



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO QUIMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES
Laboratorio de Fisiología Vegetal**

EFECTO DE LA INOCULACION CON *Achromobacter xylooxidans* Y *Bacillus pumilus* SOBRE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)

Mic. Paula V. Castillo

Director: Dr. Sergio G. Alemano

Co-Directora: Dra. Ana E. Vigliocco

-2018-

ÍNDICE

-Introducción	
1. El girasol	14
1.1. Estadios fenológicos del girasol	15
1.2. Producción del cultivo de girasol en Argentina	17
2. Hormonas vegetales y la respuesta al estrés	19
2.1. Auxinas	20
2.2. Ácido Abscísico	22
2.3. Ácido Salicílico	23
2.4. Ácido Jasmónico	25
2.5. Hormonas y su aplicación en agricultura	28
3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	28
3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hormonas	34
3.2. Bacterias como inoculantes	36
-Hipótesis	39
-Objetivo general	39
-Objetivo específicos	39
-Materiales y Métodos	41
1. Especie vegetal y cepas bacterianas	41
2. Viabilidad de las cepas bacterianas individuales	41
3. Viabilidad de las cepas bacterianas en co-inoculos	41
4. Producción de hormonas por las cepas bacterianas	42
5. Ensayos de inoculación en plantas de girasol	43
5.1. Inoculación de semillas	43
5.2. Inoculación simple y co-inoculación de plántulas de girasol cultivadas en condiciones control y de estrés, en sustrato sólido	43

5.3. Contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, cultivadas en condiciones control y de estrés, en sustrato sólido	44
5.4. Inoculación de plántulas de girasol, cultivadas en condiciones control y de estrés, en sustrato líquido	44
5.5. Ensayos de inoculación a campo	45
6. Ensayos de aplicación exógena de hormonas	46
6.1. Aplicación exógena de hormonas en plantaulas de girasol	46
6.2. Aplicación exógena de mezclas de hormonas en plántulas de girasol inoculadas	47
-Resultados	49
1. Viabilidad de las cepas bacterianas individuales	49
2. Viabilidad de las cepas bacterianas en co-inóculos	50
3. Capacidad de producción de hormonas por las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4	50
4. Efecto de la inoculación simple y co-inoculación en plántulas de girasol cultivadas en condición control y de estrés hídrico, en sustrato sólido	52
4.1. Diámetro del Tallo	52
4.2. Longitud de parte aérea y radical	53
4.3. Peso fresco de parte aérea y radical	54
4.4. Peso seco de parte aérea y radical	55
4.5. Contenido de SA	56
4.6. Contenido de AIA	58
4.7. Contenido de ABA	59
4.8. Contenido de JA	60
4.9. Contenido total de hormonas	62

4.10. Contenido relativo de agua (CRA)	63
5. Efecto de la inoculación simple de plántulas de girasol cultivadas en condiciones control y de estrés, en sustrato líquido	64
5.1. Longitud de parte aérea y radical	64
5.2. Peso fresco de parte aérea y radical	65
5.3. Peso seco de parte aérea y radical	66
6. Ensayos de inoculación a campo	67
6.1. Localidad de Manfredi	67
6.2. Localidad de Vicuña Mackenna	71
6.3. Localidad de Bulnes	73
7. Aplicación exógena de hormonas en plántulas de girasol	75
7.1. Diámetro del Tallo	75
7.2. Longitud de parte aérea y radical	76
7.3. Peso fresco de parte aérea y radical	78
7.4. Peso seco de parte aérea y radical	79
8. Aplicación exógena de mezclas hormonales en plántulas de girasol inoculadas	80
8.1. Longitud de parte aérea y radical	81
8.2. Peso fresco de parte aérea y radical	83
8.3. Peso seco de parte aérea y radical	85
-Discusión	88
-Conclusiones	108
-Bibliografía	110
-Anexo	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Distribución geográfica en Argentina del cultivo de girasol hasta el ciclo agrícola 2010/2011.	14
Fig. 2. Estadios fenológicos del girasol.	17
Fig. 3. Producción de girasol a) y rendimiento del cultivo en Argentina b), desde 1969/1970 hasta 2014/2015.	18
Fig. 4. Hormonas implicadas en la regulación del crecimiento, desarrollo y en las respuestas a estrés en las plantas	20
Fig. 5. Vías metabólicas para la síntesis de AIA.	21
Fig. 6. Biosíntesis de ABA y sus metabolitos.	23
Fig. 7. Posibles vías de biosíntesis de SA.	24
Fig. 8. Vías de síntesis de JA.	26
Fig. 9. Mecanismo de tolerancia a sequía en plantas, inducida por bacterias promotoras del crecimiento vegetal	31
Fig. 10. Tinción de Gram y morfología de las colonias en medio LB, de <i>Bacillus pumilus</i> (cepas SF3 y SF4) a) y b) y de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (cepa SF2) c) y d).	33
Fig. 11. Inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos de girasol <i>Verticillium orense</i> a), <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> b) y <i>Alternaria</i> sp. c) por las cepas bacterianas nativas del cultivo.	34
Fig. 12. Colonización de la semilla por bacterias aplicadas como inoculantes, a) semilla inoculada; b) la bacteria debe ser capaz de adaptarse y multiplicarse en la rizósfera; c) en respuesta a los exudados de la raíz, las bacterias se adhieren a la superficie radical; d) colonización del sistema radical en desarrollo; e) las bacterias pueden colonizar la región interna de la raíz.	37
Fig. 13. Recuento en colonias de las cepas SF2 a), SF3 b) y SF4 c) en los medios de cultivo Luria Bertani (LB, rojo), Glucosa-levadura (GY,	49

azul) y Omafubve modificado (OM, verde), a los 30, 90, 180 y 365 días de almacenamiento.

Fig. 14. Recuento de colonias de las cepas SF2 (azul), SF3 (verde) y SF4 (rojo), cultivadas en medio LB de manera combinada, SF2-SF3 a) y SF2-SF4 b), a los 2, 30, 90 y 180 días de almacenamiento **50**

Fig. 15. Producción de SA a), AIA b), JA c) y ABA d) por las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4, en los medios de cultivo LB, GY y OM, a los 4 y a los 180 días de almacenamiento. **51**

Fig. 16. Diámetro del tallo de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control y de estrés hídrico. **52**

Fig. 17. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). **53**

Fig. 18. Plántulas de girasol de 18 días crecidas en condiciones control a) y b) y de estrés hídrico c) y d), inoculadas a) y c) y co-inoculadas b) y d). **54**

Fig. 19. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). **55**

Fig. 20. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). **56**

Fig. 21. Contenido de SA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). **57**

Fig. 22. Contenido de AIA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). **59**

Fig. 23. Contenido de ABA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b).	60
Fig. 24. Contenido de JA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b).	61
Fig. 25. Patrón de distribución hormonal, expresado en porcentaje, en plántulas enteras (tallo + raíz), inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control y de estrés hídrico.	63
Fig. 26. Plántulas de girasol inoculadas, crecidas en condiciones control y de estrés, en sustrato líquido.	64
Fig. 27. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido.	65
Fig. 28. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido.	66
Fig. 29. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido.	67
Fig. 30. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondientes a los ciclos agrícolas 2007/2008, 2008/2009 y 2011/2012 en la localidad Manfredi.	70
Fig. 31. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondientes a los ciclos agrícolas 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 en la localidad Vicuña Mackenna.	73

Fig. 32. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondiente al ciclo agrícola 2010/2011 en la localidad Bulnes.	75
Fig. 33. Diámetro de tallo de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas.	76
Fig. 34. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas.	77
Fig. 35. Plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas.	78
Fig. 36. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas.	79
Fig. 37. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas.	80
Fig. 38. Plántulas de girasol regadas con HOA y mezclas hormonales M1 y M2, no inoculadas e inoculadas con las cepas bacterianas.	81
Fig. 39. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y no inoculadas, regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c).	82
Fig. 40. Morfología de plántulas regadas con soluciones Control a) y d), M1 b) y M2 c) y e)	83
Fig. 41. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y no inoculadas, regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c).	84
Fig. 42. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y no inoculadas, regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c).	86
Fig. 43. Relación peso seco de parte radical y aérea (R/A) de plántulas de girasol inoculadas y no inoculadas, regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c).	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características PGPR de las bacterias aisladas de girasol.	33
Tabla 2. Variables medidas en los cultivos de girasol realizados a campo.	46
Tabla 3. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas de plantas de girasol inoculadas con cepas comercial y nativas, correspondiente a los ciclos agrícolas 2007/2008, 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 de la localidad Manfredi.	69
Tabla 4. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas en plantas de girasol inoculadas con cepa comercial y nativas, correspondiente a los ciclos agrícolas 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 en la localidad Vicuña Mackenna.	72
Tabla 5. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas en plantas de girasol inoculadas con cepa comercial y cepas nativas, correspondiente al ciclo agrícola 2010/2011 en la localidad Bulnes.	74

Resumen

En Argentina el girasol (*Helianthus annuus* L) es la segunda oleaginosa de importancia económica. Actualmente ha sido desplazado a zonas agrícolas marginales, donde sufre frecuentes períodos de sequía durante el ciclo de cultivo. Existen bacterias asociadas a la promoción del crecimiento de plantas (PGPB) que interactúan y mejoran algunos aspectos de los cultivos, incluso en condiciones de estrés hídrico. Nuestro grupo de trabajo aisló de raíces de plantas de girasol cultivadas a campo con irrigación y sequía las bacterias *Achromobacter xylosoxidans* (cepa SF2) y *Bacillus pumilus* (cepas SF3 y SF4), las cuales mostraron capacidad de solubilizar fosfatos, de fijar nitrógeno, e inhibieron el crecimiento de hongos patógenos específicos de girasol como *Verticillium orense*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Alternaria* sp. Las tres cepas presentaron actividad ACC-deaminasa, lo cual aliviaría indirectamente el estrés en las plantas y fueron capaces de producir ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido jasmónico (JA), hormonas implicadas en diversos procesos como el crecimiento y la respuesta inmune de las plantas (Forchetti y col., 2007, 2010). A partir de ello se propuso evaluar los efectos de la inoculación y co-inoculación con las cepas SF2, SF3 y SF4, sobre el crecimiento de la planta de girasol y profundizar el conocimiento de las relaciones hormonales entre el cultivo vegetal y las cepas bacterianas en condiciones normales y de estrés hídrico, como del rendimiento del cultivo a campo. En ensayos realizados “*in vitro*”, las cepas aplicadas en forma individual o combinada, mejoraron el crecimiento de plántulas en condiciones de estrés hídrico, y modificaron el perfil de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido abscísico (ABA), de plantas de 18 días (Castillo y col., 2013). Además, las bacterias nativas, fueron capaces de incrementar levemente el crecimiento vegetal en ensayos en los que se utilizó sustrato líquido para el crecimiento de las plántulas. Por otro lado, al aplicar las cepas conjuntamente con reguladores del crecimiento no se observaron diferencias en el crecimiento vegetal. Ensayos a campo realizados en diferentes localidades (Manfredi, Vicuña Mackenna y Bulnes), en cuatro ciclos agrícolas, incrementaron el rendimiento de granos y materia grasa de girasol. Evaluaciones de viabilidad de estas bacterias en medio de cultivo hasta los 6 meses, mostraron altos valores de recuentos en medio de cultivo LB, lo cual se muestra como promisorio al momento de elaborar un inoculante líquido. Nuestros hallazgos sugieren que la inoculación con las cepas nativas SF2, SF3 y SF4 de plantas de girasol cultivadas en áreas con condiciones de estrés hídrico, podrían incrementar el rendimiento del cultivo aún más que si se utiliza fertilización

química o inoculación con bacterias no nativas. Por lo tanto, el propósito de este trabajo de investigación sería obtener un inoculante específico para el cultivo de girasol, constituido principalmente por las cepas bacterianas aisladas por nuestro grupo, para ser utilizado con el fin de mejorar la implantación de las plántulas, mitigar el estrés tanto biótico como abiótico, e incrementar la producción y rendimiento en condiciones adversas.

Summary

In Argentina the sunflower (*Helianthus annuus* L) is the second oilseed of economic importance. At the moment it has been displaced to marginal agricultural areas, where it undergoes frequent periods of drought during the cycle of crop. There are bacteria associated with the promotion of plant growth (PGPB) that interact and improve some aspects of the crops, even under conditions of water stress. Our working group isolated from roots of sunflower plants, cultivated in the field with irrigation and drought, the bacteria *Achromobacter xylosoxidans* (strain SF2) and *Bacillus pumilus* (strains SF3 and SF4), which showed the ability to solubilize phosphates, to fix nitrogen, and inhibited the growth of specific pathogenic sunflower fungi such as *Verticillium orense*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria* sp. The three strains showed ACC-deaminase activity, which indirectly alleviates stress in plants and were able to produce salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA) and jasmonic acid (JA), hormones involved in various processes such as growth and immunity of plants (Forchetti et al., 2007, 2010). From this it was proposed to evaluate the effects of the inoculation and co-inoculation with the strains SF2, SF3 and SF4, on the growth sunflower plant and to deepen the knowledge of the hormonal relationships between the vegetable culture and the bacterial strains in normal conditions and water stress, as well as the yield of field crops. In tests carried out "in vitro", the strains applied individually or in combination, improved the growth of seedlings under water stress conditions, and modified the profile of the hormones SA, JA, IAA) and ABA, from 18-day plants (Castillo et al., 2013). In addition, bacterial strains there were able to slightly increase plant growth in trials in which liquid substrate was used for the growth of the seedlings. On the other hand, when we applying the strains together with growth regulators no differences in plant growth were observed. Field trials carried out in different locations (Manfredi,

Vicuña Mackenna and Bulnes), in four agricultural cycles, increased the yield of grains and sunflower fat. Viability evaluations of these bacteria in culture medium until 6 months showed high values cfu in LB culture medium, which is shown as promissory when preparing a liquid inoculant. Our findings suggest that inoculation with the native SF2, SF3 and SF4 strains of sunflower plants grown in areas with water stress conditions, the yield of the crop could be increased even more than if chemical fertilization or inoculation with non-native bacteria is used. Therefore, the purpose of this research work would be to obtain a specific inoculant for the cultivation of sunflower, constituted mainly by the bacterial strains isolated by our group, to be used in order to improve the implantation of the seedlings, mitigate the stress both biotic and abiotic, and increase production and yield under adverse conditions.

Introducción

1. El Girasol

Girasol pertenece a la familia *Asteraceae*, al género *Helianthus* que hace referencia a las palabras griegas *helios* (sol), y *anthos* (flor); y a la especie *annuus*, la cual está en relación a la anualidad de su ciclo vegetativo - reproductivo (Alba-Ordoñez y Llanos-Company, 1990). Es una planta sin ramificaciones que presenta un solo capítulo con numerosas flores liguladas y aquenios grandes. Procede de América del Norte y debido a su fácil adaptación al medio ambiente es que actualmente se lo cultiva en los cinco continentes.

En Argentina, el área potencial del cultivo de girasol se extiende desde Formosa-Chaco en el norte hasta el sur de la región pampeana (Fig. 1). El girasol es un cultivo ornamental importante en todo el mundo. Se cultiva con facilidad y principalmente en condiciones de secano en una amplia gama de suelos (Shehata y El- Khawas, 2003).

