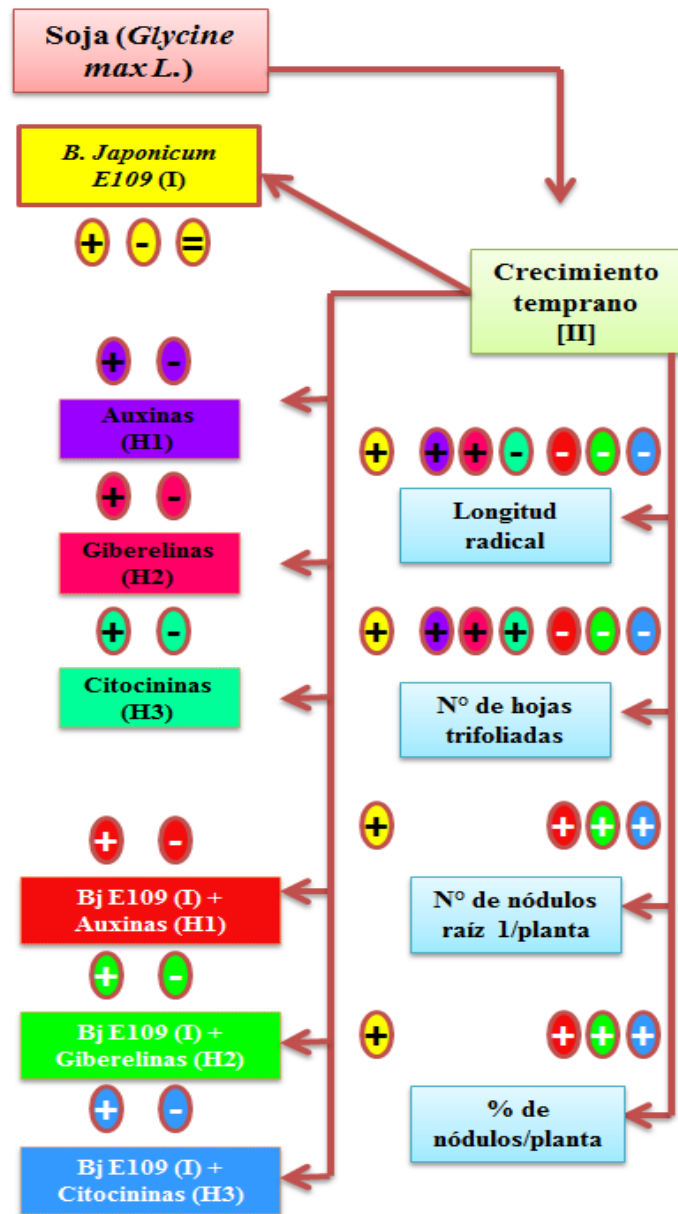


Figura 27: Resumen de la respuesta de semillas de soja a la inoculación con *B. japonicum* E109 (arriba); el tratamiento con fitohormonas (medio) y el tratamiento combinado (abajo) a nivel de la germinación y el crecimiento temprano. Signo \oplus , \ominus o \equiv : aumento, disminución o sin cambios de variables por la inoculación con Bj E109 (I); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de auxinas (H1); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de giberelinas (H2); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de citocininas (H3); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Bj E109 y H1; Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Bj E109 y H2; Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Bj E109 y H3.

6. DISCUSION

El crecimiento implica el aumento ordenado e irreversible de la magnitud de un organismo o población de organismos en función del tiempo. Desde el punto de vista agronómico es el producto de la división y el alargamiento celular de los órganos diferenciados. Desde el punto de vista microbiológico, implica tanto la división celular como el aumento de su biomasa y en el caso de las bacterias este fenómeno se manifiesta y se evalúa tanto por el incremento de la biomasa celular como por el número de células viables por unidad espacial (ufc.ml^{-1}) de acuerdo con Balatti y Freire, (1996). En un sistema de cultivo, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de manera indefinida y alcanza una fase estacionaria después de un tiempo determinado de incubación. En esta fase, el número de células se estabiliza alcanzando un valor máximo; sin embargo, puede comprobarse todavía un incremento relativo en la biomasa celular, por acumulación de células muertas, por la producción de compuestos de cubierta liberados al exterior o por el aumento de la actividad de algunas funciones celulares específicas, tal como la biosíntesis y liberación de ciertas fitohormonas.

B. japonicum ha sido extensamente estudiada debido a su capacidad de asociarse de manera simbiótica con soja y fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, datos recientes sugieren que algunos de los miembros de este género y otros del Orden *Rhizobiales* podrían además tener capacidad de promover el crecimiento al igual que las bien conocidas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) e inducir cambios en el desarrollo de las plantas, mediante la expresión de ciertos mecanismos bioquímicos y fisiológicos diferentes a la FBN, tal como la producción de metabolismo de fitohormonas. Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la cepa E109 de *B. japonicum* tiene capacidad de producir compuestos del tipo auxinas, giberelinas y citocininas (Boiero *et al.*, 2007) y que tales compuestos podrían estar involucrados en la respuesta a la inoculación de plántulas soja y maíz (Cassán *et al.*, 2009). En este trabajo, los resultados sugieren que *B. japonicum* cepa E109 tendría capacidad de promover la germinación y el crecimiento temprano de semillas de soja, al menos en parte debido a la producción de fitohormonas tales como giberelinas, citocininas y auxinas.

Auxinas

El ácido 3-indolacético (AIA) es la principal auxina presente en la naturaleza y es una de las fitohormonas de mayor relevancia en las plantas. En plantas superiores, la fuente primaria de auxinas exógenas provendría de la flora microbiana epifítica que circunda o habita la raíz (Cheryl y Glick, 1996), así como de aquellos microorganismos endofíticos con capacidad de colonizar los tejidos del hospedador y liberar el regulador casi en contacto

directo con los receptores. En tal sentido, Bandurski y Nonhebel (1984), han propuesto que de 2 a 10 minutos después de la unión de la hormona a sus receptores se inicia una cascada metabólica que termina con la modificación del patrón de crecimiento y desarrollo celular, tanto en el sistema radical, como en aquellas nuevas estructuras generadas en este órgano, como raíces adventicias, pelos absorbentes y hasta nódulos provenientes de la interacción rizobio-leguminosas. En algunas PGPR se ha demostrado que la síntesis de AIA estimula el crecimiento de las plantas (Xie *et al.*, 1996, Dobbelaere *et al.*, 1999, Idris *et al.*, 2007, Patten y Glick, 2002) con un efecto promotor a nivel de la elongación de tallos y principalmente de las raíces (Coello *et al.*, 2010). En otros trabajos, Spaepen *et al.*, (2008) y Dobleerae *et al.*, (1999) demostraron que en maíz y trigo, la adición exógena de esta auxinas o la inoculación con *Azospirillum brasilense* provocaba una reducción de la longitud total de la raíz, pero un aumento de su tamaño y volumen como consecuencia del aumento de la densidad de pelos absorbentes. Bashan y de Bashan, (2010) sugieren que el AIA altera el metabolismo y la morfología de las raíces, provocando una mayor absorción de agua y nutrientes. Trabajos previos de nuestro laboratorio, (Cassán *et al.*, 2009) sugieren que el AIA presente en las soluciones de inoculantes formulados con *B. japonicum* E109 o *A. brasilense* Az39 genera una respuesta similar a la aplicación exógena de la hormona en plántulas de soja y maíz debido a su capacidad de penetrar la corteza seminal y promover el desarrollo embrionario. En este trabajo, los resultados determinan que la aplicación exógena de auxinas produce aumentos de la longitud de la radícula y raíz de plántulas de soja sin inocular y que la inoculación con *B. japonicum* cepa E109 produce un aumento del tamaño de este órgano de manera similar a la aplicación exógena de la hormona; sin embargo, la inoculación con el microorganismo y la adición exógena de estas hormonas, provocó una reducción significativa de este parámetro que podría explicarse por la capacidad de catabolizar la molécula por esta bacteria, que fuera previamente comprobada por Pierantonelli, (2012) y recientemente confirmada por Torres *et al.*, (2014). El modelo de estudio relacionado con el catabolismo de AIA por *B. japonicum* sugiere que la adición exógena de la hormona a cultivos puros de la bacteria provocan una rápida oxidación de la molécula con la consecuente pérdida de la actividad biológica. Así, la combinación del cultivo bacteriano más la solución de auxinas previo a la inoculación de semillas de soja, determinaría una rápida destrucción de la hormona y con ello la pérdida de la actividad biológica, reflejada en la ausencia de respuesta en el tratamiento combinado. Sobre la capacidad bacteriana de producir esta molécula en medio de cultivo y con ello promover el crecimiento vegetal, Antoun *et al.*, (1998) evaluaron 18 cepas de *B. japonicum* capaces de promover el crecimiento de rabanito (*Raphanus sativus* L.) y confirmaron la producción de ácido indol-3-acético (AIA) al menos en un 33% de ellas. Recientemente, Becquer *et al.*, (2013) determinaron aumentos en la longitud de la radícula en *Sporobolus cryptandrus* al inocular

con cepas *Bradyrhizobium sp.* evaluando diferentes cepas bacterianas rizoféricas. Actualmente para las bacterias del género *Bradyrhizobium*, ha sido descrita la producción de auxinas como parte de la capacidad promotora del crecimiento, fundamentalmente a nivel del desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos durante la simbiosis.

En cuanto a los efectos de la hormona sobre las hojas de las plántulas de soja esta jugo un papel importante. La adición exógena de auxinas en semillas no inoculadas y la inoculación con *B. japonicum*, fueron los tratamientos que mayor número de hojas trifoliadas presentaron. También la aplicación exógena de auxinas cuando a las semillas no se las inoculó generó una tendencia de aumento de la longitud laminar de las plántulas de soja.

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas que constituyen una familia grande de diterpenos ácidos que cumplen una importante función en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas a lo largo de todo el ciclo de vida, incluyendo germinación, elongación del hipocótilo, expansión foliar, desarrollo de la raíz, inducción floral y desarrollo del órgano floral (Yamaguchi, 2008; Reid *et al.*, 2004; Sun, 2004). Al igual que en el caso de las auxinas, la producción bacteriana de GAs se ha estudiado extensamente desde dos puntos de vista: desde la capacidad bacteriana de producir ó metabolizar formas activas de giberelinas en medio químicamente definido (*in vitro*) (Piccoli y Bottini 1994, 1996; Piccoli *et al.*, 1998) y desde la modificación del balance hormonal y estimulación del crecimiento de plantas por la inoculación con bacterias productoras de esta hormona (*in vivo*), (Fulchieri *et al.*, 1993; Lucangeli y Bottini, 1997; Cassán *et al.*, 2001). El estudio del rol eco-fisiológico de la producción de GAs por bacterias rizosféricas todavía no ha sido elucidado. Sin embargo, es importante remarcar, los resultados obtenidos por otros autores, tanto *in vitro* como *in vivo*, que atribuyen a este mecanismo un rol importante en la estimulación del crecimiento de las plantas inoculadas con bacterias productoras. Parece lógico pensar que la estimulación del crecimiento de las plantas podría ser benéfico para las bacterias desde el punto de vista de la disponibilidad de nutrientes a nivel rizosférico (Rademacher, 1994); sin embargo, atribuir este fenómeno promotor sólo a la producción de una sustancia por parte del microorganismo resultaría un tanto simplista, sobre todo considerando las diferentes respuestas observadas y las numerosas especies que responden positivamente a la inoculación.

Al igual que para las auxinas, los resultados de este trabajo permitirían especular de que *B. japonicum* cepa E109 posee también la capacidad de promover la germinación a través de la biosíntesis de ácido giberélico (GA₃). En el ensayo de germinación (EG y PG),

los tratamientos inoculado sin aplicación de hormonas, inoculados con adición exógena de giberelinas y no inoculado con aplicación exógena de citocininas, fueron los que presentaron el máximo porcentaje de semillas germinadas, tanto a los 5 como a los 8 días (en el tratamiento inoculado sin aplicación de hormona, a los 8 días ese valor máximo no se mantuvo, debido a la muerte de algunas semillas por presencia de hongos). Por otro lado, el tratamiento no inoculado y con aplicación de giberelinas presentó porcentajes de germinación menores incluso que otros tratamientos tanto para la EG como para el PG. Desde el punto de vista biológico, esto podría implicar que la inoculación con *B. japonicum* E109 sería suficiente para promover la germinación de soja. Al respecto, Torres (2009) determinó que el porcentaje de semillas germinadas de soja y maíz a los 8 días fue superior en los tratamientos inoculados con *B. japonicum* E109, en comparación al control sin inocular. Cassán *et al.*, (2009), demostró la capacidad de *B. japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* Az39 para estimular la germinación en soja y maíz inoculadas de manera individual o en combinación luego de 5 y 8 días y en comparación con las semillas del control sin inocular, y propuso que esa capacidad podría deberse al menos en parte, a la biosíntesis de fitohormonas. En otros trabajos, Baldini (1992), señala que la aplicación de giberelinas a las semillas modifica su cuadro hormonal y permite su pronta germinación. La aplicación exógena de GA₃ también ha dado como resultado la ruptura de dormancia y un incremento en porcentajes de germinación y disminución en tiempos de germinación para forrajeras como *G. ulmifolia*, *L. leucocephala*, (Hermosillo *et al.*, 2008), *Annona cherimola* L y *Annona muricata* L (Lobo *et al.*, 2007), *Brassica oleraceae* L. (González *et al.*, 2007), *Onopordum nervosum* (Fernández *et al.*, 2002) *Minthostachys mollis* (Suárez *et al.*, 2011), en *Arabidopsis thaliana* y en algunas plantas de importancia comercial de la familia Solanaceae como *Jaltomata procumbens* (Saldivar *et al.*, 2010), *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* (Peng y Harberd, 2002). Adicionalmente, los mismos autores sugieren que a mayores concentraciones de GA₃ se obtienen mayores porcentajes de germinación en menos tiempo. Esto podría tener relación con los resultados de este trabajo desde el punto de vista de que el tratamiento control con aplicación de giberelinas, presentó menores valores de germinación con respecto al inoculado más adición de giberelinas, que pudo presentar mayor concentración de la hormona por aquella producida por la bacteria en el medio de cultivo. En tal sentido, Cassán *et al.*, (2009) demostraron que la cepa *B. japonicum* E109 tiene capacidad de producir, además de ácido giberélico (GA₃), ácido indol -3-acético (IAA) y zeatina (Z). Muñoz (1986), concluyó que para ciertas especies arbóreas este efecto también puede observarse. Tal es el caso de *Peumus boldus* (boldo) donde una vez que la semilla ha madurado completamente se consigue la germinación, solamente por la aplicación exógena de ácido giberélico de manera dependiente de la concentración de este promotor. Bécquer *et al.*, (2013), no descartaron que la causa más probable del efecto positivo sobre la germinación

de *Sporobolus cryptandrus*, inoculada con bacterias promotoras del crecimiento, podría deberse a la producción de ácido giberélico.

En relación al efecto de esta hormona sobre el crecimiento, podemos mencionar que en nuestros experimentos el desarrollo de la parte aérea en longitud; si bien no tuvo una diferencia significativamente estadística, presentó una tendencia de aumento en los tratamientos sin inocular. Esta tendencia se observó adicionalmente en el caso del peso seco y fresco aéreo y radical. No se observó un efecto de promoción del crecimiento en los tratamientos inoculados con la adición de giberelinas. Esto permitiría especular con que el inoculante a base de *B. japonicum* cepa E109 posee las fitohormonas necesarias para promover el crecimiento aéreo de las plántulas de soja en inducir un aumento en su biomasa, tal como probó previamente Cassán *et al.* (2009).

En cuanto a las semillas que sin inocular con la adición exógena de esta hormona, las respuestas en el crecimiento aéreo fueron muy variables. El mayor peso fresco y seco aéreo se manifestó con aplicación de giberelinas. Lo mismo ocurrió con la longitud aérea, pero solo a los 14 días de la evaluación. Al respecto, Ascon-Bieto y TAYLOR (2003), mencionan que la función hormonal que se otorga a las GA₃ se apoya en la siguiente premisa: su aplicación exógena produce una amplia variedad de respuestas en el desarrollo, sin embargo, la inducción del crecimiento del tallo, es probablemente el efecto fisiológico más espectacular de las giberelinas. BULTYNCK y LAMBERS (2004), encontraron que la aplicación exógena de GA en *Aegilops caudata* y *Aegilops tauschii* incrementó la biomasa en hojas debido a un aumento en el número y tamaño de estas. Según TAIZ y ZEIGER (2006), las GAs junto con las auxinas, influyen de forma indirecta en la absorción de agua al aumentar la elasticidad de la pared celular; por tanto, incrementan la cantidad de agua en la célula y, en consecuencia, el peso fresco.