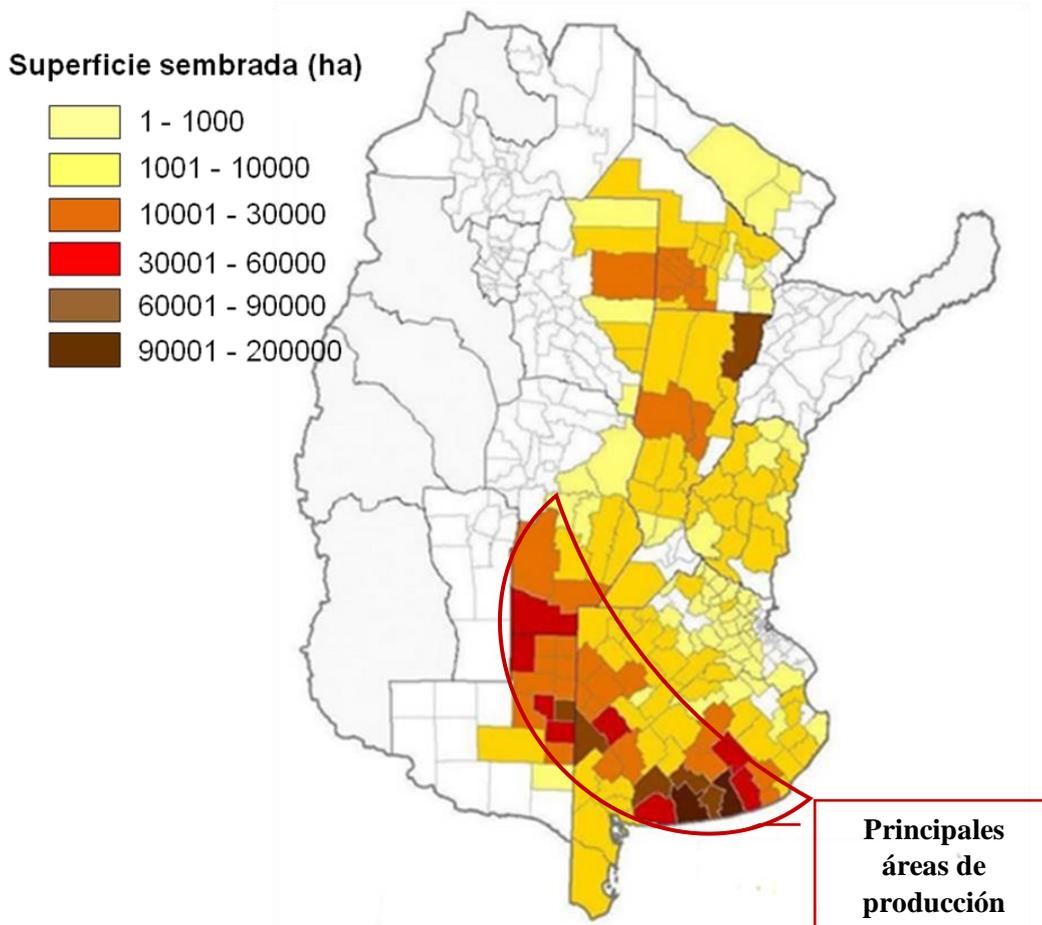


Fig. 1. Distribución geográfica en Argentina del cultivo de girasol hasta el ciclo agrícola 2010/2011 (Rural primicias, 2014; INTAGRO, 2015).

En los últimos años, debido al avance de la soja, el cultivo de girasol ha sido trasladado a áreas marginales del sistema agrícola argentino (Adreani, 2008). Estas zonas se

caracterizan por un régimen de deficiencia hídrica durante el ciclo del cultivo e irregularidad en la distribución de las precipitaciones. A nivel regional (pampeana subhúmeda-semiárida), la reubicación del girasol en zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad afecta directamente su producción y a los productores del cultivo, los cuales se estiman entre 3 a 5 mil distribuidos desde el Chaco hasta el sur de la región pampeana.

El girasol se utiliza para la alimentación de animales y es el segundo cultivo más importante produciendo aceite comestible después de la soja (Shehata y El- Khawas, 2003; Fairless, 2007). Se utiliza principalmente para la producción de aceite, confitería, alimentación de aves y ornamental (ASAGIR, 2009), y en la actualidad para producir biodiesel (Demirbas, 2007). Además, el girasol, puede acumular metales (Cindy y col., 2006; Niu y col., 2007; Fassler y col., 2010; Rojas-Tapias y col., 2012) por lo que su crecimiento en tierras contaminadas se utiliza para la fitorremediación de las mismas (Madejon y col., 2003; Liphadzi y col., 2006; Gutiérrez-Espinoza y col., 2011). La creciente demanda de aceites, el auge del biodiesel y la nueva tendencia de utilizar aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados, han llevado a un mejor posicionamiento del cultivo de girasol, generando grandes expectativas en Argentina para cubrir la demanda mundial.

1.1. Estadios fenológicos del girasol

En el cultivo de girasol se pueden considerar cuatro fases fenológicas (Fig. 2), que se refieren a los cambios relevantes que sufren las plantas en cada una de ellas (Meier, 2001; Trapani y López Pereira, 2004).

a) Siembra: es la fase de establecimiento del cultivo en la que tienen lugar la imbibición de las semillas, la emergencia de la radícula, el crecimiento de la plántula y la emergencia de la misma. La temperatura es el factor más importante en el control de la germinación de semillas no dormidas, en suelos no compactados y con adecuada provisión hídrica. La temperatura óptima para la germinación es cercana a los 26 °C, con temperaturas máximas de 40 °C y mínimas de 3 °C (Connor y Hall, 1997). En condiciones sin limitaciones hídricas se puede predecir la fecha de emergencia de las plántulas de girasol, conociendo la profundidad de siembra y la temperatura.

b) Emergencia: esta fase comienza con la emergencia de la plántula y finaliza cuando el ápice del vástago, productor de primordios foliares, cambia su forma y actividad, pasando a diferenciar la inflorescencia y sus flores. Durante esta fase, se define la capacidad potencial del cultivo de producir área foliar, pues queda fijado el número de hojas por planta. Al mismo

tiempo comienza la expansión de las hojas emergidas. La duración de la emergencia depende principalmente del cultivar, la temperatura y el fotoperíodo (Trapani y López Pereira, 2004).

c) Iniciación floral: la fase comienza con la aparición de los primeros primordios florales en el ápice y finaliza con el comienzo de la antesis de las flores de la periferia de la inflorescencia. Durante el primer tercio de esta fase se diferencian los primordios florales. Una vez finalizada la diferenciación floral y hasta la antesis, las flores crecen y adquieren funcionalidad: los estigmas adquieren receptividad y el polen viabilidad. La duración de esta fase depende del cultivar, la temperatura y el fotoperíodo. El rango de temperaturas apropiado para obtener el mayor número de flores que producirán granos se extiende de 20-30 °C (Chimenti y col., 2001). Esta etapa es de suma importancia para fijar los componentes del rendimiento ya que durante la misma, no solamente se forma el capítulo, sino que también se construye el máximo potencial de almacenaje de carbohidratos y minerales de la planta.

d) Madurez fisiológica: esta fase comienza con la antesis de las flores periféricas del capítulo y finaliza con la madurez fisiológica, cuando los granos alcanzan su máximo peso seco. Para definir madurez fisiológica se toman en cuenta los cambios de color del envés del capítulo, el cual se torna amarillento, y de sus brácteas, que se vuelven marrones. La madurez comercial se determina según el contenido de humedad del fruto, adecuado para la cosecha mecánica (13-15%), teniendo en cuenta que la base para su comercialización es del 11%. La duración de este periodo depende principalmente del cultivar y de la temperatura. La sequía y las enfermedades pueden generar un estrés severo que acelere la pérdida de hojas, interrumpiendo el crecimiento de los granos, determinando así una menor duración de esta fase (Trapani y López Pereira, 2004).

El período de siembra del girasol se extiende durante octubre-noviembre, variando la fecha óptima según la zona del país y el cultivar seleccionado. El rendimiento o peso de frutos por unidad de superficie, puede ser dividido en diferentes componentes: número de capítulos por unidad de superficie, número de frutos llenos por capítulo y peso individual de esos frutos (Aguirrezabal y col., 2001). Según Trapani y col. (2003) y Aguirrezábal y Andrade (2002) el número de granos es el principal determinante del rendimiento.

El número de capítulos por unidad de superficie resulta del número de plantas por unidad de superficie capaces de desarrollar una inflorescencia. Dicho componente del rendimiento depende del número de semillas sembradas y de la proporción que germinan, emergen, crecen y se desarrollan. Este componente del rendimiento se define principalmente

durante la germinación y la emergencia de la planta, ya que las pérdidas posteriores de plantas o capítulos son menos frecuentes, produciéndose en casos de ataques de enfermedades, quebrado o vuelco (Pedraza y col., 2000). Asimismo, el rendimiento en aceite del cultivo puede ser expresado en términos de: número de granos por unidad de superficie, peso por grano y concentración de aceite (Trapani y col., 2003).

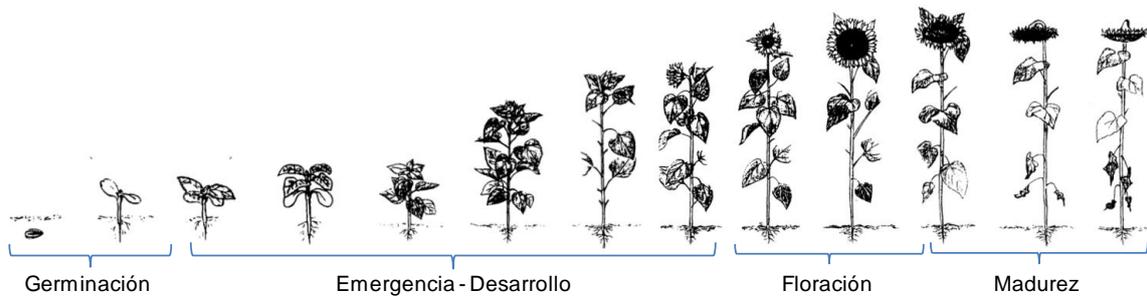


Fig. 2. Estadios fenológicos del girasol (extraído y modificado de Meier 2001).

1.2. Producción del cultivo de girasol en Argentina

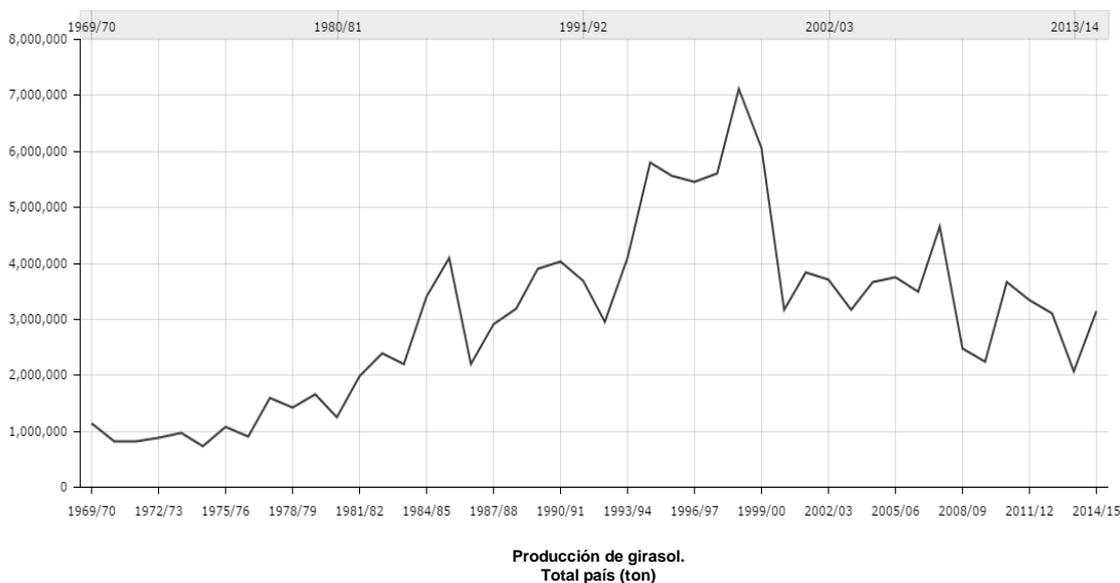
En el área agrícola de nuestro país el girasol soporta con cierta frecuencia períodos de estrés hídrico, problemática que se acentúa hacia la zona oeste. La sequía, las elevadas temperaturas, la salinidad y el pH del suelo son los factores que limitan la productividad y el rendimiento de cultivos, debido a que afectan casi todas las funciones de la planta (Shao y col., 2008). El déficit hídrico afecta todos los aspectos relacionados con el desarrollo del girasol, tales como la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica de la planta. En general, esta especie es relativamente tolerante a sequía debido a la capacidad de su sistema radical de absorber agua de horizontes profundos del suelo. Además, posee algunos mecanismos de adaptación al déficit hídrico comunes a todas las plantas: por ejemplo, la disminución de la superficie foliar lo cual reduce la tasa de transpiración y, en menor medida, la tasa de aparición de las hojas. En la etapa de floración se puede producir una reducción de la superficie transpiratoria a través de una aceleración de la senescencia de las hojas (Aguirrezábal y col., 2001), procesos mediados por la participación de diferentes hormonas. Sin embargo, a pesar de las adaptaciones, el estrés causa reducción en la producción del cultivo.

Argentina esta entre los tres primeros países exportadores de aceite de girasol a nivel mundial (Bolsa de comercio de Rosario, 2017). En el ciclo de siembra 2013/2014 la superficie implantada fue de 1.313.195 ha, mientras que la superficie cosechada fue de 1.261.640 ha, la cual resultó la más baja de los últimos 10 años. Esta reducción en la implantación en la última campaña agrícola, implicó una producción de granos 2.063.410 ton, aunque el impacto en rendimiento por ha (1635 Kg. ha^{-1}), resulto similar al promedio de los últimos diez años ($1.728 \text{ Kg. ha}^{-1}$) (MINAGRI, 2015). La reducción en la implantación se debería a la sequía que afectó a la zona de cultivo de esta especie y al avance del cultivo de soja.

En el ciclo de siembra 2014/2015, debido al aumento en las precipitaciones durante todo el periodo del cultivo y, probablemente a la aplicación de paquetes tecnológicos adecuados, se incrementaron notablemente la producción y el rendimiento de granos, alcanzando 3.158.290 ton y $2.193 \text{ Kg. ha}^{-1}$ respectivamente, siendo este último el mayor rendimiento registrado hasta el momento (Fig. 3).

En el último ciclo agrícola, 2016/2017, se registró un incremento en la superficie sembrada, alcanzando alrededor de 2 millones de hectáreas, lo cual representó una producción estimada de 3,5 millones de toneladas (MINAGRO, 2017), esto posiciona a nuestro país como el cuarto productor de girasol y el tercer exportador de aceite luego de Ucrania y Rusia (Oilseed, 2017).

a)



b)

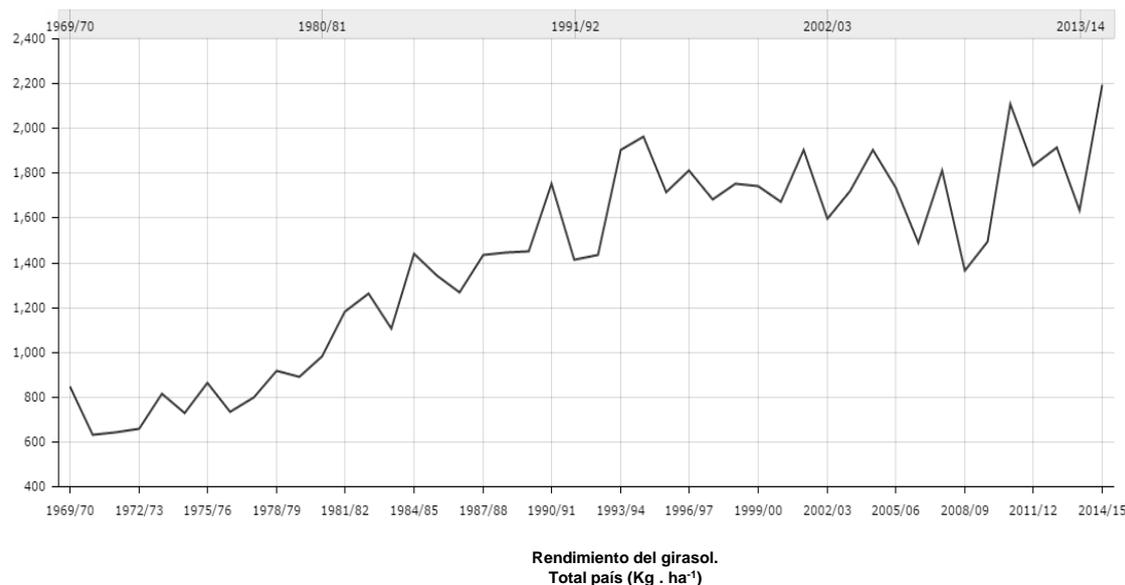


Fig. 3. Producción de girasol a) y rendimiento del cultivo en Argentina b), desde 1969/1970 hasta 2014/2015. (Siia, 2015).