Citocininas

Las citoquininas son importantes en todas las etapas del desarrollo vegetal, desde la división celular hasta la elongación de las células, por lo cual se encuentran en mayor concentración en los meristemas de embriones y frutos inmaduros, en donde normalmente se encuentran en concentraciones inferiores a la mayoría de fitohormonas (SMITH y ATKINS, 2002). Desde el descubrimiento de la primera citoquinina (Ck) por SKOOG (1955), la kinetina, el número de compuestos químicos que engloba la definición de Cks ha crecido para incluir un gran número de componentes sintéticos y naturales, derivados de la adenina y la fenilurea. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos y celulares entre los que se detallan el retardo de la senescencia por acumulación de clorofila, la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo y la expansión

de las hojas. Por definición, las citocininas, son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos de vegetales. Muchos microorganismos de la rizósfera son capaces de sintetizar citocininas en cultivos químicamente definidos. Barea *et al.*, (1976), encontraron que al menos el 90 % de las bacterias aisladas de la rizósfera de cultivos de interés agronómico, fueron capaces de producir compuestos del tipo citocininas. Como resultado de la íntima relación entre estos organismos y la superficie de la raíz, la producción exógena de esta hormona puede tener un profundo efecto sobre el crecimiento de la planta. Al igual que lo informado para las auxinas, la producción microbiana de esta hormona podría suplementar el contenido endógeno de la planta y en ciertos casos promover el crecimiento o algún proceso del tipo simbiótico. En la actualidad sabemos que las plantas responden a la adición exógena de citocininas, lo cual representa un punto de gran interés debido a que no se conoce la significancia ecológica de la síntesis microbiana en los tejidos vegetales. El modelo más estudiado en este sentido ha sido el de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se ha investigado tanto la producción de la hormona en el microsimbionte como en la planta. Nandwall *et al.*, (1981), estudiaron el efecto de la adición exógena de cinetina (K), y observaron que promovía la iniciación del nódulo e incrementaba el contenido de *leg* hemoglobina en porotos. En otros ensayos, Yahalom *et al.*, (1990), probaron que la adición exógena de 6-BAP como la co-inoculación de *Rhizobium* con *Azospirillum* spp. incrementaba el número de nódulos en *Medicago polymorpha*. Taller y Stutervant (1989), determinaron el patrón de citocininas presentes en cultivos químicamente definidos de *B. japonicum* y comprobaron la síntesis de Z, (9R) Z, (MeS) Z e iP en concentraciones del orden de 1-5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Desde el punto de vista fisiológico, existe poca información que pueda relacionar en forma directa el efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* spp., la promoción del crecimiento vegetal y la producción de citocininas; sin embargo, hay fuerte evidencia que correlaciona la presencia de estos compuestos con la regulación de la formación y desarrollo del nódulo, así como su funcionamiento (Bauer *et al.*, 1985). En tal sentido, algunos estudios han demostrado que los microsimbiontes pueden contribuir sustancialmente a elevar el contenido endógeno de citocininas en el macrosimbionte (Upadhyaya *et al.*, 1991). La aplicación exógena de Z y (9R) Z incrementaron la actividad nitrogenasa en nódulos de *Pisum sativum* en 66 % y 57 % respectivamente (Jaiswal *et al.*, 1982).

A pesar de lo comentado sobre el efecto que tiene la hormona en la nodulación, en nuestro trabajo, el mayor número de nódulos por plantas tanto en raíz primaria, secundaria y total se constató con la aplicación de la bacteria *B. japonicum* sin el agregado de ninguna hormona. Por lo que se puede prever este resultado por la capacidad de la bacteria de sintetizar fitohormonas.

Como se comentó anteriormente, la aplicación de citocininas sin inocular generó la máxima germinación de semillas de soja.

En este trabajo, con respecto a la longitud del hipocótilo no se observaron importantes cambios pero, sin embargo, se generó una tendencia de aumento de la longitud debido a la inoculación con *B. japonicum* y a la adición exógena de citocininas a las semillas inoculadas. También en lo que respecta a la longitud aérea la adición exógena de citocininas en semillas inoculadas y sin inocular a los 14 días desde la siembra mostró un aumento de la longitud, mientras que la inoculación con *B. japonicum* mostró una tendencia de aumento.

7. CONCLUSIÓN

Un inoculante a base de una Rizobacteria promotora del crecimiento de plantas (PGPR) debería considerarse funcionalmente como un “complejo biológico” resultante de la biotransformación de los componentes adicionados al medio de cultivo, en metabolitos o moléculas con actividad promotora del crecimiento y desarrollo sobre la planta. En tal sentido, la utilización de inoculantes a base de *B. japonicum* E109, así como moléculas reguladoras del crecimiento tales como las auxinas, giberelinas y citocininas, tienen influencia directa sobre procesos claves del desarrollo vegetal, tales como la germinación, implantación, crecimiento temprano de plántulas, colonización rizosférica y el establecimiento bacteriano en los tejidos. Nuestros resultados indican que *B. japonicum* E 109 tiene la capacidad de promover la germinación de semillas y el crecimiento temprano de plántulas de esta especie. Esta capacidad podría deberse, al menos en parte, a la biosíntesis de fitohormonas ya que esta bacteria es capaz de sintetizar y excretar reguladores del crecimiento a una concentración suficiente para producir cambios morfológicos y fisiológicos en las plántulas inoculadas y a su vez, el efecto podría potenciarse en algunos casos por la adición exógena de estas hormonas. En este trabajo, el análisis de la interacción entre la bacteria y los reguladores determinó una tendencia mayoritariamente negativa. Como conclusión, podemos decir que este trabajo permitió establecer que *B. japonicum* E109 tienen la capacidad de promover el crecimiento o desarrollo vegetal por la producción de fitohormonas.

8. BIBLIOGRAFIA

1. AMADOR, K.A.; A.J. DIAZ; S. GONZALEZ y E.Y. BIVIÁN-CASTRO. 2013. Efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación y desarrollo de plántulas de dos especies de *ferocaptus* (Captaceas). *Polibotánica*. 35: 109-131.
2. ANTOUN, H.; C. BEAUCHAMP; N. GOUSSARD; R. CHABOT y R. LALANDE. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*. 204: 57-67.
3. ARSHAD, M. y W.T. FRANKENBERGER JR. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.
4. ASCON-BIETO, J. y M. TAYLON. 2003. Fisiología y bioquímica vegetal. Madrid, España. Interamericana Mc Graw-Hill. 58p.
5. ASHA, P.K.; M.S. SHAILA; C.S. VAIDYANATHAN y T. RAMAKRISHNAN. 1979. Effect of phytohormones on nuclear RNA synthesis in germinating seeds of *Trigonella foenumgraecum* and its callus. *J. Bio sci.* 3: 327-334.
6. BAKRIM, A.; M. LAMHAMDI, F. SAYAH y F. CHIBI. 2007. Effects of plant hormones and 20-hydroxyecdysone on tomato (*Lycopersicum esculentum*) seed germination and seedlings growth. *African J. Biotech.* 6: 2792- 2802.
7. BALATTI, A. y J. FREIRE. 1996. Legume inoculants. Selection and Characterization of strains. Produce, Use and Management. Ed. Kingaf, Argentina. p: 148.
8. BALDINI, E. 1992. Arboricultura general. Madrid, España. Mundi-Prensa. 379 p. LO SAQUE DE INTERNET ESTO NO ENCONTRE DE QUE TRABAJO LO SAQUE
9. BANDURSKI, R. y H. NONHEBEL. 1984. Auxins. In: Wilins (editor). *Advanced Plant Physiology*, Pitman, London. p:1-20.
10. BAREA, J.; M. NAVARRO; y E. MONTOYA. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 40: 129-134.
11. BASHAN, Y. y L.E. DE-BASHAN. 2010. How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-A critical assessment. *Adv Agron.* 108: 77- 136.
12. BASHAN, Y. y G. HOLGUÍN. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225-1228.
13. BASKIN, C.C. y J.M. BASKIN. 1998. *Seeds- Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, USA.

14. BASTIÁN, F.; A. COHEN; P. PICCOLI; V. LUNA y R. BOTTINI. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A3 and A1 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. ***Plant Growth Regulators***. 24: 7-11.
15. BAUER, W.D.T.; H.E. BHUVANESWARI; I.J. CALVERT; N.S.A. LAW; MALIK y S. J. VESPER. 1985. Recognition and infection by slow-growing *rhizobia*. In: Nitrogen Fixation Research Progress (H. J. Evans, P. J. Bottomley, and W. E. Newton, eds.) pp. 247-256. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
16. BECQUER C.J.; B. SALAS, J. SLASKI, D. ARCHAMBAULT y A. ANYA. 2013. Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus*. ***Revista cubana de ciencias agrícolas***. 47: 4.
17. BIANCO, C.; T. KRAUS y C. NUÑEZ. 2007. ***Botánica Agrícola***. 2^{da} ed. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 498p.
18. BOIERO, L.; D. PERRIG; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN 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.
19. BOIERO, L.; D. PERRIG; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN y V. LUNA. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and possible physiological and technological implications. ***Applied Microbial and cell Physiology***. 74: 874-880.
20. BOLSA DE CEREALES DE BUENOS AIRES. 2011. Soja.
En: <http://www.bolsadecereales.com/default.asp>. Consultado: 02-03-2012.
21. BOLSA DE CEREALES DE ROSARIO. 2011. Publicaciones-informativo semanal [viernes, 29 de julio de 2011](#).
En: http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2011_07_29.pdf. Consultado: 02-03-2012.
22. BOTTINI, R.; M. FULCHIERI; D. PEARCE y R. PHARIS. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. ***Plant Physiology***. 90: 45-47.
23. BOWEN, G.D. y A.D. ROVIRA. 1999. The Rhizosphere and its management to improve plant growth. ***Adv. Agron.*** 66: 1-102.
24. BULTYNCK, L. y H. LAMBERS. 2004. Effects of applied gibberellic acid and paclobutrazol on leaf expansion and biomass allocation in two *Aegilops* species with contrasting leaf elongation rates. ***Physiol. Plant.*** 122(1): 143-151.
25. BURTON, J.; C. MARTINEZ y R. CURLEY. 1972. Methods of testing and suggested standards for legume inoculants and preinoculated seed, Nitragin Corporation, U.S.A.