2. Hormonas vegetales y la respuesta al estrés

Los reguladores del crecimiento de las plantas, hormonas vegetales o fitohormonas, son compuestos orgánicos de origen natural que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de las mismas (Pazurkiewicz Kocot, 2003). Son sintetizados en diferentes partes de la planta y pueden ser transportados a otros sitios (Fig. 4), donde regulan la expresión de genes involucrados en importantes procesos fisiológicos, entre ellos: elongación del tallo, caída de las hojas, floración, formación del fruto, dormición, germinación y respuesta a factores bióticos y abióticos (Aguilar-Piedras y col., 2008).

Debido a su naturaleza sésil, las plantas siempre se han enfrentado con diversos tipos de estrés abiótico y biótico, en su ambiente inmediato. Como consecuencia de ello, la supervivencia de las plantas depende de su capacidad para adaptarse rápidamente, del desarrollo y el crecimiento y de escapar o mitigar los impactos de estrés. Todas las plantas perciben y responden a las señales de estrés tales como sequía, el calor, la salinidad, la herbivoría, y a los patógenos. Dicha respuesta la llevan a cabo mediante la producción de diversas hormonas tales como ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), brasinoesteroides, estrigolactonas, entre

otras, alterando el metabolismo de fosfolípidos, síntesis de proteínas relacionadas al estrés y la expresión de genes.

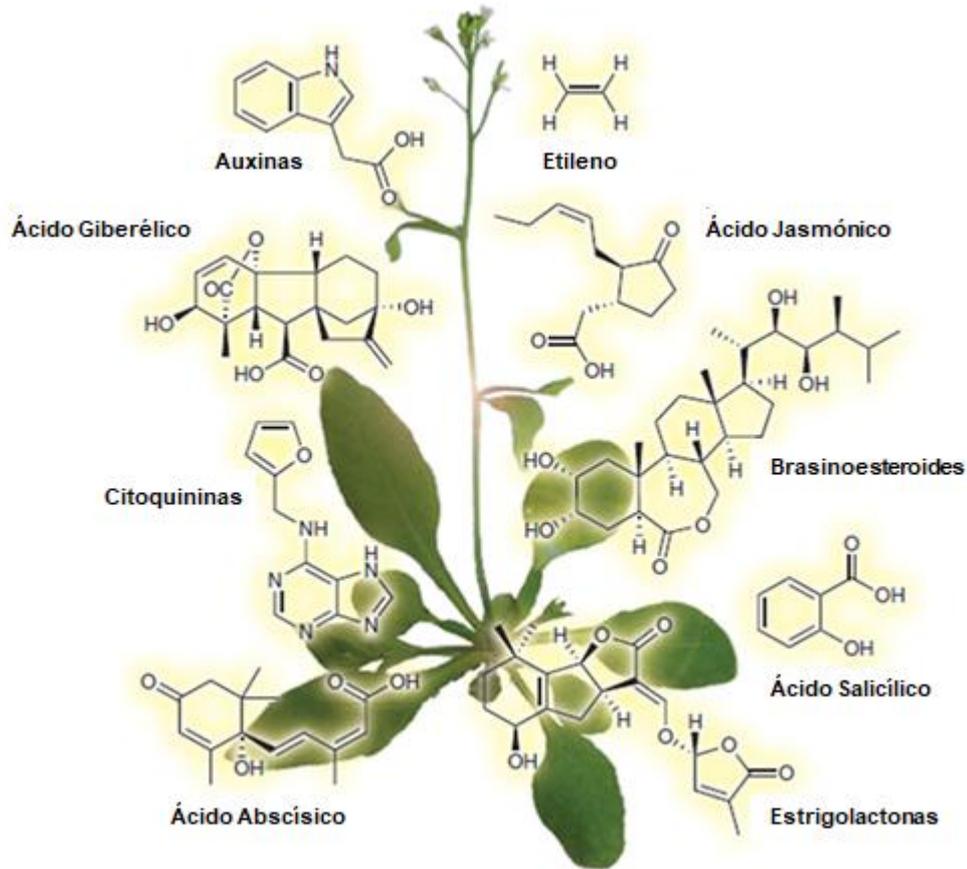


Fig. 4. Hormonas implicadas en la regulación del crecimiento, desarrollo y en las respuestas a estrés en las plantas (modificado de Santner y col., 2009).

2.1. Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos químicos que han sido vinculadas a prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz y gravedad (fototropismo y geotropismo), diferenciación de tejidos vasculares, estimulación de la división celular, dominancia apical, desarrollo de raíces laterales y adventicias (Cleland, 1990; Glick, 1995; Ross y col., 2000; Chaudhry y Rasheed, 2003, Báez-Perez y col., 2015). La hormona más importante dentro de este grupo es el ácido indol-3-acético (AIA).

El AIA derivado del triptófano (Trp) afecta a casi todos los aspectos del desarrollo de la planta, estimula a corto plazo el crecimiento y a largo plazo la división y diferenciación

celular (Ross y col., 2000), y está implicado en las respuestas al estrés abiótico (Shibasaki y col., 2009; Jain y Khurana, 2009). Para su síntesis se han propuesto al menos cinco vías metabólicas: I) ácido indol 3-pirúvico (IAP), II) ácido 3-acetamida (IAM) (Lehman y col., 2010), III) indol-3-acetonitrilo, IV) triptamina (Cheryl y Glick, 1996), y V) indol-3-acetaldoxima (Pollmann y col., 2006). Adicionalmente se ha descrito una vía que no requiere de Trp denominada vía independiente (Fig. 5).

Las principales fuentes de síntesis de AIA son meristemas apicales, hojas jóvenes, frutos y semillas en desarrollo (Ljung y col., 2001); desde allí se desplazan, hacia otras zonas de la planta, a través de un transporte polar que se extiende desde la punta del brote a la punta de la raíz. Además, una cantidad significativa de AIA también se produce en el floema, siendo este tejido probablemente la ruta principal por el que se transporta.

La fuente primaria de auxinas exógenas en plantas superiores, proviene de la microbiota rizosférica, donde casi el 80% de los grupos de bacterias establecidos serían capaces de producir *in vitro* compuestos tipo AIA. En estos microorganismos la vía biosintética fue planteada siguiendo dos rutas predominantes: la vía de IAM y la vía de AIP (Cheryl y Glick, 1996).

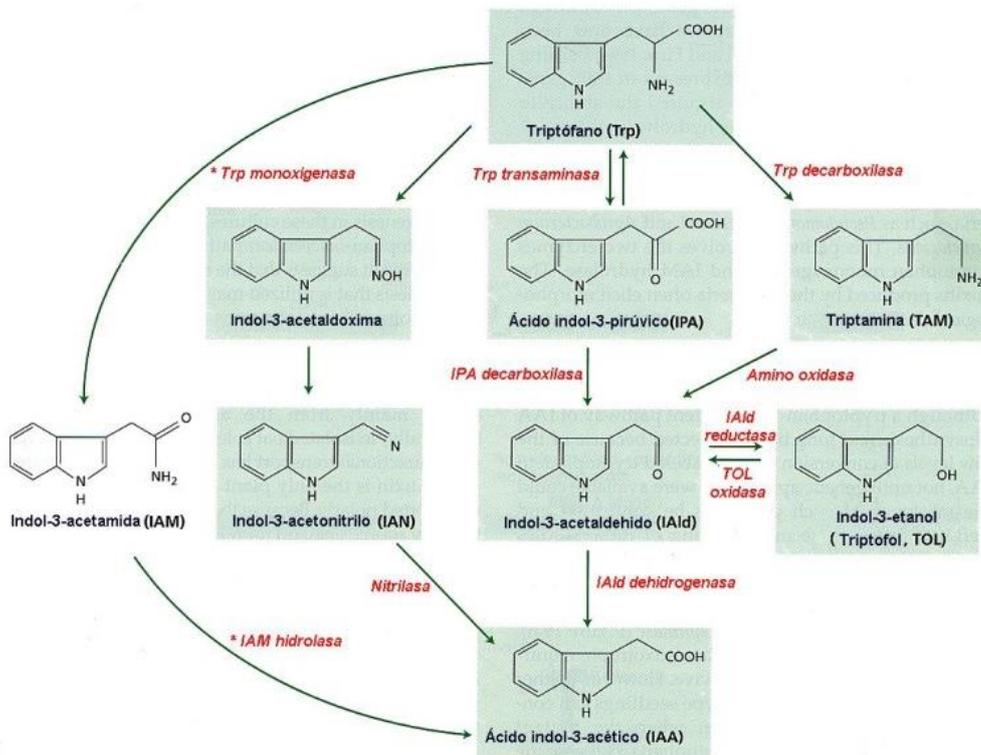


Fig. 5. Vías metabólicas para la síntesis de AIA (extraído de Santner y col., 2009).

2.2. Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que interviene en la maduración de las semillas, en la síntesis de proteínas y lípidos de reserva (Seo y Koshiba, 2002; Xiong y Zhu, 2003), en la promoción de la tolerancia a la desecación de semillas y tejidos vegetativos (Finkelstein y col., 2002), en la inducción y el mantenimiento de la dormición (Kushiro y col., 2004; Okasabe y col., 2005; Destefano-Beltrán y col., 2006; Finkelstein y col., 2008) y en el crecimiento reproductivo (Rock, 2000), además sus niveles endógenos se modifican en respuesta al estrés abiótico.

ABA y sus productos oxidados, el ácido faseico (PA) y el ácido difaseico (DPA), pueden ser conjugados como ésteres, particularmente ABA como glucosil ésteres (ABA-GE) o bien oxidados (PA y DPA) (Oritani y Kiyota, 2003) (Fig. 6). En general, estos metabolitos se almacenan en vacuolas donde no están expuestos a hidrólisis y se liberan en el momento necesario.

El valor fisiológico más importante de ABA ha sido relacionado con la supervivencia de la planta y la regulación de la apertura y cierre estomático y la adaptación al ambiental (Davies y Jones, 1991; Wasilewskaa y col., 2008). También actúa como una molécula señal que impide el ingreso de bacterias patógenas por vía estomática, formando parte del sistema inmune de la planta (Mohr y Cahill, 2003; Melotto y col., 2006; de Torres-Zabala y col., 2007; Adie y col., 2007) y tiene efecto antagónico con otras hormonas de defensa como SA (Mohr y Cahill, 2007) y JA (Anderson y col., 2004).

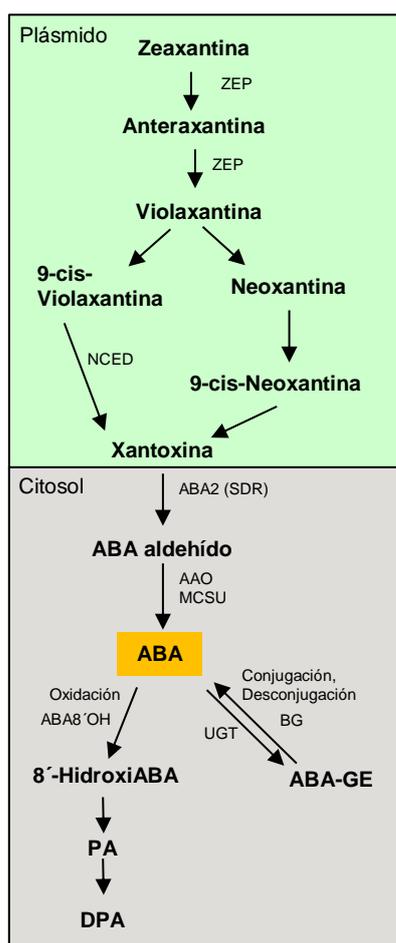


Fig. 6. Biosíntesis de ABA y sus metabolitos (modificado de Seiler y col., 2011).

2.3. Ácido Salicílico

El ácido salicílico (SA) es un compuesto derivado del ácido benzoico, ambos originados en la vía metabólica de los fenilpropanoides (Qualley y col., 2012), y es un regulador del crecimiento involucrado en una amplia gama de respuestas fisiológicas y metabólicas de las plantas (Hayat y col., 2010a). Durante las últimas dos décadas, SA se ha reportado como una molécula de señalización que media las respuestas de defensa local y sistémica contra los agentes patógenos (Shah, 2003; Durrant y Dong, 2004; Vlot y col., 2009). También se ha informado que desempeña un papel en la respuesta de las plantas al estrés abiótico tales como sequía (Munné-Bosch y Peñuelas, 2003; Chini y col., 2004), bajas temperaturas (Kang y Saltveit, 2002), metales pesados (Metwally y col., 2003; Yang y col., 2003; Freeman y col., 2005), estrés osmótico (Borsani y col., 2001) y calor (Larkindale y Knight, 2002; Larkindale y col., 2005). De hecho, algunos estudios indican que SA puede afectar el funcionamiento estomático (Mori y col., 2001; Lu y Chen, 2005, Hao y col., 2011).

Es un antioxidante no enzimático y regula el crecimiento vegetal, desempeñando un papel importante en una serie de procesos fisiológicos de la planta incluyendo la fotosíntesis (Waseem y col., 2006; Arfan y col., 2007) y la actividad de los cloroplastos, la absorción y transporte de nutrientes. Aplicado exógenamente provoca cambios en la anatomía de las plantas e incrementa el rendimiento (Khan y col., 2010; Purcărea and Cachita-Cosma, 2010).

En plantas se conocen dos vías de síntesis de SA: I) vía de fenilalanina amonio liasa (PAL), y II) isocorismato sintasa (ICS) (Dempsey y col., 2011), ambas utilizan corismato como precursor (Chen y col., 2009). Asimismo se sabe que algunas bacterias pueden sintetizarlo a partir del mismo precursor que las plantas, a través de dos reacciones catalizadas por la ICS y piruvato isocorismatoliasa (IPL), aunque esta última no ha sido encontrada en vegetales (Chen y col., 2009; An y Mou 2011) (Fig. 7).

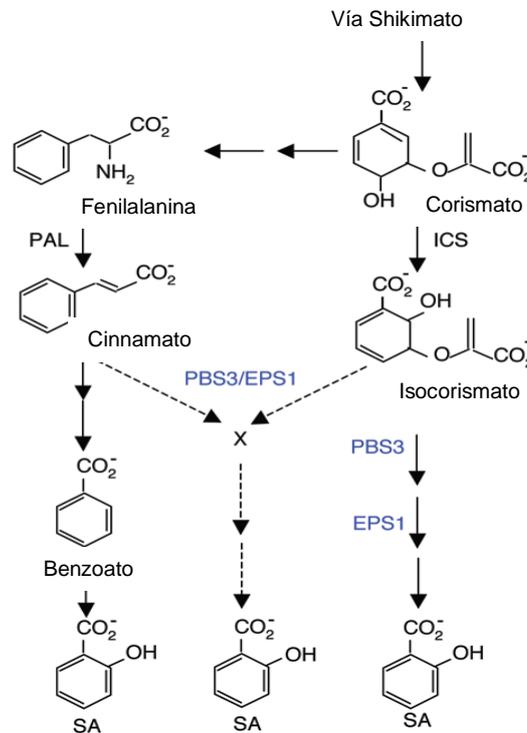


Fig. 7. Posibles vías de biosíntesis de SA (modificado de Chen y col., 2009).

Actualmente se sabe que los metabolitos secundarios no tienen un papel exclusivo en los diferentes procesos que ocurren en las plantas, sino que los mismos se llevan a cabo debido al “diálogo” o “crosstalk” que ocurren entre las hormonas. La interacción antagónica entre SA-JA es una de ellas y se pone de manifiesto para afrontar los factores bióticos estresantes.