26. CASSÁN, F.; R. BOTTINI; G. SCHNEIDER y P. PICCOLI. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hidrolize conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. ***Plant Physiology***. 125: 2053-2058.
27. CASSÁN, F.; D. PERRIG; V. SGROY; O. MASCIARELLI; C. PENNA y V. LUNA. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *B. 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.
28. CHANWAY, C.P.; R.K. HYNES y L.M. NELSON. 1989. Plant growth promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench.) and pea (*Pisum sativum* L.). ***Soil Biol. Bio chem.*** 21: 511-517.
29. CHERYL, P. y B. GLICK. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. ***Can. J. Microbiology***. 42: 207-220.
30. CLARÍN, 2004. *El Gran Libro de la Siembra Directa*. Artes Gráficas Rioplatense S.A. Buenos Aires. Argentina.
31. COELLO, C.Y.; C.L. MICELI; C. ORANTES; L. DENDOOVEN y F.A. GUTIÉRREZ. 2010. Optimización de reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de la orquídea *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins. ***Gayana Bot.*** 67: 19-26.
32. CONSTANTINO, M.; R. GÓMEZ-ÁLVAREZ; J. D. ÁLVAREZ-SOLÍS; J. PAT-FERNÁNDEZ y G. ESPÍN. 2010. Efecto de la biofertilización y los biorreguladores en la germinación y el crecimiento de *Carica papaya* L. Revista Colombiana de Biotecnología. vol. XII, núm. 2, diciembre, 2010, pp. 103-115
33. CONTRERAS, A.R.; A.M. RODRÍGUEZ DORANTES; S.M. VILLAFÁN; S.P. JIMÉNEZ; A.R. TOVAR y L.A. GUERRERO ZÚÑIGA. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. ***Polibatánica***. 29: 131-147. Núm. 29, pp. 131-147, ISSN 1405-2768; México, 2010.
34. CORTIZO, M.; J.M. ÁLVAREZ; A. RODRÍGUEZ; B. FERNÁNDEZ y R.J. ORDÁS. 2010. Cloning and characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious shoot formation in *Pinus pinea* L. ***Journal of Plant Physiology***. 167:1023-1026.
35. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). 1994. ***El Cultivo de la soya***. Publicación del ICA. Palmira, Colombia. 26p. En: <http://books.google.com.ar/books?id=5dhxsw1aK8cC&pg=PA313&dq=cultivo+de+soya&hl=es&sa=X&ei=1FIPU9mONoy3kAehoHoBg&ved=0CDIQ6wEwAQ#v=onepage&q=cultivo%20de%20soya&f=false>

36. CROWLEY, D.E.; Y.C. WANG; C.P.P. REID y P.J. SZANISZLO. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil*. 130: 179-198.
37. CROZIER, A.; J. MALCOM y J.GRAEBE. 2000. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Chapter 17: 850-864. Academic Press. Cambridge, Londres.
38. CUBA EDUCA. Las fitohormonas y la regulación de los procesos fisiológicos en las plantas. En: http://biologia.cubaeduca.cu/index.php?option=com_content&view=article&id=2934:biologia-9no-grado-tema-el-organismo-como-un-todo&catid=535:biologia. Consultado: 18-03-2014.
39. CUESTA, C.R.; M.L. CENTENO; R.J. ORDÁS y B. FERNÁNDEZ. 2010. Caulogenic induction in cotyledons of stone pine (*Pinus pinea*): Relationship between organogenic response and benzyladenine trends in selected families. *Journal of Plant Physiology*. 166 (11): 1162-1171.
40. CUESTA, C.; O. NOVÁK; R.J. ORDÁS; B. FERNÁNDEZ; M. STRNAD; K. DOLEŽAL y A. RODRÍGUEZ. 2012. Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. *Journal of Plant Physiology*. 1830–1837.
41. DAVIES, P. 1995. En: Plant Hormones. *Gibberellins: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Kluwer Acad. Press.
42. DEBEAUJON, I. y M. KOORNNEEF. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol*. 122: 415-424.
43. DIAZ-ZORITA, M. 2004. *Manual práctico para la producción de soja*. Editorial Hemisferio. República Argentina.
44. DI RIENZO, J.A.; F. CASANOVES; M.G. BALZARINI; L. GONZALEZ; M. TABLADA y C.W. ROBLEDO. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
45. DOBBELAERE, S.; A. CROONENBORGH; A. THYS; A. VANDE BROEK y J. VANDERLEYDEN. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 212: 155-164.
46. FERNÁNDEZ, H.; C. PÉREZ; M.A REVILLA y F. PÉREZ. 2002. The levels of GA₃ and GA₂₀ may be associated with dormancy release in *Onopordum nervosum* seeds. *Plant Growth Regulation*. 38: 141- 143.
47. FISCHER-IGLESIAS, C. y G. NEUHAUS. 2001. Zygotic embryogenesis Hormonal control of embryo development. En: Bhojwani, S.S. y W.Y. Soh (eds.). *Current trends*

- in the embryology of angiosperms*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands. p: 223–247.
48. FRUGIER, F.; S. KOSUTA; J.D. MURRAY; M. CRESPI y K. SZCZYGLOWSKI. 2008. Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plant Sci.* 13(3): 115-20.
 49. FULCHIERI, M. y L. FRIONI. 1993. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.): Effects on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biology Biochemistry.* 26: 921-923.
 50. FURATANI, S.C. y M.A. NAGAO. 1987. Influence of temperature, KNO₃, GA₃ and seed drying on emergence of papaya seedlings. *Scientia Horticulturae.* 32: 67-72.
 51. GARATE, A. y I. BONILLA. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Azcón-Bieto y Talón E (eds). Madrid. p: 113-130.
 52. GIRAUD, E.; L. MOULIN; D. VALLENET; V. BARBE; E. CYTRYN; J. AVARRE; M. JAUBERT; D. SIMON, ET AL. 2007. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science.* 316: 1307-1312.
 53. GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can J. Microbiol.* 41: 109-114.
 54. GONZÁLES, L.M.; C. CAYCEDO; M.F. VELÁSQUEZ; V. FLORES y M.R. GARZÓN. 2007. Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. Botrytis DC. *Agronomía Colombiana.* 25(1): 54-61.
 55. HARTMANN, H. T. y E. KESTER. 1987. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Ed. CECSA, México. 759p.
 56. HEDDEN, P. y A. PHILLIPS. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed genes. *Trends in Plant Science.* 5: 523-530.
 57. HEDDEN P.; A. PHILLIPS; M. ROJAS; E. CARRERA y B. TUDZYNSKI. 2002. Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A case of convergent Evolution. *J. Plant Growth Regulators.* 20: 319-331.
 58. HERMOSILLO, Y.; J. AGUIRRE; R.A. RODRÍGUEZ; C. ORTEGA; A. GÓMEZ y R. MAGAÑA. 2008. Métodos inductivos para maximizar la germinación de semilla de germoplasma nativo en vivero para sistemas silvopastoriles en Nayarit, México. *Zootecnia Tropical.* 26(3): 355-358.
 59. HOAGLAND, D. y T. BOYER. 1936. General nature of the process of salt accumulation by roots with descriptions of experimental methods. *Plant Physiol.* 11: 477-507.
 60. IDRIS, E.E.; E.J. IGLESIAS; M. TALON y R. BORRISS. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact.* 20: 619-626.

61. IKUMA, H. y K.V. THIMANN. 1963. Action of Kinetin on photosensitive germination of lettuce seed as compared with that of gibberellic acid. *Plant Cell Physiol.* 4: 113-128.
62. INFOBAE, 2014. La soja aportará récord de cosecha y de liquidación de exportaciones. En: <http://www.infobae.com/2014/05/08/1562874-la-soja-aportara-record-cosecha-y-liquidacion-exportaciones>. Consultado: 10-06-14.
63. International Seed Test Association (ISTA). 2007. *International Rules for Seed Testing*. ISTA Editorial, USA. 583p.
64. IOSIPENKO, A. y V. IGNATOV. 1995. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp 7. NATO ASI Ser. Ser. G. 37: 307-312.
65. JAISWAL, V.; S. RIZVI; D. MUKERJI y S. MATHUR. 1982. Nitrogenase activity in root nodules of *Vigna mungo* the role of nodular cytokinins. *Angew. Bot.* 56: 143-148.
66. JIMÉNEZ, R.G.; C.A. VARELA; C.T. GILCES; M.A. LOPEZ; A.E. MENDOZA; L.P. COLINA; E.V. FREIRE; F. MITE; S.A. MUÑOZ y G. VITERI. 2005. *Manual del Cultivo de Soya*. En: Editorial Raíces. Estación Experimental Boliche. Guayaquil, Ecuador. 13p.
67. KARSSSEN, C.M.; S. ZAGORSKI; J. KEPCZYNSKI y S.P.C. GROOT. 1989. Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann. of Bot.* 63: 71-80.
68. KAUFMAN, P.; L.L. WU; T. BROCK y D. KIM. 1995. Hormones and their orientation of growth. In: Davies, P., editor. *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p: 547-571.
69. KENDE, H. y J. ZEEVART. 1997. The five “classical” hormones. *Plant Cell.* 9: 1197-1210.
70. KLEE, H. y M. ESTELLE. 1991. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 529-551.
71. KLOEPPER, J.; R. LIFSHITZ y R. ZABLOTOWICZ. 1989. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
72. KLOEPPER, J. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: *Soil Microbial Ecology*(Ed). F. B. Metting Jr. 255-274. Springer Verlag. Germany. 12.
73. KUCERA, B.; M.A. COHN y G. LEUBNER-METZGER. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.
74. KUTSCHERA, U. y W.R. BRIGGS. 1987. Rapid auxin-induced stimulation of cell wall synthesis in pea internodes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2747-2751.
75. LINK, G. 1937. Role of heteroauxines in legume nodule formation, beneficial host effects of nodules, and soil fertility. *Nature.* 140: 507.
76. LEWAK, S. y A.A. KHAN. 1977. Mode of action of gibberellic acid and light on lettuce seed. *Plant Physiol.* 60: 575-577.

77. LOBO, M.; O. DELGADO; J.R. CARTAGENA; E. FERNANDEZ y C.I. MEDINA. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L) y guanábana (*Annona muricata* L), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agronomía Colombiana*. 25(2): 231-244.
78. LUCANGELLI, C. y R. BOTTINI. 1997. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with Uniconazole. *Symbiosis*. 23: 63-72.
79. MARCHI, I.R.A., F.A. REBELO, E. FERNANDES DA ROSA y A. MAIOCHI. 2007. Síntese e avaliação da propriedade reguladora de crecimiento vegetal de compostos indólicos derivados do sofrol. *Quim. Nova*. 30: 763-767.
80. MALAMY, J. y P. BENFEY. 1997. Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci*. 2: 390-396.
81. MANDER, L. 1991. Recent progress in the chemistry and biology of gibberellins. *Sci. Progress Oxford*. 75: 33-50.
82. MATHESIUS, U.; H. SHALAMAN; D. MEIJER; B. LUGTENBERG; H. SPAINK; J. WEINMAN; L. RODAM; C. SAUTTER; B. ROLFE; y M. DJORDJEVIC. 1997. *New tools for investigating nodule initiation and ontogeny: spot inoculation and microtargeting of transgenic with clover roots shows auxin involvement and suggest a role for flavonoids*. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, G Stacey, B Mullin, P Gresshoff (Eds). Germany.
83. MEHANNA, H.; G.C. MARTIN y C. NISHIJIMA. 1985. Effects of temperature, chemical treatments and endogenous hormone content on peach seed germination and subsequent seedling growth. *Sci. Hort*. 27: 63-73.
84. MELGAR, R.; G. VITTI y V.M. BENITES. 2011. Soja en Latinoamérica. En: https://www.google.com.ar/search?q=IIP+Bolet%C3%ADn+No.+20+Fertilizand+para+altos+rendimientos+Soja+en+Latinoam%C3%A9rica+Dr.+Ricardo+Melgar+Estaci%C3%B3n+Experimental&oq=IIP+Bolet%C3%ADn+No.+20+Fertilizando+para+altos+rendimientos+Soja+en+Latinoam%C3%A9rica+Dr.+Ricardo+Melgar+Estaci%C3%B3n+Experimental&aqs=chrome..69i57j0j8&sourceid=chrome&es_sm=122&ie=UTF-8
85. MILLER, C.; F. SKOOG; M. VON SALTZA y F. STRONG. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392.
86. MOK, D.W.S. y M.C. MOK. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 89-118.
87. MOK, M.C.; R.C. MARTIN; P.I. DOBREV; R. VANKOVÁ; P.S. HO; K. YONEKURA-SAKAKIBARA; H. SAKAKIBARA y D.W.S MOK. 2005. Topolins and hydroxylated

- thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin Oglucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiology*. 137: 1057-1066.
88. MONCALEÁN, P.; P. ALONSO; M. CENTENO; M. CORTIZO; A. RODRÍGUEZ; B. FERNÁNDEZ y ORDÁS R. 2005. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology*. 25: 1–9.
 89. MONOGRAFIAS.COM, 2012. La soja: su evolución en la Argentina. En: <http://www.monografias.com/trabajos82/soja-su-evolucion-argentina/soja-su-evolucion-argentina.shtml>. Consultado: 02-03-2012.
 90. MUÑOZ, M. 1986. *Cultivo de embriones y ensayo de germinación en boldo (Peumus boldus Mol.)*. Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestal, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile. 88p.
 91. NANDWALL, A.; S. BHARTI; O. GARG y P. RAM. 1981. Effects of indole acetic acid and kinetin on nodulation and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.). *Indian Journal Plant Physiology*. 24: 47-52.
 92. NANNIPIERI, P. y L. BADALUCCO. 2003. Biological processes. En: Benbi DK, Nieder R (Eds), *Handbook of Processes and Modelling in the Soil-Plant System*. Haworth Press, Binghamton, NY, EE.UU. 57-82 p.
 93. OKON, Y. y Y. KAPULNIK. 1986. Development and function of Azospirillum-Inoculated roots. *Plant Soil*. 90: 3-16.
 94. PATTEN, C. y B. GLICK. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
 95. PATTEN, C. y B. GLICK. 2002. The role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl Environ Microb.* 68: 3795-3801.
 96. PENG, J. y N.P. HARBERD. 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Plant Biology*. 5: 376–381.
 97. PEÑA-CABRALES, J. y M. ALEXANDER. 1983. Growth of *Rhizobium* in unamended soil. *Soil Sci. Am. J.* 47: 81-84.
 98. PERETTI, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
 99. PEREZ, D. y F. VOLPI. 2004. *Cultivo de Soja en el centro este de Entre Ríos. Resultados 2003/04*. EEA Concepción del Uruguay. En: Boletín Técnico. Serie Producción Vegetal N° 45.
 100. PERRIG, D.; L. BOIERO; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN; y V. LUNA. 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.

101. PERTICARI, A.; R. PARRA; P. BALATTI; F. FIQUENI y E. RÓDRIGUEZ CACERES. 1996. Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *Sinorhizobium fredii* para la inoculación de soja. *Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología*. Santa Cruz de La Sierra, Bolivia. 103-104 p.
102. PICCOLI, P. y R. BOTTINI. 1994. Effect of C/N ratio, N content, pH and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis*. 21: 263-264.
103. PICCOLI, P. y R. BOTTINI. 1996. Gibberellins production in *A. lipoferum* cultures y enhanced by lighth. *Biocell*. 20: 185-190.
104. PICCOLI, P.; C. LUCANGELI; G. SCHNEIDER y R. BOTTINI. 1998. Hydrolysis of 17,17- [2H₂]-Gibberellin A20-Glucoside and 17,17-[2H₂]-Gibberellin A20-Glucosyl Esther by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemycally-defined medium. *Plant Growth Regulators*. 23: 179-182.
105. PIERANTONELLI, B. 2012. **Factores bióticos y ábioticos que regulan el catabolismo del ácido indol-3-acético en *Bradirhizobium japonicum* cepa E 109**. Tesis de grado. Fac. de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
106. PHILOSOPH-HADAS, S.; H. FRIEDMAN y S. MEIR. 2005. Gravitropic Bending and Plant Hormones. *Vitam. Horm.* 72: 31-78.
107. PRINSEN, E.; J. CHAUVAUX; M. SCHMID; U. HOHN; J. WIENEKE; J. DE GREFF; H. SCHELL y V. ONCKELEN. 1991. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Lett.* 282: 53-55.
108. PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL DEL NOA. 2014. La campaña de soja en la Argentina alcanzaría record en 2013/2014. En:http://www.produccion.com.ar/ver_notas.php?edicion=Sep_Oct2013&numero=204&id=1338 Consultado: 10-06-2014.
109. RADEMACHER, W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul.* 15: 303-314.
110. REID, J.B.; G.M. SYMONS y J.J. ROSS. 2004. Regulation of gibberellin and brassinosteroid biosynthesis by genetic, environmental and hormonal factors. En: Davies P.J. (ed.). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands. p: 179-203.
111. ROSS, J.; D. O'NEILL; J. SMITH; P. KERCKHOFFS; R. ELLIOT. 2000. Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant Journal*. 21: 547-552.
112. ROSS, J. y D. O'NEILL 2001. "New interaction between plant hormones". *Trends in Plant Sci.* 6: 2-4.