2.4. Ácido Jasmónico

El ácido jasmónico (JA) y sus metabolitos, llamados colectivamente jasmonatos (JAs), son derivados de lípidos que modulan el crecimiento de raíces, el desarrollo de la flor, la senescencia y ajustan las ventajas competitivas de crecimiento-defensa que optimizan la aptitud de la planta en respuesta a recursos limitados (Browse, 2009; Wasternack y Hause, 2002; Wasternack, 2007; Gimenez-Ibanez y col., 2015). La participación de los JAs en respuesta a estrés biótico y abiótico fue ampliamente estudiada en diversas especies (Lehmann y col., 1995, Kramell y col., 2000; Wasternack y Hause 2002; Wasternack, 2006; Wasternack y Hause 2013). En este sentido, los JAs median la respuesta al estrés biótico tales como el ataque de insectos y microorganismos patógenos (Stintzi y col., 2001; Browse y Howe, 2008), abiótico como la exposición a luz ultravioleta y heridas (Wasternack y Hause, 2002; Pedranzani y col., 2003; Wasternack, 2007; Wasilewska y col., 2008; Wasternack y Hause 2013), y ajustan las ventajas competitivas de crecimiento-defensa, optimizando la aptitud de la planta en respuesta a las limitaciones de recursos (Wasternack, 2007, Gimenez-Ibanez y col., 2015).

El camino de biosíntesis de los JAs comienza a partir del ácido graso poliinsaturado α -ácido linoleico (α -LA). Este ácido graso puede ser sustrato de una 9-lipooxigenasa (9-LOX) o de una 13-lipooxigenasa (13-LOX), enzimas que insertan un oxígeno en la posición 9 o 13 del α -ácido linoleico, generando 9-hidroperóxido de ácido linolénico (9-HPOT) o 13-hidroperóxido de ácido linolénico (13-HPOT), esta última es la que genera JA. Estos HPOT resultantes son convertidos por una óxido de aleno sintasa (AOS) (Knopf y col., 2012) en el ácido *cis*-(+)-12-oxofitodenoico (OPDA) (Stenzel y col., 2012; Wu y col., 2011). Este compuesto por acción de una OPDA reductasa (OPR) y tres ciclos subsecuentes de β -oxidación produce el ácido (+)-7-iso-jasmónico. Esta sustancia fisiológicamente activa es convertida rápidamente en su estereoisómero estable, el (-) JA, que luego es metabolizado dando origen a diferentes JAs (Thines y col., 2007; Wasternack y Kombrink 2010; Scherer y col., 2010; Bannenberg y col., 2009). La biosíntesis de JAs ocurre en tres compartimentos celulares: en cloroplastos y eventualmente en otros plástidos donde JA es convertido a OPDA, en citoplasma OPDA es reducido por una OPR reductasa y en peroxisoma donde ocurren los tres pasos de β -oxidación. Luego en el citoplasma JA puede ser modificado por metilación, hidroxilación o conjugación (Seltmann y col., 2010; Schaller y Stintzi 2009; Wasternack y Kombrink 2010; Kombrink, 2012).

Tras estímulos endógenos o de estrés, las plantas acumulan diferentes JAs, siendo (+) -7-iso-JA-L-Ile (JA-Ile) el único compuesto bioactivo de los JAs (Fonseca y col., 2009) (Fig. 8).

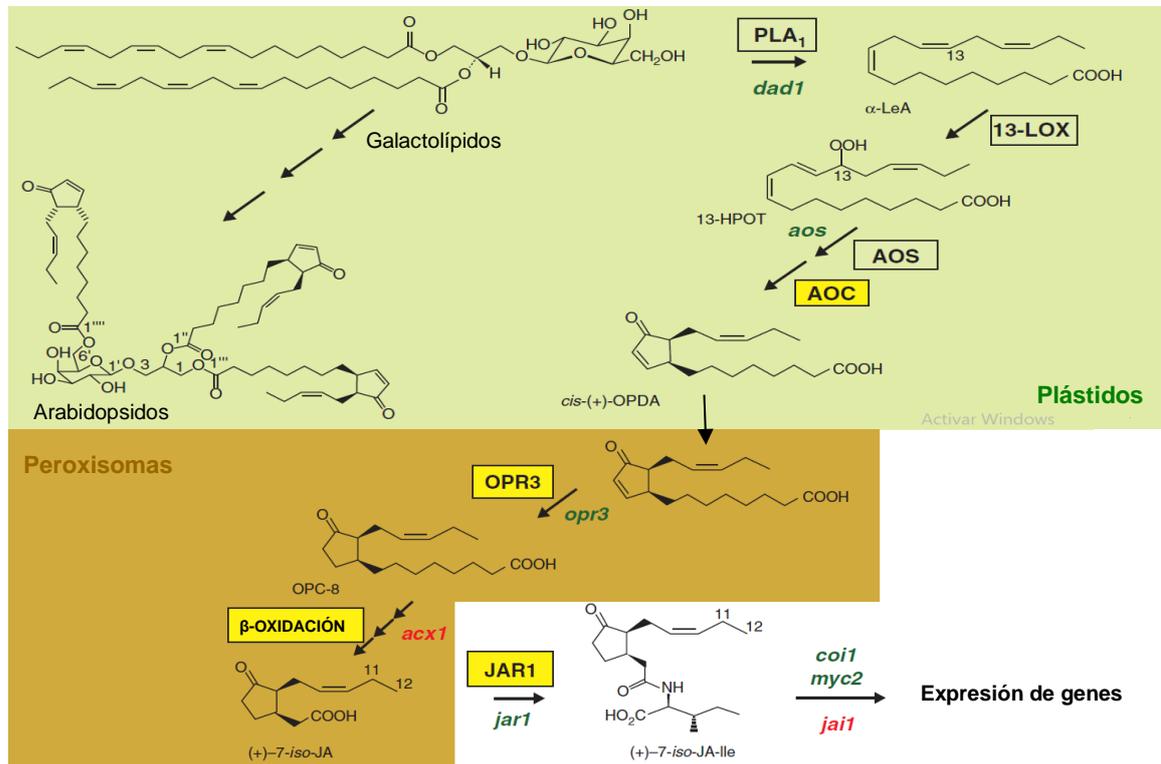


Fig. 8. Vías de síntesis de JA (modificado de Wasternack y Hause, 2013).

A nivel molecular, la producción de JA-Ile induce la interacción entre dos compuestos vegetales: la proteína coronatina II (COI1) y proteínas del dominio ZIM de los jasmonatos (JAZ). Estas últimas actúan como represores nucleares de los factores de transcripción denominados MYC (Kazan y col., 2012; Zhang y col., 2015). La interacción de JAZ con COI1, luego de la percepción de un estímulo o estrés, lleva a la degradación de JAZ (Fonseca y col., 2009; Thines y col., 2007; Chini y col., 2007), y por lo tanto a la desrepresión de los factores de transcripción MYC, los cuales inducen una reprogramación transcripcional para dar respuesta al estrés via JA (Pauwels y col., 2009; Pauwels y col., 2011).

Las proteínas JAZ pueden regular diferentes factores de transcripción y respuestas posteriores basadas en umbrales hormonales y / o complejos de proteínas únicos, debido a la interacción proteína-proteína específica o a coincidencias de proteínas específicas en etapas particulares de desarrollo, tejidos o tipos de células. Mientras que los factores de

transcripción MYC2, MYC3 y MYC4 desempeñan un papel primario en la defensa de las plantas, ya que su actividad es esencial para la acumulación de metabolitos secundarios de defensa y resistencia (Fernandez-Calvo y col., 2011; Scheizer y col., 2013). Al ser los principales reguladores de las respuestas de JA, los factores MYC son objetivos de múltiples procesos ambientales que modulan las respuestas de JA (Chini y col., 2007; Thines y col., 2007; Sheard y col., 2010; Pauwels y col., 2011; Fernandez-Calvo y col., 2011; Zhang y col., 2015). Además, los factores MYC, específicamente MYC2, participan en la interacción JA-SA, aunque en este caso no hay evidencia de que JAZ tenga un papel directo en la misma (Schmiesing y col., 2016).

Frente a determinados factores de estrés, es el mecanismo de represión-desrepresión mediado por MYC el que conlleva a una respuesta por JA e inactivación de la respuesta de SA o viceversa. Este antagonismo entre las vías de respuesta JA-SA, se manifiesta en situaciones de estrés provocadas por microorganismos patógenos, los cuales inducen en la planta inmunidad gatillada por efectores (ETI) o inmunidad gatillado por moléculas altamente conservadas de los microorganismos (MAMP) (Jones y col., 2006). A nivel molecular, el antagonismo JA-SA depende fundamentalmente de componentes de señalización de SA (NPR) los cuales podrían mediar la degradación de JAZ (Liu y col., 2016), de factores de transcripción descendentes (Spoel y col., 2003; Mao y col., 2007; Zander y col., 2010), de factores de transcripción de JA que regulan la biosíntesis y el metabolismo de SA (Zheng y col., 2012), y de la concentración de cada una de las hormonas (Mur y col., 2006).

Por otra parte, la interacción entre JA-Ácido Giberélico (GA) y JA-ABA implican un papel directo de JAZ (Chini y col., 2016). Además JA promueve la biosíntesis de auxinas (Dombrecht y col., 2007; Sun y col., 2011) y afecta la distribución y señalización de las mismas (Chen y col., 2011). JA también puede interconectarse con otras hormonas que están involucradas en la regulación del crecimiento, como BR y CK, y el estrés. El equilibrio entre los mecanismos probablemente contribuya a un mayor y mejor conocimiento de los numerosos mecanismos regulados por JA.

Por lo tanto, la contribución colectiva de las hormonas durante las interacciones planta-estímulos es crucial para establecer el programa de respuesta e inmuno-transcripción contra microorganismos invasores y/o estrés abiótico.

2.5. Hormonas vegetales y su aplicación en agricultura

Las hormonas vegetales o reguladores del crecimiento, tienen uso en diversas aéreas, por ejemplo, agricultura, horticultura y floricultura, y son aplicadas exógenamente y en diferentes momentos del desarrollo vegetal, intentando lograr diversos propósitos, como el aumento de crecimiento de las plantas, el retraso o promoción de la maduración, inducción del enraizamiento, promoción de la abscisión y el control de malezas (Emongor, 1995). Un ejemplo de lo anterior es el uso del ácido indol butírico (AIB), que se utiliza para la propagación asexual de frutales y plantas ornamentales, debido a que promueve el desarrollo radicular que le permiten absorber agua y nutrientes (Esteban-Soto; 2006). La misma hormona aplicada en forma de riego y sobre las hojas, influye en el fortalecimiento del sistema radical, en la producción de biomasa, nutrición vegetal y por lo tanto, en la producción y calidad de los granos de trigo (Baez-Perez y col., 2015). Otras auxinas y SA también han sido aplicadas en tomate (Cuesta y Mondaca, 2014; Valdez Sepulveda y col., 2015); y el GA en maíz (Ghodrat y col. 2012), mostrando resultados similares a los citados.

Debido a que las hormonas vegetales o promotores del crecimiento pueden además reducir el estrés abiótico, su aplicación también ha sido considerada como un medio de mejorar la eficiencia de técnicas de remediación del suelo (Barbafieri y Tassi, 2010; Cabello-Conejo y col., 2013; Cassina y col., 2011). Entre los promotores probados se encuentran productos a base de giberelinas (GAs), citoquininas y auxinas (Cabello- Conejo y col., 2014).

La aplicación de estos productos sobre semillas, hojas o raíz (a través del riego) se realiza de manera individual o combinando diferentes compuestos, con el fin de lograr efectos aditivos sobre las plantas. Aunque a veces las concentraciones aplicadas resultan poco favorables para la planta y los resultados son inesperados.

3. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La interfase constituida por las raíces de las plantas y el suelo adherido a las mismas se denomina rizósfera (Babalola, 2010). Ngoma y col. (2012) la definen como el volumen de suelo cercano a la raíz, donde se producen interacciones entre microorganismos y la planta para el aprovechamiento de diferentes nutrientes por ambos organismos (Jeffries y col., 2003). Los compuestos liberados por las raíces de las plantas como azúcares, aminoácidos, flavonoides, ácidos alifáticos, proteínas y ácidos grasos, crean un medioambiente único en la rizósfera (Badri y col., 2009), los cuales actúan como moléculas señal para atraer microorganismos específicos o son utilizados como fuentes de carbono para la nutrición

microbiana (Antoun y Prevost, 2006). Por su parte, en este microambiente, los microorganismos generan efectos benéficos o perjudiciales para las plantas

Las rizobacterias capaces de promover el crecimiento vegetal, fueron identificadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Kloepper y Schroth, 1978). Luego los microorganismos benéficos de vida libre fueron definidos por Bashan, (1998), como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas a través del biocontrol (PGPB). Cassán y col. (2009) sugirieron que las PGPB pueden ser clasificadas en tres grandes grupos, de acuerdo al tipo de efecto que ejercen sobre la planta: (a) promotoras del crecimiento vegetal; (b) biocontroladoras de patógenos y (c) reguladoras de la homeostasis en condiciones de estrés abiótico (PSHR). El primer grupo está representado por las bacterias que habitan el interior o exterior de la raíz y que estimulan significativamente el crecimiento de plantas por medio de mecanismos directos, tales como: fijación biológica del nitrógeno (James, 2000; Bloemberg y Lutengber, 2001), modificación de nutrientes en cuya composición estén presentes hierro o fósforo, quedando estos últimos disponibles para la planta, y la producción de compuestos reguladores del crecimiento, tales como auxinas (Ona y col., 2005), GAs (Cassán y col., 2003), poliaminas como la cadaverina (Cassán y col., 2005) y lipopéptidos (Shu Bin y col., 2012).

El segundo grupo incluye a las bacterias habitantes de la raíz que estimulan el crecimiento de plantas por medio de mecanismos indirectos, mediados por la capacidad del microorganismo para impedir el crecimiento de bacterias u hongos fitopatogénicos. Dentro de los mecanismos indirectos, se destacan la biosíntesis de compuestos antibióticos, de enzimas líticas (Pallavi y col., 2012), la síntesis de metabolitos antifúngicos (Dowling y O'Gara, 1994), la competencia nutricional y de nicho (Bashan y de Bashan; 2002 a y b), y la estimulación del sistema inmune de la planta o ISR (Pieterse y col., 2014).

El tercer grupo, incluye las bacterias habitantes de la raíz que estimulan o promueven el crecimiento de plantas en condiciones de estrés abiótico, tal como el estrés hídrico o salino. Dentro de los mecanismos que determinarían la pertenencia a este grupo, se destacan las bacterias que producen moléculas que regulan procesos fisiológicos relacionados con la tolerancia a estrés, tal como ABA (Cohen y col., 2008), AIA (Egamberdieva, 2009), poliaminas (Cassán y col., 2009) o bien por la regulación de la actividad enzimática, por ejemplo la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa (ACC deaminasa), descrita por Glick (2005) en diferentes géneros microbianos. La acción conjunta de estos mecanismos, ya sea ejercido por una misma bacteria o por un grupo de ellas, resulta en la

estimulación del crecimiento de la planta, a través de un incremento en la emergencia, vigor y peso. Así por ejemplo, frente a estrés por sequía los mecanismos bacterianos mencionados producen un mayor desarrollo del sistema radical (Fig. 9).

Los microorganismos beneficiosos establecen relaciones a largo plazo con sus plantas hospedadoras para cumplir con sus ciclos de vida (Zamioudis y col., 2012). Para desarrollarse dentro del huésped y alimentarse de las células vivas, necesitan lidiar con los mecanismos de defensa de la planta, y los efectores secretados por los microorganismos pueden facilitar este proceso, induciendo así, modificaciones físico-químicas, que luego resultaran por ejemplo en una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés (Yang y col., 2009).

Para favorecer el establecimiento de bacterias benéficas en los cultivos, una de las estrategias más utilizadas es la pre-selección de los microorganismos que se encuentran en la zona próxima a la raíz o dentro de los tejidos radicales. Estas cepas, denominadas “nativas”, aisladas de la rizósfera promueven mejor el crecimiento de las plantas en comparación con cepas aisladas de otras regiones, aun en condiciones de estrés (Mayak y col., 2004).

Existen diversas especies de bacterias promotoras del crecimiento vegetal pertenecientes a diferentes géneros entre los cuales se encuentran: *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* y otros (Weller y Thomashow, 1994; Glick, 1995; Probanza y col., 1996; Canbolat y col., 2006; Román y col., 2013; González Mansilla y col., 2017; Gaviria Giraldo y col., 2018).