113. SAKABIBARA, H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431-49.
114. SALDIVAR, P.; A. LAGUNA; F. GUTIERREZ y M. DOMINGUEZ. 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana.* 21(2): 327-331.
115. SEGURA, J. 2008. Citoquininas. En: Azcón-Bieto y J., Talón, M. (Eds.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* McGraw-Hill-Interamericana de España, Barcelona. p: 421-444.
116. SKOOG, F. 1955. Growth factors, polarity and morphogenesis. *Annals of Biology.* 31: 1-11.
117. SMITH, P.M y C.A. ATKINS. 2002. Atkins purine biosynthesis, big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128: 793-802.
118. SOMASEGARAN, P. y H. HOBEN. 1994. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology.* Springer Verlag. New York.
119. STRZELCZYK, E.; M. KAMPER; y C. LI. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.
120. SUÁREZ, D.; J.L. FERNÁNDEZ y L.M. MELGAREJO. 2011. Efecto de la luz y el ácido giberélico (AG3) en la germinación de *Minthostachys mollis* Kunth. Griseb (Labiatae). *Acta Biológica Colombiana.* 16(2): 149-154.
121. SUN, T. P. 2004. Gibberellin signal transduction in stem elongation and leaf growth. En: Davies, P. J. (ed.). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands. p: 304-320.
122. TAIZ, L. y E. ZEIGER. 2006. *Plant physiology.* 4th ed. Sinauer Associates Inc. Publ., Sunderland, MA.
123. TAIZ, L. y E. ZEIGER. 2010. Cytokinins: regulators of division. En: Licoln Taiz y Eduardo Zeiger (Eds) *Plant Physiology*, 5^a ed, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachussets, p: 621-648.
124. TALLER, B. y D. STURTEVANT. 1989. Modification of cycokinin production in *Bradyrhizobium* cultures. *J. Cell. Biochemistry.* Suppl. 12 (part C): 274.
125. TEROUCHI, N. y K. SYONO. 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. *Plant Cell Physiol.* 31: 119-127.
126. THIMAN, K. 1936. On the physiology of the formation of nodule in legumes roots. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 22: 511-514.
127. TIEN, T.; M. GASKINS; y D. HUBBELL. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.

128. TIGABÚ, M. y P.C. ODÉN. 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Sci. Technol.* 29: 11-20.
129. TORRES, D. 2009. *Promoción de la germinación y el crecimiento temprano en plántulas de maíz (Zea mays L.) y soja (Glycine max L.) inoculadas con B. japonicum E109*. Tesis de grado. Fac. de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 49p.
130. TORRES, D.; BENAVIDEZ I.; OBANDO M.; GUALPA J. y CASSÁN, F. 2014. **Metabolism of indole-3-acetic acid (IAA) and other auxins from *Bradyrhizobium japonicum* E109**. Workshop, La falda, Córdoba, Argentina.
131. TREWABAS, A.J. 1983. Plant growth substances-metabolic flywheels for plant development. *Cell Biol. Int. Reports.* 7: 569-575.
132. UEGUCHI-TANAKA, M.; M. NAKAJIMA; E. KATOH; H. OHMIYA; K. ASANO; S. SAJI; X. HONGYU; M. ASHIKARI; H. KITANO; I. YAMAGUHI y M. MATSUOKA. 2007. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell.* 19: 2140-2155.
133. UPADHYAYA, N.M.; D.S. LETHAM; C.W. PARKER; C.H. HORCAT y P.J. DART. 1991. Do rhizobia produce cytokinins. *Biochemistry. Int.* 24: 123-130
134. XIE, H.; J.J. PASTERNAK y B.R. GLICK. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol.* 32: 67-71.
135. YAHALOM, E.; Y. OKON y A. DOVRAT. 1990. Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the roots morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiology.* 36: 10-14.
136. YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-251.
137. YANG, T.; D.M. LAW y P.J. DAVIES. 1993. Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact lightgrown pea seedlings. *Plant Physiol.* 102: 717-724.
138. ZHAO, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 49-64.

ANEXO

Resultados y Estadístico

Anexo 1. Descripción estadística de la energía y poder germinativo

En las **Tablas 2 y 3** se presentan las medidas descriptivas de la Energía y Poder Germinativo (EG-PG) de semillas de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 5 y 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 12: Resultados de la estadística descriptiva de la Energía Germinativa (EG) en semillas de soja, a los 5 días desde la siembra.

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	DE	CV	Mín	Máx
AH0	EG	2	90,00	0,00	0,00	90,00	90,00
AH1	EG	2	96,00	1,41	1,47	95,00	97,00
AH2	EG	2	93,50	3,54	3,78	91,00	96,00
AH3	EG	2	95,50	0,71	0,74	95,00	96,00
IH0	EG	2	97,50	0,71	0,73	97,00	98,00
IH1	EG	2	95,00	5,66	5,95	91,00	99,00
IH2	EG	2	97,50	0,71	0,73	97,00	98,00
IH3	EG	2	90,50	4,95	5,47	87,00	94,00

EG: Energía Germinativa; n: Número de observaciones; DE: Desvío Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: AH0: sin inoculación y sin agregado de hormona, AH1: sin inoculación con auxinas, AH2: sin inoculación con giberelinas, AH3: sin inoculación con citocinina, IH0: inoculado sin el agregado de hormona, IH1: inoculado y tratado con auxinas, IH2: inoculado y tratado con giberelinas, IH3: inoculado y tratado con citocininas.

Tabla 13: Resultados de la estadística descriptiva del Poder Germinativo (PG) en semillas de soja, a los 8 días desde la siembra.

TRATAMIENTO	Variable	n	Media	DE	CV	Mín	Máx
AH0	PG	2	94,50	0,71	0,75	94,00	95,00
AH1	PG	2	96,00	1,41	1,47	95,00	97,00
AH2	PG	2	94,50	2,12	2,24	93,00	96,00
AH3	PG	2	97,50	0,71	0,73	97,00	98,00
IH0	PG	2	97,00	1,41	1,46	96,00	98,00
IH1	PG	2	96,50	2,12	2,20	95,00	98,00
IH2	PG	2	97,50	0,71	0,73	97,00	98,00
IH3	PG	2	92,00	7,07	7,69	87,00	97,00

PG: Poder Germinativo; n: Número de observaciones; DE: Desvío Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: AH0: sin inoculación y sin agregado de hormona, AH1: sin inoculación con auxinas, AH2: sin inoculación con giberelinas, AH3: sin inoculación con citocinina, IH0: inoculado sin el agregado de hormona, IH1: inoculado y tratado con auxinas, IH2: inoculado y tratado con giberelinas, IH3: inoculado y tratado con citocininas.

Anexo 2. Descripción y análisis estadístico de la longitud del hipocótilo

En la **Tabla 4** se presentan las medidas descriptivas de la variable longitud del hipocótilo (cm) de semillas de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 14: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud del hipocótilo (cm) en semillas de soja, a los 8 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	DE	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LH	167	1,38	0,91	0,07	65,53	0,50	5,00	1,00
H0	I	LH	169	1,44	0,92	0,07	63,73	0,50	5,00	1,00
H1	A	LH	174	0,92	0,56	0,04	60,24	0,50	5,00	0,75
H1	I	LH	162	1,09	0,51	0,04	46,70	0,50	4,30	1,00
H2	A	LH	168	1,12	0,70	0,05	62,70	0,50	5,00	1,00
H2	I	LH	165	1,04	0,34	0,03	32,45	0,50	2,70	1,00
H3	A	LH	191	1,06	0,61	0,04	57,10	0,50	3,50	0,90
H3	I	LH	161	1,41	0,97	0,08	69,08	0,50	6,10	1,00

LH: Longitud hipocótilo; n: Número de observaciones; DE: Desvió Estándar; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: con auxinas, H2: con giberelinas, H3: con citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Análisis estadístico de la longitud del hipocótilo

Análisis de los tratamientos. Se compara entre los tratamientos cual/es se comporta mejor:

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido al menos un tratamiento.

H1: Hay efecto debido al menos un tratamiento.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	H	E	N	Promedio rangos	gl	H	p
LH	H0	A	167	762,69	7	82,8	<0,0001
LH	H0	I	169	802,64			
LH	H1	A	174	492,16			
LH	H1	I	162	676,28			
LH	H2	A	168	639,20			
LH	H2	I	161	695,70			
LH	H3	A	191	599,58			
LH	H3	I	161	769,31			

Conclusión: Hay evidencias estadísticamente significativas de que al menos un tratamiento produce un efecto diferente en la longitud del hipocótilo.

Test a posteriori

Tratamiento	Ranking					
AH1	492,16	A				
AH3	599,58		B			
AH2	639,20		B	C		
IH1	676,28		B	C		
IH2	695,70			C	D	
AH0	762,69				D	E
IH3	769,31				D	E
IH0	802,64					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	I:H0	I:H3	A:H0	I:H2	I:H1	A:H2	A:H3	A:H1
I:H0	-	ns	ns	sig	sig	sig	sig	sig
I:H3		-	ns	ns	sig	sig	sig	sig
A:H0			-	ns	sig	sig	sig	sig
I:H2				-	ns	ns	sig	sig
I:H1					-	ns	ns	sig
A:H2						-	ns	sig
A:H3							-	ns
A:H1								-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

Anexo 3. Descripción y análisis estadístico de la longitud de la radícula

En la **Tabla 6** se presenta las medidas descriptivas de la longitud de la radícula (cm) de semillas de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 8 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 15: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud de la radícula (cm) en semillas de soja a los 8 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	DE	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LR	189	5,07	3,21	0,23	63,28	0,50	15,50	4,80
H0	I	LR	193	5,97	3,74	0,27	62,68	0,50	15,40	6,30
H1	A	LR	192	5,76	3,10	0,22	53,77	0,50	14,60	5,50
H1	I	LR	193	5,59	3,77	0,27	67,51	0,50	15,00	5,30
H2	A	LR	189	4,37	2,75	0,20	62,95	0,50	17,00	4,00
H2	I	LR	195	4,69	3,36	0,24	71,64	0,50	13,40	4,20
H3	A	LR	195	5,26	3,10	0,22	58,98	0,50	14,10	4,70
H3	I	LR	184	5,79	4,02	0,30	69,39	0,50	15,50	5,45