En el laboratorio se caracterizaron e identificaron cepas bacterianas aisladas a partir de raíces de plantas de girasol cultivadas en irrigación y sequía; se obtuvieron 8 aislamientos con propiedades promotoras del crecimiento, los cuales fueron denominados SF (del inglés sunflower) y numeradas del 1 al 8. La caracterización genotípica mediante secuenciamiento del gen 16s ARNr arrojó 99,9% de homología con *Bacillus pumilus* para las cepas SF1, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7 y SF8, y 99,9% de homología con *Achromobacter xylooxidans* para la cepa SF2 (Forchetti y col., 2007).

Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* son bacterias Gram-positiva, formadoras de esporas, y con alta tolerancia a condiciones ambientales adversas (Fig. 10a). Debido a su capacidad de esporular, las cepas de *Bacillus* se adaptan fácilmente a formulaciones comerciales para aplicar a campo (Liu y Sinclair, 1993). *Bacillus* spp. promueve el crecimiento de las plantas a través del aporte de nutrientes tales como N, P, K y Fe (Biswas

y col., 2000). En medios de cultivo ricos como Luria Bertani (LB), las colonias son grandes, planas, con bordes irregulares de color blanquecino (Fig. 10b).

Las bacterias del género *Achromobacter* son bacilos Gram-negativo, aerobios, no fermentativos (Fig. 10c) (Forchetti y col., 2010). En medio de cultivo solido las colonias son pequeñas, de bordes regulares, cremosas y de color blanquecino (Fig. 10d). Este género fue citado por Koch y Oya (1974) como fijador de nitrógeno de vida libre y ha sido citado también por Jha y Kumar (2009) como bacterias endofíticas promotoras del crecimiento vegetal de trigo.

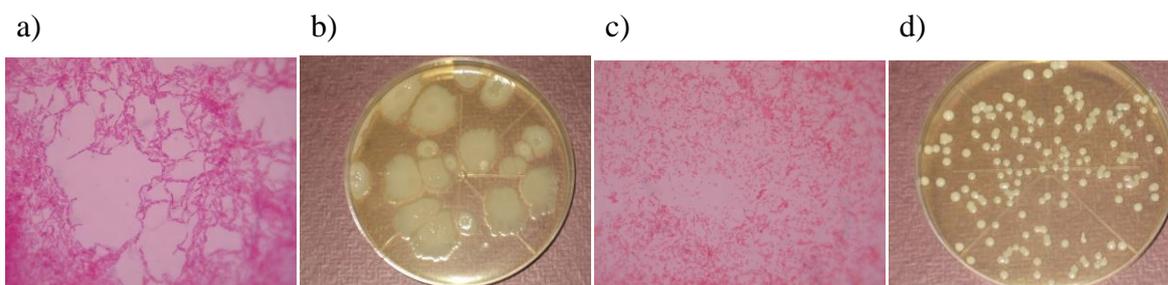


Fig. 10. Tinción de Gram y morfología de las colonias en medio LB, de *Bacillus pumilus* SF3 o SF4 a) y b) y de *Achromobacter xylosoxidans* SF2 c) y d).

Además, las cepas aisladas fueron evaluadas a través de pruebas bioquímicas y mostraron características promotoras del crecimiento vegetal (Tabla 1) (Forchetti y col., 2007).

Tabla 1. Características PGPR de las bacterias aisladas de girasol.

Cepa	Características PGPR						
	Gram	Cat.	Ox.	NfbN	Nfb	Fos. (mm)	Sid.
SF1	BG +	+	+	+	+	-	-
SF2	BG -	+	+	+	+	12	-
SF3	BG +	+	+	+	+	14	-
SF4	BG +	+	+	+	+	11	-
SF5	BG +	+	+	+	+	12	-
SF6	BG +	+	+	+	+	-	-
SF7	BG +	+	+	+	+	5	-
SF8	BG +	+	+	+	+	-	-

BG+: bacilos Gram +; BG-: bacilos Gram -; Cat: prueba de catalasa; Ox: prueba de oxidasa; NfbN: crecimiento en medio Nfb con Nitrógeno; Nfb: crecimiento en medio Nfb sin Nitrógeno; Fos: solubilización de fosfatos; Sid: producción de sideróforos (Forchetti y col., 2007).

También nuestro grupo de trabajo determinó que las cepas SF2, SF3, SF4 y SF5, inhibieron el crecimiento de hongos patógenos para girasol, *Verticillium orense* (Fig. 11a) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Fig. 11b) y *Alternaria* sp. (Fig. 11c). Esta capacidad biocontroladora mejoraría indirectamente el crecimiento de las plantas en condiciones ambientales normales y de estrés (Forchetti y col., 2010).



Fig. 11. Inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos de girasol *Verticillium orense* a), *Sclerotinia sclerotiorum* b) y *Alternaria* sp. c) por las cepas bacterianas nativas del cultivo (Forchetti y col., 2010).

Dado que las condiciones de estrés no sólo afectan el crecimiento de las plantas sino también el de bacterias asociadas a la misma, en nuestro laboratorio se realizaron experiencias a fin de determinar el comportamiento de los aislamientos frente a estrés hídrico severo. La cepa SF4 presentó mayor velocidad de crecimiento, demostrando una mejor adaptación a la sequía. Además, las cepas SF2, SF3 y SF4 presentaron actividad ACC-deaminasa (Forchetti y col., 2007), enzima que desamina el ACC, un precursor de la biosíntesis de etileno en plantas. De esta manera se reducen los niveles del mismo en el vegetal (Glick, 1995; Jacobson y col., 1994), principalmente en las raíces, lugar donde este se acumula en condiciones de estrés hídrico (Glick, 1995; Glick y col., 1998; 1999).

3.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal y hormonas

Los microorganismos del suelo están relacionados con el crecimiento de las plantas, la síntesis de fitohormonas y con la producción de enzimas que influyen en sus vías metabólicas (Glick y col., 1998). Uno de los principales mecanismos propuestos por Bashan y de-Bashan (2010), se relaciona con la habilidad de las bacterias para producir o metabolizar fitohormonas (Tien y col. 1979; Okon y Labandera Gonzales, 1994) que junto con otros mecanismos, actúan de manera aditiva sobre el efecto de promoción del crecimiento y de la IST.

Además los microorganismos beneficiosos evaden el sistema de defensa del huésped mediante varias estrategias, incluyendo la producción de exopolisacáridos, efectores, o fitohormonas (Zamioudis y Pieterse, 2012), logrando así que las plantas hospedantes activen su inmunidad de manera moderada, tolerando a los microorganismos promotores del crecimiento (Yang y col., 2009) pero dejándola en alerta para una invasión por otros microorganismos o agentes estresantes.

Varias especies de bacterias son capaces de producir hormonas en concentraciones suficientes para inducir cambios morfológicos y fisiológicos en los tejidos de las plantas jóvenes. Muchos autores han descrito la producción de hormonas por bacterias en condiciones normales, por ejemplo *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*, producen AIA (Boiero y col., 2007; Cassan y col., 2009), el cual influye en los procesos de elongación y división celular y en la diferenciación de los tejidos vegetales. El AIA producido por bacterias del suelo, puede incrementar significativamente la tasa de crecimiento de la raíz y desarrollo de brotes en las plántulas (Barbieri y Galli, 1993; Van Loon, 2007).

Gutiérrez-Mañero y col. (2001) trabajando con *Bacillus pumilus* y *B. licheniformis* y posteriormente Cassan y col. (2009) con cepas de *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*, reportaron la producción de GAs: GA₁, GA₃, GA₄ y GA₂₀. En este sentido se cree que las GAs producidas por hongos y bacterias influyen en el crecimiento y el desarrollo de sus plantas hospedadoras (Rademacher, 1994; Bottini y col., 2004).

Resultados previos del laboratorio demostraron que las concentraciones de JA, su precursor el OPDA y ABA en el medio de cultivo de las cepas nativas de girasol incrementaron cuando las cepas se sometieron a estrés (Forchetti y col., 2007). Asimismo, en nuestro laboratorio se comprobó que las cepas nativas analizadas tienen la capacidad de incrementar el crecimiento de plántulas de girasol, crecidas *in vitro* y sometidas a estrés hídrico (Forchetti y col., 2010). El JA, sus conjugados con aminoácidos, su éster metílico (JAME) y OPDA son importantes moléculas señales en la interacción de las plantas con agentes patógenos, ya sea en respuesta a heridas o lesiones mecánicas por herbívoros; como así también en respuesta a estrés osmótico (Kessler y Baldwin, 2002; Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2006).

Así, las bacterias benéficas nativas capaces de producir hormonas incorporadas a un cultivo de interés agronómico, mejoran el desarrollo de las plantas en condiciones de estrés ambiental y preservan o aumentan el rendimiento (Bensalim y col., 1998; Nowak y col.,

1999), incluso en condiciones de estrés severo causado por salinidad (Dimkpa y col., 2009) y sequía (Forchetti y col., 2010).

3.2. Bacterias como inoculantes

La preocupación por los efectos colaterales de los agroquímicos en el ambiente, ha motivado el interés por las poblaciones microbianas de la rizósfera y la forma en que estas pueden ser aplicadas (Barea y col., 2004), como una manera de generar una agricultura sustentable.

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

Por su parte, SENASA en el “Manual para el registro de fertilizantes, enmiendas, sustratos, acondicionadores, protectores y materias primas en la República Argentina”, define como fertilizante biológico, (definido por el Artículo 3° del Decreto 1.624/80), a aquel formulado que contiene un microorganismo, como principal componente, sobre un soporte.

La incorporación de más de una cepa bacteriana o co-inoculación se ha propuesto como una nueva herramienta tecnológica que busca combinar características intrínsecas de las bacterias, lo cual puede potenciar los mecanismos de promoción de crecimiento en las plantas (Bashan y Holguin, 1997a; b). El efecto sinérgico entre bacterias se debe al intercambio de nutrientes, remoción de algunos productos inhibidores ó estimulación de otros a través de mecanismos físicos ó bioquímicos, o bien por la suma de efectos benéficos (Bashan y Holguin, 1997b). Se sabe que diferentes especies de *Bacillus* y *Bradyrhizobium* actúan sinérgicamente con distintos géneros o especies bacterianas aumentando la fijación de nitrógeno, número y peso de nódulos en soja, como así también el peso de la raíz (Yuming y col., 2003).

Para garantizar la colonización de las raíces (Fig. 12), las bacterias utilizadas como inoculantes deben ser capaces de adaptarse y sobrevivir a las condiciones de crecimiento de

la planta, mostrando buena capacidad de competencia con los microorganismos nativos y alta tasa de crecimiento en respuesta a los exudados de semillas y raíces (Kloepper y col. 1986; 1988; Schrot y Hancock, 1982).

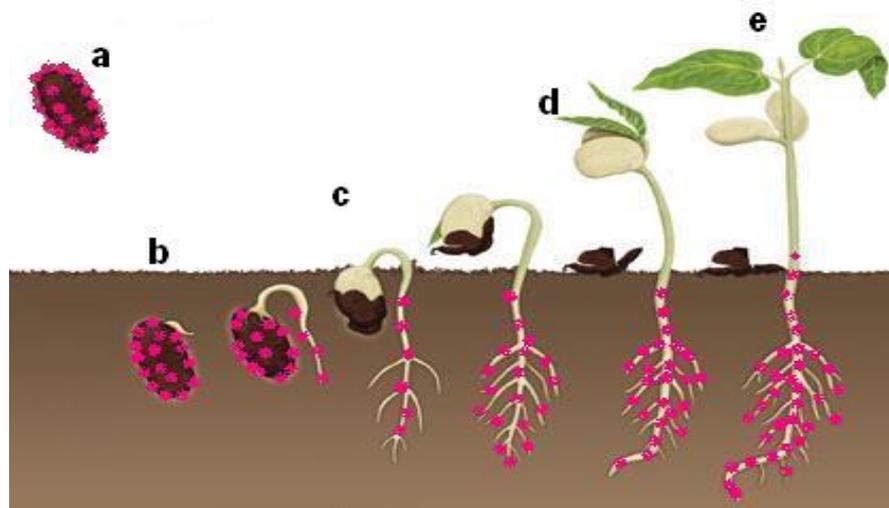


Fig. 12. Colonización de la semilla por bacterias aplicadas como inoculantes, semilla inoculada a); la bacteria debe ser capaz de adaptarse y multiplicarse en la rizósfera b); en respuesta a los exudados de la raíz, las bacterias se adhieren a la superficie radical c); colonización del sistema radical en desarrollo d); las bacterias pueden colonizar la región interna de la raíz e) (modificado de Kloepper y Beauchamp, 1992).

Debido al interés comercial del cultivo de girasol en Argentina y otros países, y a la necesidad de establecerlo en áreas desfavorables, se ha propuesto la inoculación y co-inoculación con cepas nativas como una nueva herramienta tecnológica. Por lo tanto, es también de nuestro interés estudiar las interacciones girasol-bacterias como así también su supervivencia en condiciones de estrés hídrico. Debido a las características de las bacterias nativas de girasol y a su capacidad para desarrollarse en medios de cultivo sintéticos, aún en condiciones de estrés, es que se podrían utilizar para inocular semillas, brindando beneficios a la planta durante todo su desarrollo

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La acción benéfica de las cepas de *Achromobacter xylosoxidans* (cepa SF2) y de *Bacillus pumilus* (cepas SF3 y SF4) aisladas de raíces de girasol, mejora el crecimiento de las plantas en condiciones normales y de estrés hídrico, como el rendimiento del cultivo de girasol a campo.

Objetivo general

Evaluar los efectos de la aplicación de las cepas *Achromobacter xylosoxidans* (SF2) y *Bacillus pumilus* (SF3 y SF4) sobre el crecimiento de la planta de girasol, en laboratorio y campo, y profundizar el conocimiento de las relaciones hormonales entre el cultivo vegetal y las cepas bacterianas, en condiciones normales y de estrés hídrico.

Objetivos específicos

I) Evaluar la viabilidad de los inóculos bacterianos SF2, SF3 y SF4, y co-inóculos SF2-SF3 y SF2-SF4 en función a la composición del medio de cultivo y el tiempo de almacenamiento.

II) Evaluar la producción de las hormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido abscísico (ABA), en cultivos de las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4.

III) Evaluar el efecto de la inoculación simple y co-inoculación de las cepas SF2, SF3 y SF4 sobre el crecimiento temprano de plántulas de girasol cultivadas *in vitro*, en sustrato sólido, y determinar la producción de hormonas en condiciones normales y de estrés hídrico.

IV) Evaluar el efecto de la inoculación simple de las cepas SF2, SF3 y SF4 sobre el crecimiento temprano de plántulas de girasol cultivadas *in vitro* en sustrato líquido, en condiciones normales y de estrés hídrico.

V) Evaluar el efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido giberélico A₃ (GA₃), ácido indol-3-acético (AIA) y ácido abscísico (ABA), y sus combinaciones, sobre el crecimiento temprano de plántulas de girasol crecidas *in vitro*, en sustrato sólido e inoculadas con cepas de SF2, SF3 y SF4.

VI) Evaluar el efecto de la inoculación simple de las cepas bacterianas individuales SF2, SF3 y SF4, sobre el rendimiento de las plantas de girasol en condiciones de campo.

Materiales y métodos

1. Especie vegetal y cepas bacterianas

Especie vegetal: germoplasma comercial de *Helianthus annuus* L. (girasol) Paraiso 24.

Cepas bacterianas: *Achromobacter xylosoxidans* (SF2) y *Bacillus pumilus* (SF3 y SF4) (Forchetti y col., 2007).

2. Viabilidad de las cepas bacterianas individuales

Cincuenta ml de los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Glucosa-Levadura (GY) y Ommafuvbe modificado (OM) (Ver anexo), se inocularon con 1 ml de cultivo puro (10^8 ufc.ml⁻¹) de las cepas bacterianas por separado y, se almacenaron en envases de vidrio a 27 °C. El recuento de unidades formadoras de colonias se realizó en agar LB a los 30, 90, 180 y 365 días. Se efectuaron cuatro repeticiones y los recuentos se realizaron por duplicado.

Los tratamientos fueron:

LB: medio LB sin inocular.

GY: medio GY sin inocular.

OM: medio OM sin inocular.

LB-SF2: cepa SF2 en medio LB.