LR: Longitud radícula; n: Número de observaciones; DE: Desvió Estándar; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Análisis estadístico de la longitud de la radícula

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	H	p
A	LR	H0	189	378,76	20,11	0,0002
A	LR	H1	192	430,48		
A	LR	H2	189	330,01		
A	LR	H3	195	391,73		

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas no se inocularon.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking			
H2	330,01	A		
H0	378,76		B	
H3	391,73		B	C
H1	430,48			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H1	H3	H0	H2
H1	-	ns	sig	sig
H3		-	ns	sig
H0			-	sig
H2				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	Promedio	rangos	H	p
I	LR	H0	193	409,42	11,03	0,0115
I	LR	H1	193	386,26		
I	LR	H2	195	339,86		
I	LR	H3	184	397,59		

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron embebidas con inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking	
H2	339,86	A
H1	386,26	B
H3	397,59	B
H0	409,42	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H0	H3	H1	H2
H0	-	ns	ns	sig
H3		-	ns	sig
H1			-	sig
H2				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

Anexo 4. Descripción y Análisis estadístico del Peso fresco y seco aéreo

En la **Tabla 9** y **10** se presentan las medidas descriptivas del peso fresco y seco aéreo (g), de plántulas de soja inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, a los 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 9: Resultados de la estadística descriptiva del peso fresco aéreo (g) en plántulas de soja, a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	PFA	3	1,59	0,35	38,13	0,89	1,97	1,92
H0	I	PFA	3	3,33	0,62	32,16	2,20	4,34	3,45
H1	A	PFA	3	2,69	0,37	23,77	2,11	3,38	2,60
H1	I	PFA	3	0,96	0,03	5,65	0,91	1,02	0,95
H2	A	PFA	3	3,51	0,33	16,40	2,87	3,97	3,70
H2	I	PFA	3	1,67	0,60	61,94	0,94	2,85	1,22
H3	A	PFA	3	2,42	0,77	54,91	1,39	3,91	1,95
H3	I	PFA	3	2,55	0,34	22,91	2,02	3,18	2,46

PFA: Peso Fresco Aéreo; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Tabla 160: Resultados de la estadística descriptiva del peso seco aéreo (g) en plántulas de soja, a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	DE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	PSA	3	0,21	0,08	37,71	0,12	0,26	0,25
H0	I	PSA	3	0,45	0,17	37,86	0,27	0,60	0,47
H1	A	PSA	3	0,36	0,08	21,95	0,29	0,45	0,34
H1	I	PSA	3	0,11	0,02	17,64	0,09	0,12	0,12
H2	A	PSA	3	0,47	0,10	20,34	0,36	0,55	0,49
H2	I	PSA	3	0,21	0,13	59,98	0,12	0,35	0,16
H3	A	PSA	3	0,30	0,17	58,30	0,16	0,49	0,24
H3	I	PSA	3	0,32	0,06	19,86	0,26	0,39	0,32

PSA: Peso Seco Aéreo; n: Número de observaciones; DE: Desvío Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

1. Análisis estadístico del Peso fresco aéreo

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	PFA	H0	3	3,00	3	5,97	0,1129
A	PFA	H1	3	7,33			
A	PFA	H2	3	10,00			
A	PFA	H3	3	5,67			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	PFA	H0	3	10,00	3	7,05	0,0703
I	PFA	H1	3	2,67			
I	PFA	H2	3	5,33			
I	PFA	H3	3	8,00			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

2. Análisis estadístico del Peso seco aéreo

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	PSA	H0	3	3,33	3	5,99	0,1112
A	PSA	H1	3	7,33			
A	PSA	H2	3	10,17			
A	PSA	H3	3	5,17			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculantes.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	PSA	H0	3	10,0	3	7,05	0,0695
I	PSA	H1	3	2,67			
I	PSA	H2	3	5,33			
I	PSA	H3	3	8,00			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Anexo 5. Descripción y Análisis estadístico del Peso fresco y seco radical

En la **Tabla 11** y **12** se presentan las medidas descriptivas del peso fresco y seco radical (g), de plántulas de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 11: Resultados de la estadística descriptiva del peso fresco radical (g) en plántulas de soja a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	PFR	3	0,45	0,19	72,00	0,21	0,81	0,32
H0	I	PFR	3	1,72	0,51	51,27	0,71	2,33	2,11
H1	A	PFR	3	1,67	0,14	14,86	1,45	1,94	1,61
H1	I	PFR	3	0,25	0,06	41,66	0,17	0,37	0,22
H2	A	PFR	3	2,15	0,17	13,96	1,81	2,38	2,27
H2	I	PFR	3	0,56	0,20	60,69	0,32	0,96	0,42
H3	A	PFR	3	1,37	0,53	67,25	0,62	2,40	1,10
H3	I	PFR	3	1,04	0,08	14,04	0,89	1,18	1,06

PFR: Peso Fresco Radical; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Tabla 172: Resultados de la estadística descriptiva del peso seco radical (g) en plántulas de soja, a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	DE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	PSR	3	0,09	0,04	46,72	0,05	0,13	0,08
H0	I	PSR	3	0,20	0,09	42,93	0,12	0,29	0,20
H1	A	PSR	3	0,25	0,04	15,44	0,22	0,29	0,25
H1	I	PSR	3	0,03	0,02	47,84	0,02	0,05	0,03
H2	A	PSR	3	0,25	0,05	20,75	0,19	0,29	0,27
H2	I	PSR	3	0,07	0,05	69,94	0,03	0,13	0,06
H3	A	PSR	3	0,17	0,10	57,60	0,09	0,28	0,15
H3	I	PSR	3	0,15	0,01	6,26	0,14	0,16	0,15

PSR: Peso Seco Radical; n: Número de observaciones; DE: Desvió Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

1. Análisis estadístico del Peso fresco y seco radical

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	PFR	H0	3	2,33	3	6,49	0,0902
A	PFR	H1	3	7,33			
A	PFR	H2	3	9,67			
A	PFR	H3	3	6,67			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculantes.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	PFR	H0	3	9,6	3	7,72	0,0522
I	PFR	H1	3	2,33			
I	PFR	H2	3	5,33			
I	PFR	H3	3	8,67			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

2. Análisis estadístico del Peso seco radical

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	PSR	H0	3	2,33	3	6,59	0,0862
A	PSR	H1	3	8,67			
A	PSR	H2	3	9,00			
A	PSR	H3	3	6,00			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas que indiquen que el efecto de al menos una hormona es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculantes.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio	rango	gl	H	p
I	PSR	H0	3	9,67		3	7,92	0,0476
I	PSR	H1	3	2,67				
I	PSR	H2	3	4,67				
I	PSR	H3	3	9,00				

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que al menos una hormona produce efecto diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H1	2,67	A	
H2	4,67	A	B
H3	9,00		B
H0	9,67		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H0	H3	H2	H1
H0	-	ns	ns	sig
H3		-	ns	sig
H2			-	ns
H1				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

Anexo 6. Descripción y Análisis estadístico de la longitud aérea

En la **Tabla 14** y **15** se presentan las medidas descriptivas de la longitud aérea (cm), de plántulas de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 14: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud aérea (cm) en plántulas de soja, a los 7 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LA	6	7,62	0,61	19,55	5,70	10,10	7,35
H0	I	LA	12	9,02	0,58	22,23	6,50	12,50	8,65
H1	A	LA	8	8,36	0,40	13,39	6,80	10,00	8,35
H1	I	LA	3	6,67	2,09	54,17	2,60	9,50	7,90
H2	A	LA	13	8,06	0,47	20,88	5,50	11,50	7,80
H2	I	LA	8	7,55	0,49	18,52	5,00	9,40	7,45
H3	A	LA	10	7,06	0,43	19,41	5,30	9,00	7,05
H3	I	LA	10	7,08	0,39	17,55	5,00	8,50	7,40

LA: Longitud Aérea; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Tabla 1518: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud aérea (cm) en plántulas de soja, a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LA	6	16,05	0,82	12,54	14,50	20,00	15,45
H0	I	LA	12	18,18	0,71	13,52	12,50	21,70	18,75
H1	A	LA	8	17,48	0,56	8,98	14,80	19,30	17,85
H1	I	LA	5	16,74	0,95	12,63	14,50	19,10	16,50
H2	A	LA	13	19,43	0,43	7,98	17,50	22,30	19,30
H2	I	LA	8	17,73	0,47	7,48	14,80	19,00	18,00
H3	A	LA	10	19,29	0,63	10,25	16,50	22,50	19,35
H3	I	LA	11	18,76	0,62	11,00	15,00	21,00	19,50

LA: Longitud Aérea; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

1. Análisis estadístico de la Longitud aérea a los 7 días

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rang	gl	H	p
A	LA	H0	6	17,58	3	3,62	0,3039
A	LA	H1	8	23,38			
A	LA	H2	13	20,62			
A	LA	H3	10	14,25			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculantes.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