LB-SF3: cepa SF3 en medio LB.

LB-SF4: cepa SF4 en medio LB.

GY-SF2: cepa SF2 en medio GY.

GY-SF3: cepa SF3 en medio GY.

GY-SF4: cepa SF4 en medio GY.

OM-SF2: cepa SF2 en medio OM.

OM-SF3: cepa SF3 en medio OM.

OM-SF4: cepa SF4 en medio OM.

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico Infostat a través de un ANOVA de una vía, LSD de Fisher con $p < 0,05$.

3. Viabilidad de las cepas bacterianas en co-inóculos

Cincuenta ml de medio de cultivo LB se co-inocularon con 0,5 ml de cultivo puro (1×10^8 ufc.ml⁻¹) de las cepas bacterianas y, se almacenaron en envases de vidrio a 27 °C. El recuento de unidades formadoras de colonias se realizó en agar LB a las 48 h y a los 30, 90, 180 días. Se efectuaron tres repeticiones y los recuentos se realizaron por duplicados.

Los tratamientos fueron:

LB: medio LB sin inocular.

LB-SF2-SF3: cepas SF2 y SF3 en medio LB.

LB-SF2-SF4: cepas SF2 y SF4 en medio LB.

Debido a que fundamentalmente se trataba de dilucidar la viabilidad de las cepas de diferentes generos en convivenciales, es que no se evaluó el co-inoculo SF3-SF4.

Los resultados obtenidos se analizaron cuantitativamente mediante la observación de la capacidad de crecimiento de las cepas.

4. Producción de hormonas por las cepas bacterianas

Cincuenta ml de los medios de cultivo LB, GY y OM se inocularon con 1 ml de las cepas bacterianas por separado. Los cultivos se llevaron a estufa con agitación a 27 °C durante 96 h. Finalizado el período de crecimiento, 10 ml de cada cultivo se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min a 4 °C y se procedió según protocolo Durgbanshi y col. (2005), para la determinación de la producción de SA, JA, ABA, AIA.

El volumen restante de los cultivos se almacenó durante 6 meses a 28 °C y, cumplido el período, se realizaron nuevamente las determinaciones hormonales. Se efectuaron cinco ensayos. El período de almacenamiento aplicado fue determinado de acuerdo a la normativa que rige para los productos inoculantes del mercado actual.

Los tratamientos fueron:

LB: medio LB sin inocular.

GY: medio GY sin inocular.

OM: medio OM sin inocular.

LB-SF2: cepa SF2 en medio LB.

LB-SF3: cepa SF3 en medio LB.

LB-SF4: cepa SF4 en medio LB.

GY-SF2: cepa SF2 en medio GY.

GY-SF3: cepa SF3 en medio GY.

GY-SF4: cepa SF4 en medio GY.

OM-SF2: cepa SF2 en medio OM.

OM-SF3: cepa SF3 en medio OM.

OM-SF4: cepa SF4 en medio OM.

A partir del ensayo se determinó la capacidad de las bacterias de producir hormonas vegetales. Los datos obtenidos no fueron sometidos a análisis estadístico debido a que solo

se pretendía determinar si las cepas bacterianas producían o no hormonas en los diferentes medios de cultivo.

5. Ensayos de inoculación bacteriana en plantas de girasol

5.1. Inoculación de semillas

La inoculación de semillas se efectuó mediante el agregado de 1 ml de medio LB conteniendo la/s cepa/s y cultivado a 28 °C/100 rpm (hasta alcanzar una densidad óptica de 0,75-1 y 10^8 ufc.ml⁻¹), disuelto en 0,16 ml de adherente protector concentrado soluble (derivado celulósico) cada 100 g de semillas de girasol.

5.2. Inoculación simple y co-inoculación de plántulas de girasol cultivadas en condición control y de estrés hídrico, en sustrato sólido

Cinco semillas de girasol se colocaron en macetas conteniendo arena estéril al 60 % de capacidad de campo, y se llevaron a cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (28 °C) / 8 h oscuridad (20 °C). Las macetas se cubrieron con bolsas transparentes. Al 4to día se retiraron las bolsas y se comenzó el tratamiento de riego con solución Hoagland (HOA) ½ fuerza iónica o con Polietilenglicol (PEG) 14,7% p/v (-2,03 MPa). Además, las plántulas se inocularon y co-inocularon con las cepas bacterianas a razón de 1 ml de inóculo por semilla sembrada, con una cantidad de 10^8 ufc.ml⁻¹ por cepa bacteriana. A las plántulas co-inoculadas se les agregó 0,5 ml de cada inóculo y a las plántulas control 1 ml de medio LB estéril. Se realizaron cinco ensayos, con tres repeticiones de los tratamientos, descartando al azar dos plántulas por maceta.

Los tratamientos fueron:

N: plántulas sin inocular, regadas con HOA.

PEG: plántulas sin inocular, regadas con PEG.

SF2: plántulas inoculadas con SF2, regadas con HOA.

SF3: plántulas inoculadas con SF3, regadas con HOA.

SF4: plántulas inoculadas con SF4, regadas con HOA.

SF2-PEG: plántulas inoculadas con SF2, regadas con PEG.

SF3-PEG: plántulas inoculadas con SF3, regadas con PEG.

SF4-PEG: plántulas inoculadas con SF4, regadas con PEG.

SF2-SF3: plántulas inoculadas con SF2, SF3, regadas con HOA.

SF2-SF4: plántulas inoculadas con SF2, SF4, regadas con HOA.

SF3-SF4: plántulas inoculadas con SF3, SF4, regadas con HOA.

SF2-SF3-PEG: plántulas inoculadas con SF2 y SF3, regadas con PEG.

SF2-SF4-PEG: plántulas inoculadas con SF2 y SF4, regadas con PEG.

SF3-SF4-PEG: plántulas inoculadas con SF3 y SF4, regadas con PEG.

Para generar estrés hídrico se utilizó PEG debido a que es un polímero no iónico y que, por su alto peso molecular, no penetra fácilmente los tejidos vegetales (Türkan y col., 2005; Landjeva y col., 2008). El porcentaje aplicado proviene de trabajos previos realizados en el laboratorio (Forchetti y col., 2007).

A los 15 días de cultivo, las plántulas se cosecharon y se midió el contenido relativo de agua (CRA), longitud y peso fresco y seco de parte aérea y radical. A partir del material vegetal liofilizado, se cuantificaron SA, JA, ABA y AIA mediante el protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005).

5.3. Contenido relativo de agua (CRA) en plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, cultivadas en condiciones control y de estrés hídrico, en sustrato sólido

El análisis se llevó a cabo con nueve plantas por tratamiento. Se cortaron discos de las hojas superiores de plantas de 18 días de crecimiento y se determinó el peso fresco (PF), peso turgente (PT) y peso seco (PS) de los diferentes pool de hojas correspondientes a los diferentes tratamientos. El CRA se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{CRA (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

Los resultados se analizaron con el programa estadístico Infostat a través de un ANOVA de dos vías, LSD de Fisher con $p < 0,05$

5.4. Inoculación de plántulas de girasol cultivadas en condición control y de estrés hídrico, en sustrato líquido

Veinticinco semillas de girasol inoculadas, se colocaron en bandeja entre papel humedecido con agua destilada y se llevaron a cámara de crecimiento durante 72 h con un fotoperiodo de 16 h de luz (28 °C) / 8 h oscuridad (20 °C). Cinco plántulas de cada tratamiento se trasplantaron a tubos Falcon conteniendo HOA o PEG y se cubrieron, durante cuatro días, con bolsas transparentes. Se realizaron cinco ensayos con cinco repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos fueron:

N: plántulas sin inocular, con HOA.

PEG: plántulas sin inocular, con PEG.

SF2: plántulas inoculadas con SF2, con HOA.

SF3: plántulas inoculadas con SF3, con HOA.

SF4: plántulas inoculadas con SF4, con HOA.

SF2-PEG: plántulas inoculadas con SF2, con PEG.

SF3-PEG: plántulas inoculadas con SF3, con PEG.

SF4-PEG: plántulas inoculadas con SF4, con PEG.

A los 15 días de cultivo, las plántulas se cosecharon y se midió longitud y peso fresco y seco de parte aérea y radical. Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA de dos vías con el programa estadístico Infostat, con test a posteriori LSD de Fisher con $p < 0,05$.

5.5. Ensayos de inoculación a campo

Los ensayos se realizaron durante 3 ciclos agrícolas, en campos situados en las localidades de Bulnes, Vicuña Mackenna y Manfredi. El diseño experimental correspondió a Alpha Lattice con 4 repeticiones al azar, colocadas en 2 hileras de 5,10 metros.

Los tratamientos realizados fueron:

N: plantas sin inocular.

Nit: plantas sin inocular y fertilización química.

AZO: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.

SF2: plantas inoculadas con cepa SF2.

SF3: plantas inoculadas con cepa SF3.

SF4: plantas inoculadas con cepa SF4.

AZO-Nit: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química.

SF2-Nit: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química*.

SF3-Nit: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química*.

SF4-Nit: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química*.

*La fertilización química se realizó con 135 kg de urea ha^{-1} adicionada al momento de la siembra.

La evaluación del efecto de los diferentes tratamientos se llevó a cabo midiendo las variables detalladas en la Tabla 2, las cuales fueron determinadas en los estadios fenológicos citados, según clasificación de Schneiter y Miller (1981).

Tabla 2. Variables medidas en los cultivos de girasol de los ensayos realizados a campo.

Variables	Abreviatura	Estadío fenológico
Capítulos cosechados / parcela (n°)	CAP	R9
Rendimiento grano / ha (kg ha ⁻¹)	RENSH	R9
Contenido de aceite (%)	MG	R9
Peso de 1000 semillas (g)	PS	R9
Rendimiento materia grasa / ha (kg ha ⁻¹)*	RENMGH	R9
Rendimiento grano / ha (kg ha ⁻¹)	RENSA	R9
Plantas / ha (n°)	PLH	R7
Humedad (%)	HUM	R9
Número de semillas / capítulo (n°)	NSC	R9

*Determinado con un equipo de resonancia magnética nuclear, disponible en el INTA EEA Manfredi.

Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA utilizando para ello el programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software) versión 8.

6. Ensayos de aplicación exógena de hormonas

6.1. Aplicación exógena de hormonas en plántulas de girasol

Cinco semillas de girasol se colocaron en macetas conteniendo arena estéril al 60 % de la capacidad de campo, y se llevaron a cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (28 °C) / 8 h oscuridad (20 °C). Las macetas se cubrieron con bolsas transparentes durante cuatro días. Luego se quitaron las bolsas y comenzó el riego con las soluciones de las hormonas: SA, JA, GA₃, AIA y ABA. Se realizaron cinco ensayos con cinco repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos fueron:

C: control, plántulas sin inocular, regadas con HOA

SA (-7M): plántulas regadas con 1 ppm de SA

SA (-8M): plántulas regadas con 0,1 ppm de SA

JA (-8M): plántulas regadas con 0,1 ppm de JA

JA (-10M): plántulas regadas con 0,001ppm de JA

GA₃ (-4M): plántulas regadas con 300 ppm de GA₃

GA₃ (-5M): plántulas regadas con 30 ppm de GA₃

AIA (-5M): plántulas regadas con 17 ppm de AIA

AIA (-6M): plántulas regadas con 1,7 ppm de AIA

ABA (-7M): plántulas regadas con 0,026 ppm de ABA

ABA (-8M): plántulas regadas con 0,0026 ppm de ABA

A los 15 días de cultivo las plántulas se cosecharon y se midió longitud, peso fresco y seco de parte aérea y radical. Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA de una vía con el programa estadístico Infostat con test a posteriori LSD de Fisher con $p < 0,05$.

6.2. Aplicación exógena de mezclas de hormonas en plántulas de girasol inoculadas

Del ensayo anterior se seleccionaron las concentraciones de las hormonas a la cual las plántulas mostraron, al momento de la cosecha, mayor crecimiento (longitud y peso), y con ellas se elaboraron dos mezclas hormonales: M1 se preparó con AIA (-6M), ABA (-8M) y JA (-10M), y M2 con AIA (-6M), ABA (-8M), JA (-10M), SA (-8M) y GA3 (-4M).

Los tratamientos fueron:

N: plántulas sin inocular, regadas con HOA.

SF2: plántulas inoculadas con SF2, regadas con HOA.

SF3: plántulas inoculadas con SF3, regadas con HOA.

SF4: plántulas inoculadas con SF4, regadas con HOA.

M1-N: plántulas sin inocular, regadas con M1.

M1-SF2: plántulas inoculadas con SF2, regadas con M1.

M1-SF3: plántulas inoculadas con SF3, regadas con M1.

M1-SF4: plántulas inoculadas con SF4, regadas con M1.

M2-N: plántulas sin inocular, regadas con M2.

M2-SF2: plántulas inoculadas con SF2, regadas con M2.

M2-SF3: plántulas inoculadas con SF3, regadas con M2.

M2-SF4: plántulas inoculadas con SF4, regadas con M2.

A los 15 días las plántulas se cosecharon y se midió longitud y peso fresco y seco de parte aérea y radical. Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA de dos vías con el programa estadístico Infostat.

Resultados

1. Viabilidad de las cepas bacterianas individuales

El análisis de la viabilidad de las bacterias demostró que, en general, los cultivos alcanzan recuentos de 10^6 ufc.ml⁻¹ al final del periodo de almacenamiento.

La cepa SF2 mostró mayor viabilidad en el medio LB, luego de los 30 días de almacenamiento, aunque sin diferencias significativas respecto de los demás medios hasta el final del ensayo, donde se observaron diferencias significativas entre los medios LB (8×10^6 ufc.ml⁻¹) y OM ($5,6 \times 10^6$ ufc.ml⁻¹) respecto al medio GY ($2,8 \times 10^6$ ufc.ml⁻¹) (Fig. 13a). La cepa SF3 mostró mayor viabilidad y estabilidad celular en el medio LB, que en los medios OM y GY, a lo largo de todo el periodo de almacenamiento, siendo el recuento al final del ensayo de $1,6 \times 10^7$ ufc.ml⁻¹ (Fig. 13b).

La cepa SF4, mostró mayor número de células viables a los 30 días de almacenamiento en el medio LB, aunque se observaron fluctuaciones. En los medios OM y GY, su comportamiento fue estable, alcanzando al finalizar el periodo de almacenamiento recuentos de $1,9 \times 10^7$ y $1,5 \times 10^7$ ufc.ml⁻¹, respectivamente (Fig. 13c).

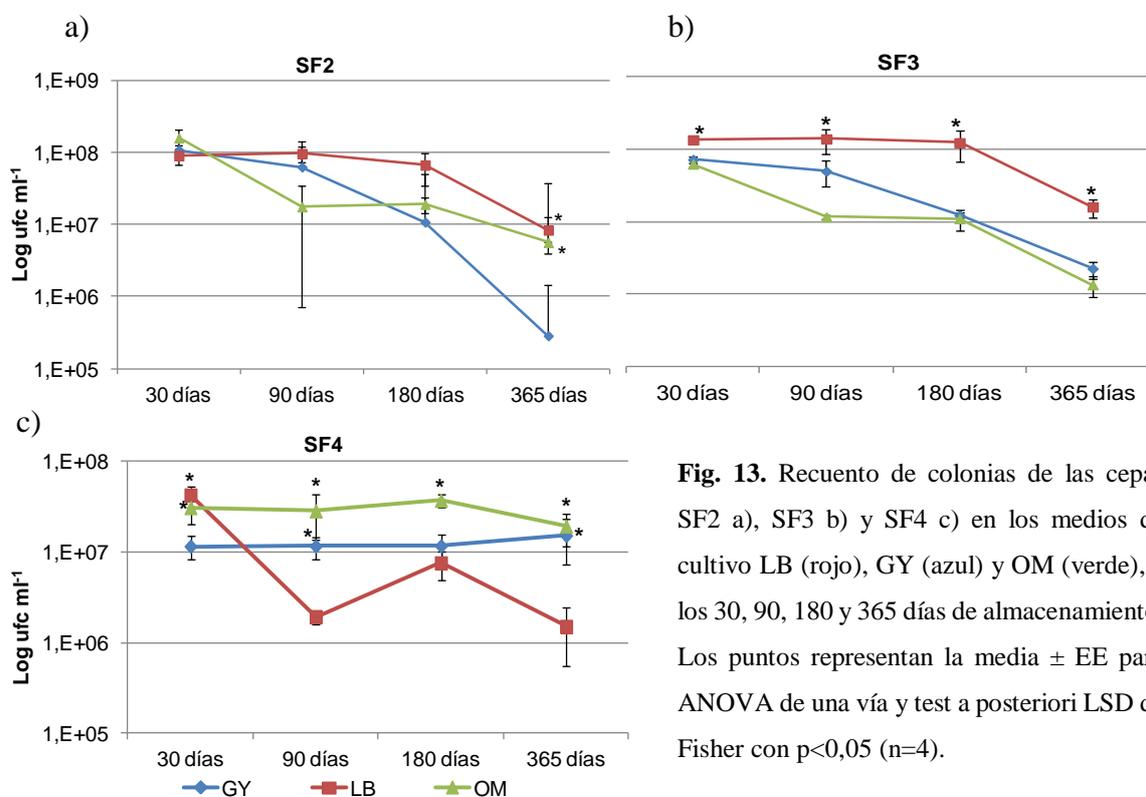


Fig. 13. Recuento de colonias de las cepas SF2 a), SF3 b) y SF4 c) en los medios de cultivo LB (rojo), GY (azul) y OM (verde), a los 30, 90, 180 y 365 días de almacenamiento. Los puntos representan la media \pm EE para ANOVA de una vía y test a posteriori LSD de Fisher con $p < 0,05$ ($n=4$).

Debido a que el medio LB fue el que propició de manera adecuada el rendimiento y mantención de la biomasa de las cepas bacterianas, y además es económico y sencillo de preparar, es que los ensayos de viabilidad de los co-inóculos se realizaron solo en dicho medio.

2. Viabilidad de las cepas bacterianas en co-inóculos

La viabilidad se evaluó en los co-inóculos SF2-SF3 y SF2-SF4, para tratar de dilucidar la convivencia entre cepas de diferentes generos.

Las bacterias cultivadas de manera combinada, mostraron a lo largo de todo el ensayo, concentraciones entre 1×10^7 y 1×10^8 ufc.ml⁻¹ (Figs. 14a y b).

La cepa SF2 se mantuvo en valores de alrededor de 1×10^7 ufc.ml⁻¹ durante los primeros tres meses de almacenamiento, incrementando el número de células (1×10^8 ufc.ml⁻¹) al final de los ensayos (Figs. 14a y b).

Las cepas SF3 y SF4 se comportaron de manera similar, combinadas con la cepa SF2. La cepa SF3 se mantuvo en aproximadamente 1×10^8 ufc.ml⁻¹ aunque disminuyó durante el último periodo de almacenamiento, alcanzando un nivel celular de 2×10^7 ufc.ml⁻¹ (Fig. 14a). Mientras que para la cepa SF4 los recuentos fueron superiores a 1×10^8 ufc.ml⁻¹ durante todo el ensayo (Fig. 14b).

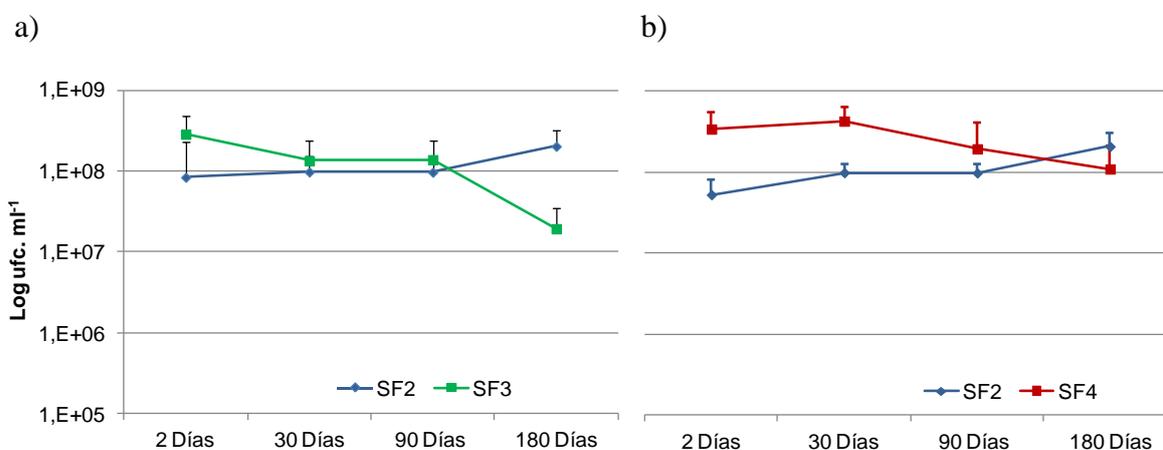


Fig. 14. Recuento de colonias de las cepas SF2 (azul), SF3 (verde) y SF4 (rojo), cultivadas en medio LB de manera combinada, SF2-SF3 a) y SF2-SF4 b), a los 2, 30, 90 y 180 días de almacenamiento. Los puntos representan la media \pm EE (n=3).

3. Capacidad de producción de hormonas por las bacterias SF2, SF3 y SF4

En los tres medios de cultivo ensayados se identificó la presencia de las hormonas SA, AIA, JA y ABA, producidas por las 3 cepas analizadas, siendo los medios GY y OM los que mayor proporción de JA y SA mostraron, y el medio LB el que mayor concentración de AIA y ABA exhibió (Fig. 15).

En particular, a los 4 días de cultivo la cepa SF2 mostró mayor producción de SA cuando creció en el medio GY (Fig. 15a), mientras que en LB produjo principalmente ABA, JA y AIA (Figs. 15b, c y d); alcanzando esta última una concentración similar en el medio OM (Fig. 15b). Al mismo tiempo de incubación, la cepa SF3 mostró mayor producción de las cuatro hormonas en medio LB respecto de los otros medios analizados. La cepa SF4 produjo mayor concentración de SA en el medio de crecimiento GY (Fig. 15a). Asimismo, una mayor producción de SA se observó en GY, en relación con el resto de las hormonas determinadas en LB (Figs. 15b, c y d).

Al final del periodo de almacenamiento (180 días), la cepa SF2 mostró mayor producción de SA en el medio OM (Fig. 15a), y del resto de las hormonas en LB (Figs. 15b, c y d). La cepa SF3 produjo SA en concentraciones similares en los tres medios ensayados (Fig. 15a), mientras que produjo mayor concentración de ABA y AIA en LB (Figs. 15b y d). JA fue producido en concentraciones similares en los tres medios (Fig. 15c). La cepa SF4 produjo SA, AIA y JA en concentraciones similares, en los tres medios de cultivo (Figs. 15a, b y c), mientras que la concentración de ABA fue superior en el medio LB (Fig. 15d).

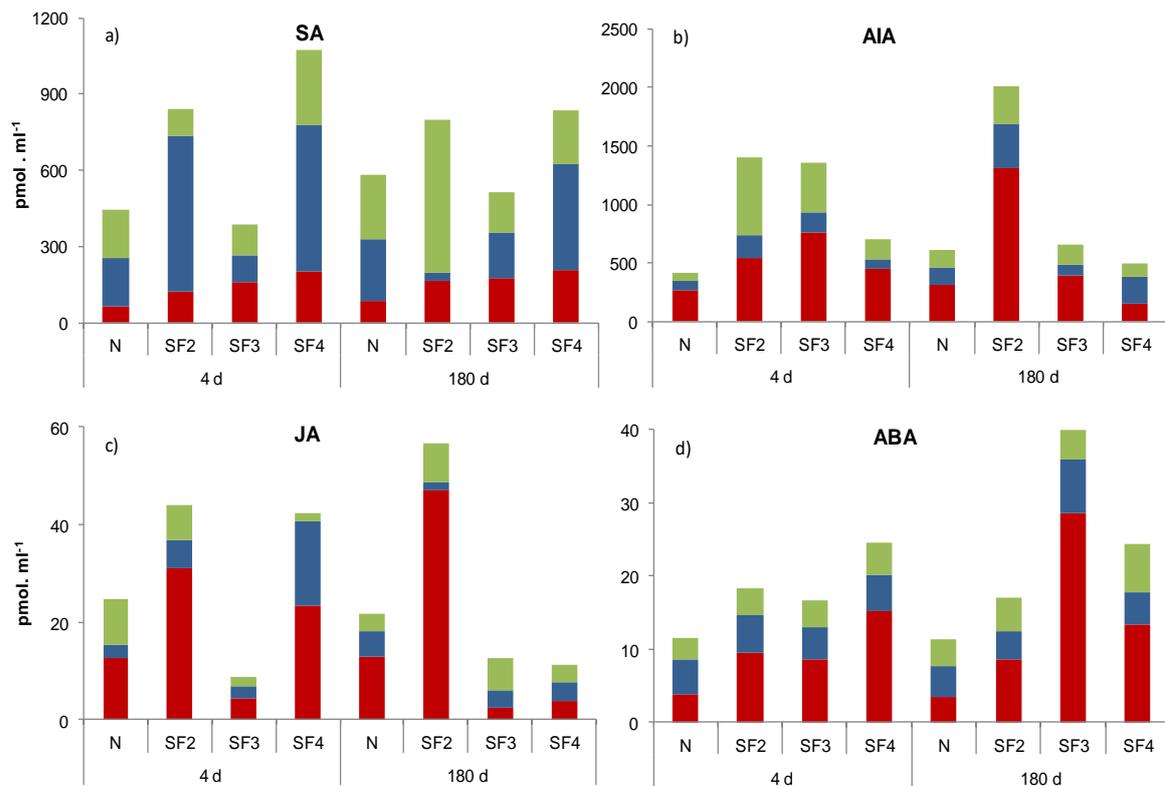


Fig. 15. Producción de SA a), AIA b), JA c) y ABA d) por las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4, en los medios de cultivo LB (rojo), GY (azul) y OM (verde), a los 4 y a los 180 días de almacenamiento. N: medio sin inóculo. La barras representa la media, n=2.

4. Efecto de la inoculación simple y co-inoculación en plántulas de girasol cultivadas en condición control y de estrés hídrico, en sustrato sólido

El efecto de la inoculación de las bacterias en inoculos simples y mixtos, en condiciones normales y de estrés hídrico se determinó mediante el análisis de parámetros de crecimiento de las plántulas a los 18 días de crecimiento.

4.1 Diámetro del tallo

Las plántulas crecidas en estrés hídrico mostraron reducción significativa del diámetro del tallo respecto a las plántulas control (Fig. 16).

En condiciones control todos los tratamientos bacterianos incrementaron el diámetro del tallo respecto a las plántulas sin inocular, aunque solo se observaron diferencias significativas en las plántulas inoculadas con SF2 y co-inoculadas con SF2/SF3 (Fig. 16).

En condiciones de estrés todos los tratamientos de inoculación y co-inoculación incrementaron levemente el diámetro del tallo, aunque no se observaron diferencias significativas respecto a las plántulas control sin inocular (Fig. 16).

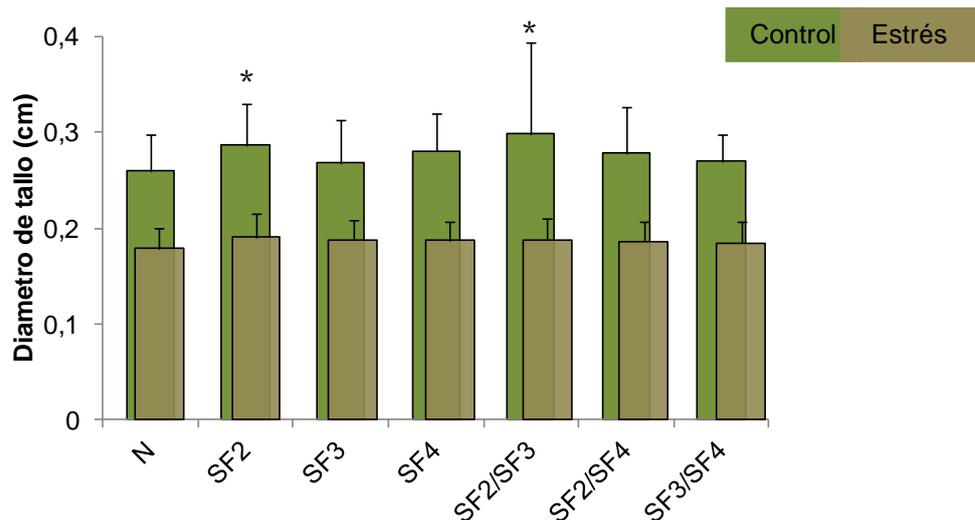


Fig. 16. Diámetro del tallo de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control y de estrés hídrico. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.2. Longitud de parte aérea y radical

Las plántulas en estrés hídrico disminuyeron la longitud de parte aérea y radical respecto a las plántulas en condiciones control (Figs. 17a y b).

Las inoculaciones con las cepas SF2, SF3 y SF4 y las co-inoculaciones no mostraron diferencias en la longitud de la parte aérea de las plántulas respecto a las plántulas no inoculadas (Figs. 17a y 18a y b). Por su parte, en condiciones de estrés, las plántulas inoculadas y co-inoculadas incrementaron levemente la longitud de parte aérea (Figs. 17b y 18c y d).

Las inoculaciones y co-inoculaciones no produjeron diferencias en la longitud radical de las plantas respecto a las crecidas en condiciones control (Fig. 17a). Por el contrario, las plántulas crecidas en condiciones de estrés incrementaron levemente este parámetro con todos los tratamientos bacterianos (Fig. 17b).