E	Variable	H	N	Promedio rango	gl	H	p
I	LA	H0	12	21,75	3	4,87	0,1816
I	LA	H1	3	15,67			
I	LA	H2	8	15,31			
I	LA	H3	10	13,05			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

2. Análisis estadístico de la Longitud aérea a los 14 días

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	LA	H0	6	8,50	3	11,63	0,0087
A	LA	H1	8	13,75			
A	LA	H2	13	23,81			
A	LA	H3	10	23,25			

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking			
H0	8,50	A		
H1	13,75	A	B	
H3	23,25		B	C
H2	23,81			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H2	H3	H1	H0
H2	-	ns	sig	sig
H3		-	ns	sig
H1			-	ns
H0				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

- Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio	rangos	gl	H	p
I	LA	H0	12	19,63	3	6,23	0,1008	
I	LA	H1	5	11,00				
I	LA	H2	8	14,63				
I	LA	H3	11	23,50				

Conclusión: No hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Anexo 7. Descripción y Análisis estadístico de la Longitud Laminar

En la **Tabla 17** y **18** se presentan las medidas descriptivas de la longitud laminar (cm), de plántulas de soja sin inocular e inoculadas más la adición exógena de fitohormonas, a los 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 17: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud laminar (cm) en plántulas de soja, a los 7 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LL	6	1,86	0,41	53,80	0,00	2,95	2,05
H0	I	LL	12	2,18	0,20	32,38	1,05	3,25	2,08
H1	A	LL	8	2,24	0,18	22,33	1,55	3,15	2,23
H1	I	LL	3	0,90	0,47	90,95	0,00	1,60	1,10
H2	A	LL	13	1,77	0,17	35,29	0,95	2,80	1,85
H2	I	LL	8	1,28	0,23	50,58	0,45	2,15	1,10
H3	A	LL	10	1,52	0,29	60,64	0,00	2,50	1,93
H3	I	LL	10	1,67	0,18	34,00	1,05	2,90	1,68

LL: Longitud Laminar; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Tabla 18: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud laminar (cm) en plántulas de soja, a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LL	6	4,88	0,24	11,99	3,75	5,35	5,03
H0	I	LL	12	4,60	0,15	10,97	3,80	5,25	4,50
H1	A	LL	8	5,13	0,18	10,21	4,30	5,85	5,00
H1	I	LL	5	3,70	0,32	19,13	2,45	4,20	3,95
H2	A	LL	13	4,55	0,19	14,72	3,15	5,20	4,60
H2	I	LL	8	3,48	0,40	32,51	1,90	5,10	3,70
H3	A	LL	10	4,07	0,26	20,10	2,55	4,90	4,20
H3	I	LL	11	4,20	0,26	20,65	2,90	5,35	4,05

LL: Longitud Laminar; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

1. Análisis estadístico de la Longitud laminar a los 7 días

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	LL	H0	6	19,92	3	3,27	0,3510
A	LL	H1	8	24,69			
A	LL	H2	13	17,23			
A	LL	H3	10	16,20			

Conclusión: No hay evidencias estadísticas que indiquen que el efecto de al menos una hormona es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	LL	H0	12	23,04	3	9,27	0,0254
I	LL	H1	3	8,17			
I	LL	H2	8	12,13			
I	LL	H3	10	16,30			

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H1	8,17	A	
H2	12,13	A	
H3	16,30	A	B
H0	23,04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H0	H3	H2	H1
H0	-	ns	sig	sig
H3		-	ns	ns
H2			-	ns
H1				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

2. Análisis estadístico de la Longitud laminar a los 14 días

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	LL	H0	6	24,50	3	9,99	0,0183
A	LL	H1	8	26,00			
A	LL	H2	13	18,04			
A	LL	H3	10	11,35			

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H3	11,35	A	
H2	18,04	A	B
H0	24,50		B
H1	26,00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamientos	H1	H0	H2	H3
H1	-	ns	ns	sig
H0		-	ns	sig
H2			-	ns
H3				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

- Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	Promedio	rangos	gl	H	p
I	LL	H0	12	24,54		3	8,28	0,0404
I	LL	H1	5	11,80				
I	LL	H2	8	12,88				
I	LL	H3	11	19,05				

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H1	11,80	A	
H2	12,88	A	
H3	19,05	A	B
H0	24,54		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamiento	H0	H3	H2	H1
H0	-	ns	sig	sig
H3		-	ns	sig
H2			-	ns
H3				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

Anexo 8. Descripción y Análisis estadístico de la Longitud radical

En la **Tabla 22** se presentan las medidas descriptivas de la longitud radical (cm) de plántulas de soja sin inocular e inoculadas más la adición exógena de fitohormonas, a los 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 192: Resultados de la estadística descriptiva de la longitud radical (cm) en plántulas de soja a los 14 días desde la siembra.

H	E	Variable	n	Media	EE	CV	Mín	Máx	Mediana
H0	A	LR	6	14,02	0,58	10,20	12,30	16,00	14,15
H0	I	LR	12	15,84	0,85	18,51	12,00	21,50	15,25
H1	A	LR	8	15,54	0,82	14,98	11,50	19,90	15,40
H1	I	LR	5	12,24	1,47	26,81	8,90	17,50	12,10
H2	A	LR	13	14,74	0,62	15,06	10,90	20,00	14,30
H2	I	LR	8	12,75	0,71	15,79	8,40	14,90	13,20
H3	A	LR	10	12,27	0,88	22,70	6,30	17,10	12,80
H3	I	LR	11	13,57	0,56	13,70	9,00	16,50	13,80

LR: Longitud Radical; n: Número de observaciones; EE: Error Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

1. Análisis estadístico de la Longitud radical

Análisis por tratamiento (A o I), basado este análisis en el gráfico de Línea. Se compara dentro de cada tipo de tratamiento cual/es de las hormonas se comporta mejor:

- **Sin inocular**

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	Horm	N	gl	H	p
A	LR	H0	6	3	9,78	0,0204
A	LR	H1	8			
A	LR	H2	13			
A	LR	H3	10			

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas sin inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H3	10,80	A	
H0	18,33	A	B
H2	21,23		B
H1	26,13		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamiento	H1	H2	H0	H3
H1	-	ns	ns	sig
H2		-	ns	sig
H0			-	ns
H3				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

• Inoculante

Hipótesis a probar:

H0: No hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

H1: Hay efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

E	Variable	H	N	gl	H	p
I	LR	H0	12	3	8,46	0,0371
I	LR	H1	5			
I	LR	H2	8			
I	LR	H3	11			

Conclusión: Hay evidencias estadísticas para decir que el efecto de las hormonas es diferente cuando las semillas fueron tratadas con inoculante.

Test a Posteriori

Tratamiento	Ranking		
H1	11,20	A	
H2	13,88	A	
H3	18,14	A	B
H0	24,96		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la siguiente tabla se pueden observar las diferencias (significativas o no) entre los tratamientos, ordenados de mayor a menor, de acuerdo al rango promedio.

Tratamiento	H0	H3	H2	H1
H0	-	ns	sig	sig
H3		-	ns	ns
H2			-	ns
H1				-

ns: efecto no significativo. sig: efecto significativo

Anexo 9. Número de hojas trifoliadas por planta

En la **Tabla 25** se presenta el número de hojas trifoliadas por planta de soja sin inocular e inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 20: Número de hojas trifoliadas por planta de soja a los 14 días desde la siembra.

Tratamiento	Hormonas	N° de hojas trifoliadas/Planta
A	H0	0,8
A	H1	3,2
A	H2	2,6
A	H3	1,5
I	H0	3,7
I	H1	0,5
I	H2	1,0
I	H3	2,0

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: sin inocular.

Anexo 10. Número y porcentaje de nódulos en raíz primaria, secundaria y total

En la **Tabla 26-27** se presentan, el número y porcentaje de nódulos en raíz primaria, secundaria y total de plantas de soja inoculadas, más la adición exógena de fitohormonas, a los 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 21: Número de nódulos en raíz primaria, secundaria y total de plantas de soja a los 14 días desde la siembra, para los tratamientos inoculados con *B japonicum* E109.

Tratamiento	N° NR1/Planta	N° NR2/Planta	N° NT/Planta
IH0	6	1,9	7,9
IH1	5,4	0,6	6
IH2	4,9	1,9	6,8
IH3	4,9	1,9	6,8

Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado, N° NR1/Planta: Número de nódulos en raíz primaria por planta, N° NR2/Planta: Número de nódulos en raíz secundaria por planta, N° NT/Planta: Número de nódulos total por planta.

Tabla 22: Porcentaje de nódulos en raíz primaria, secundaria y total por planta de soja a los 14 días desde la siembra, para los tratamientos inoculados con *B japonicum* E109.

Tratamiento	PNRP	PNRS	PNT
IH0	92	50	100
IH1	100	60	100
IH2	88	75	100
IH3	91	55	91

Referencias: H0: sin el agregado de hormonas, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado. PNRP: porcentaje de nódulos en raíz primaria; PNRS: porcentaje de nódulos en raíz secundaria y PNT: porcentaje de nódulos total.