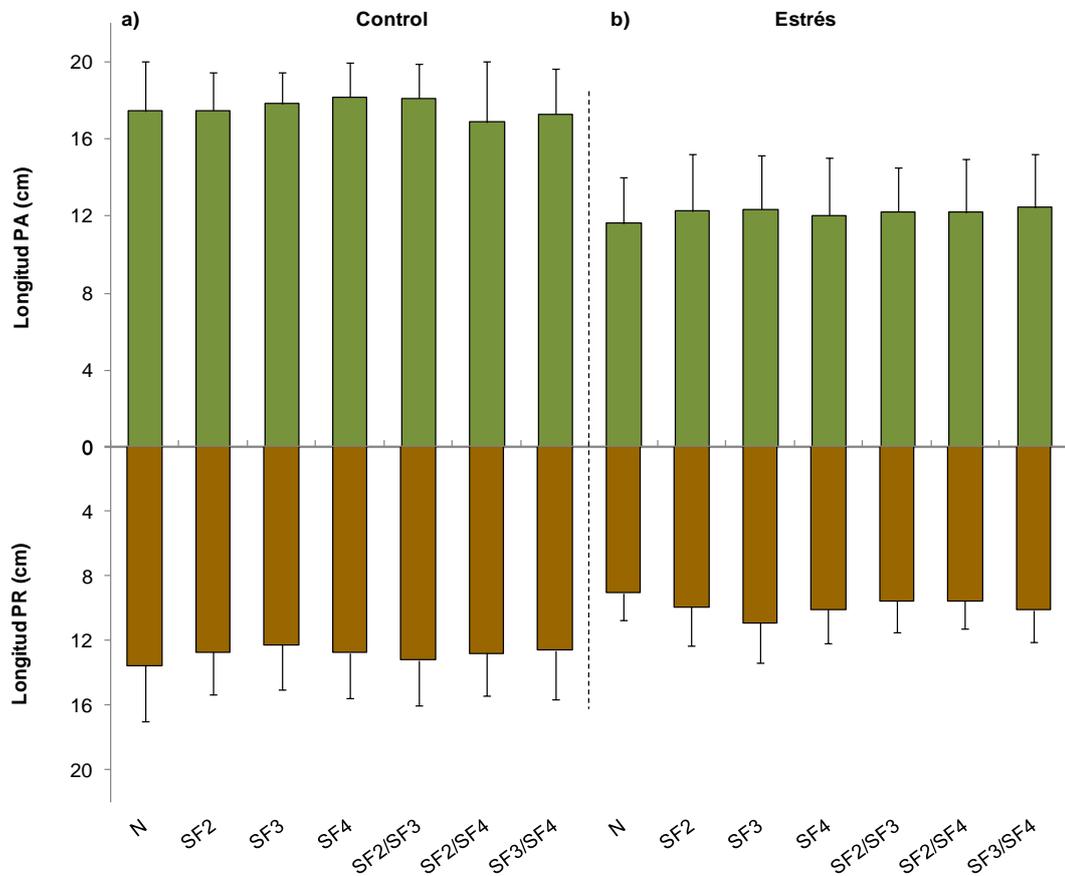


Fig. 17. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

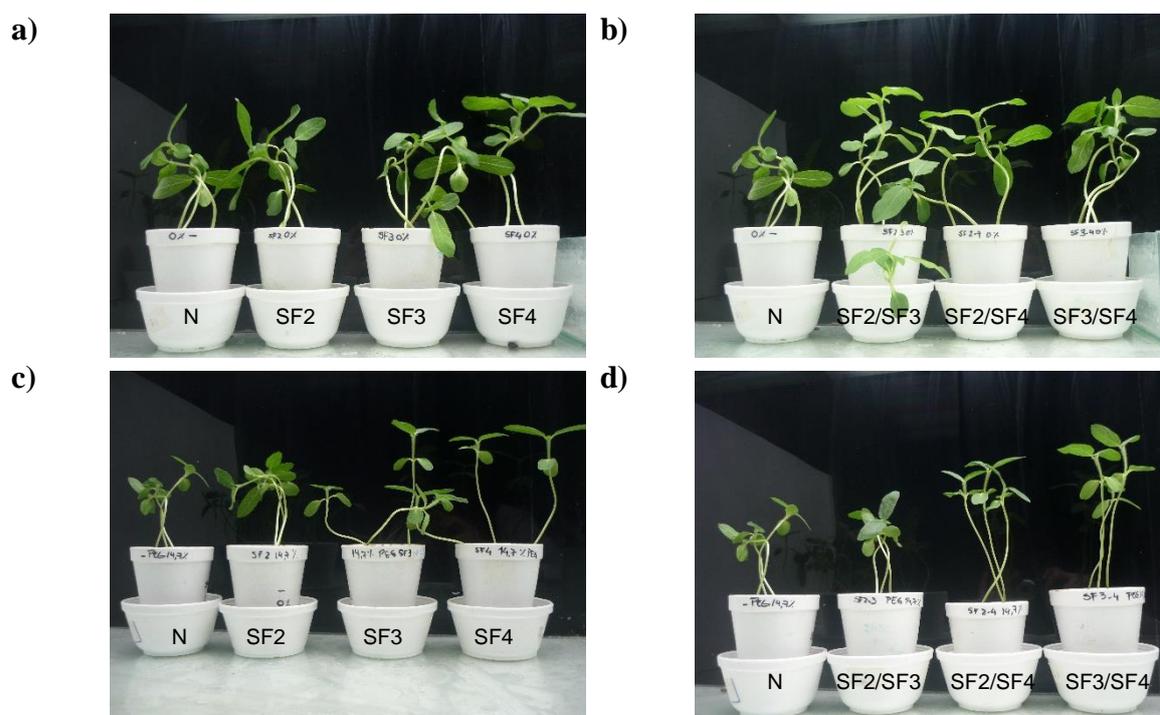


Fig. 18. Plántulas de girasol de 18 días crecidas en condiciones control a) y b) y de estrés hídrico c) y d), inoculadas a) y c) y co-inoculadas b) y d). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4.

4.3. Peso fresco de parte aérea y radical

En condiciones control, las plántulas presentaron mayor peso fresco de parte aérea que aquellas sometidas a condiciones de estrés, mientras que el peso fresco de la raíz de las plántulas fue similar en la condición de estrés, respecto a la control (Figs. 19a y b).

Las inoculaciones simples no modificaron el peso fresco de la parte aérea, mientras que los tres tratamientos de co-inoculación produjeron un incremento de dicho parámetro respecto a las plántulas sin inocular (Fig.19a). Por otro lado, en estrés, los tratamientos

bacterianos, individuales o combinados, causaron un leve incremento del peso fresco aéreo, aunque sin diferencias significativas respecto a las plántulas sin inocular (Fig.19b).

Los tratamientos de inoculación y co-inoculación no modificaron el peso fresco radical en ninguna de las condiciones analizadas (Figs. 19a y b).

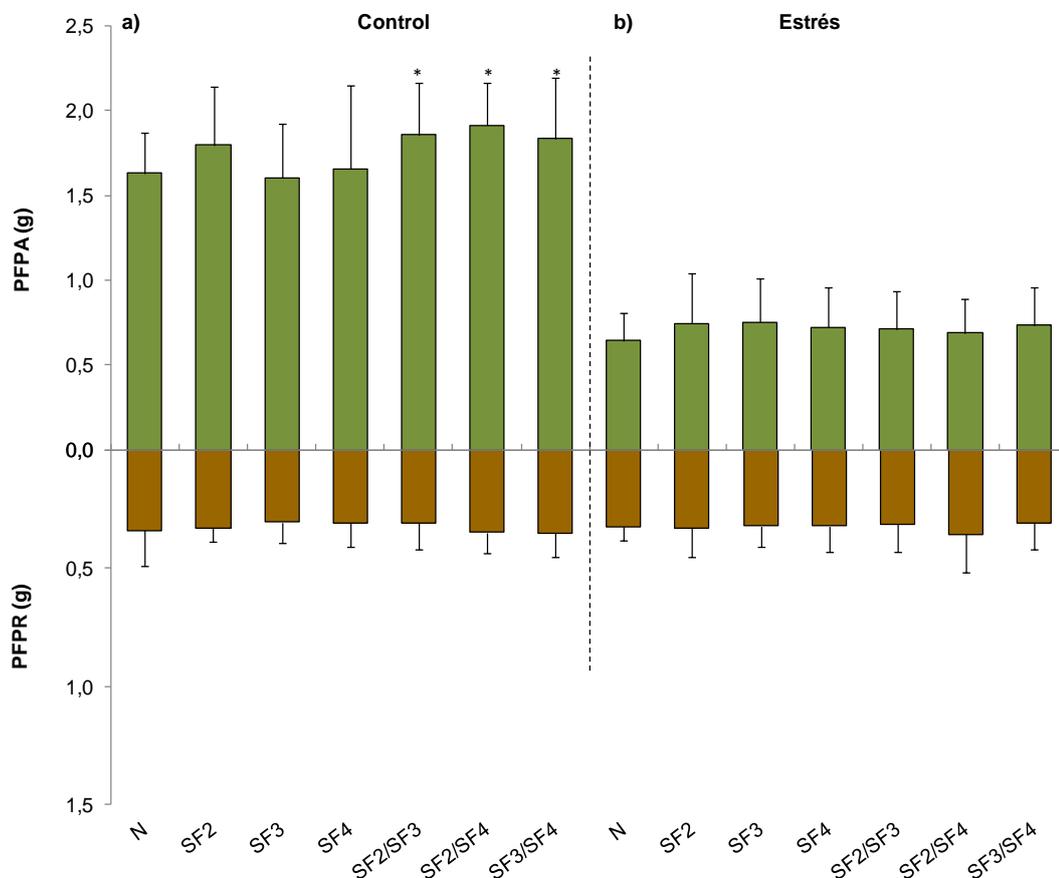


Fig. 19. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.4 Peso seco de parte aérea y radical

Las plántulas sin inocular crecidas en estrés (Fig. 20b) redujeron 1,5 veces el peso seco del tallo comparado con las plántulas control (Fig. 20a).

En condiciones control, la inoculación con SF2 y las tres co-inoculaciones incrementaron el peso seco del tallo comparado con las plántulas sin inocular (Fig. 20a). Bajo estrés, los tratamientos de inoculación con las cepas SF2 y SF3, también produjeron aumento del peso seco, aunque en menor grado (Fig. 20b).

En contraste a los resultados obtenidos en tallo, el peso seco radical de las plántulas estresadas y no inoculadas (Fig. 20b) incrementó un 7% respecto a las plántulas sin inocular crecidas en condiciones control (Fig. 20a).

El peso seco radical de las plántulas inoculadas en condiciones control (Fig. 20a) y en estrés (Fig. 20b) no mostró diferencias significativas respecto a aquellas sin inocular.

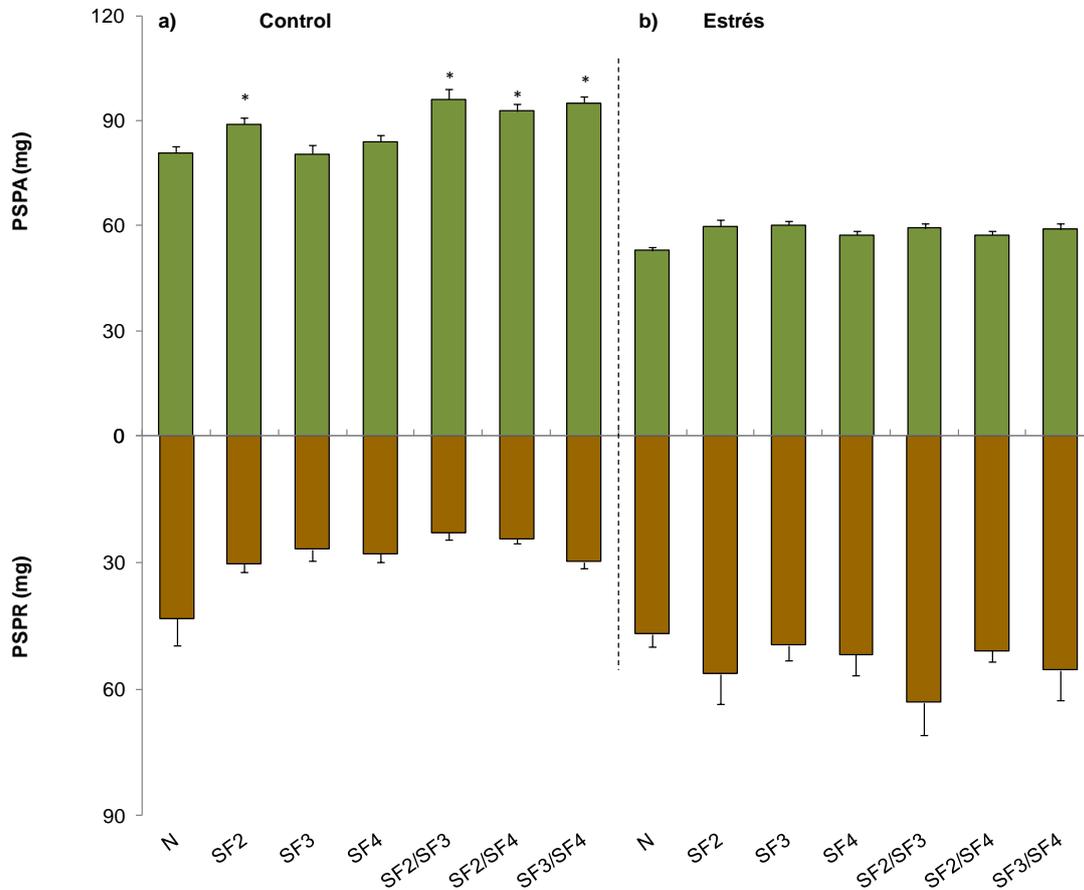


Fig. 20. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.5. Contenido de SA

En condiciones de crecimiento control, el contenido de SA en la parte aérea fue similar en todas las plántulas, independientemente del tratamiento de inoculación. En las mismas condiciones de crecimiento, las raíces de las plántulas inoculadas con SF3 y co-

inoculadas con SF2/SF3 y SF3/SF4, presentaron mayor contenido de SA que las plántulas sin inocular, siendo el incremento de aproximadamente 10000, 17000 y 12000 pmol.g⁻¹, respectivamente (Fig. 21a).

Las plántulas crecidas en condición de estrés mostraron un incremento de aproximadamente 6 veces de SA en parte aérea, respecto las plántulas en condición control. Los tratamientos de inoculación no tuvieron efecto significativo sobre el contenido de la hormona en parte aérea, respecto a las plántulas sin inocular. Por su parte la co-inoculación con SF3/SF4 produjo una reducción de ~19300 pmol.g⁻¹ de la hormona, y la co-inoculación con SF2/SF3 aumentó levemente el contenido de la hormona en raíz, respecto al de las plantas sin inocular (Fig. 21b).

En resumen, el contenido de SA en raíz fue mayor que en tallo en las plántulas control (Fig. 21a), por el contrario, en condiciones de estrés el contenido de SA en raíz fue menor que en tallo (Fig. 21b).

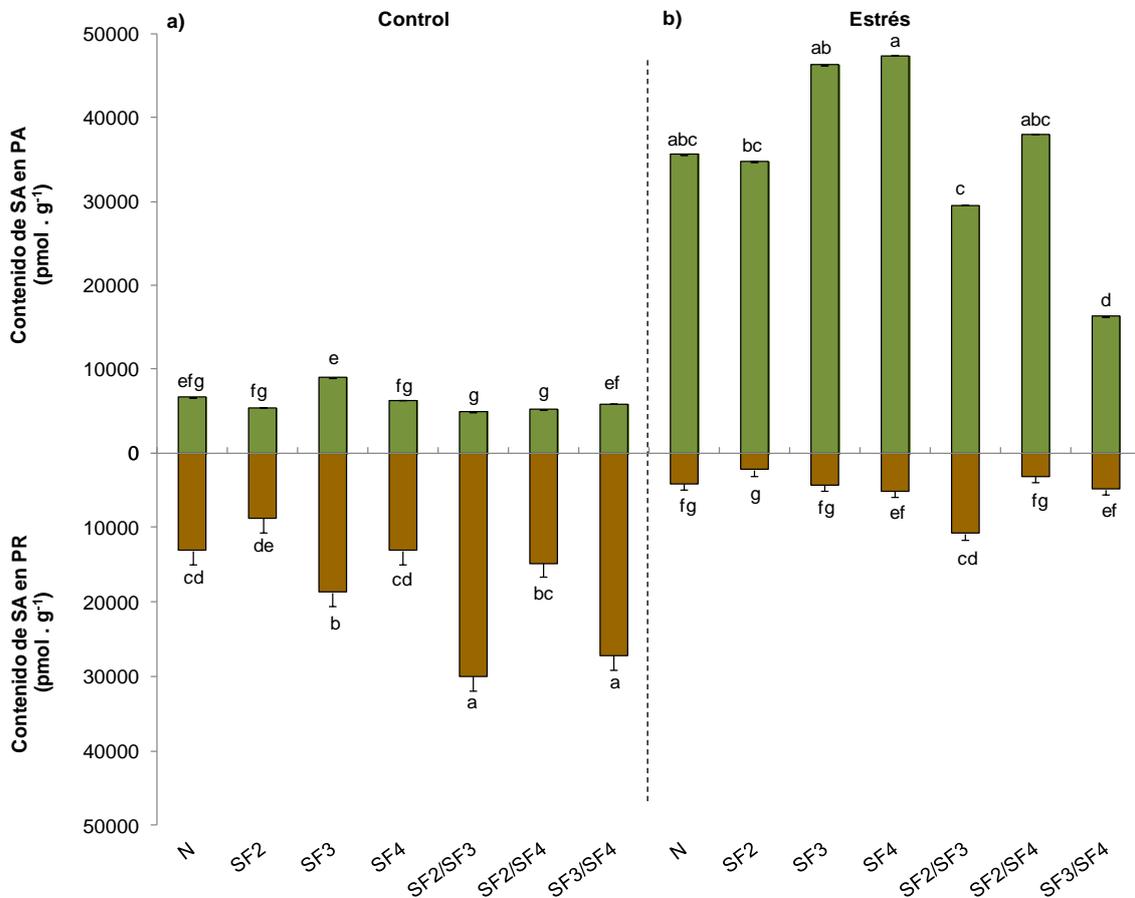


Fig. 21. Contenido de SA en parte aérea y radical, de plántulas inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas

con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Letras diferentes representan diferencias significativas con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.6. Contenido de AIA

El contenido de AIA en el tallo de las plántulas control fue levemente superior en las inoculadas con SF3 y SF4 y en las tres co-inoculaciones, comparadas con las plántulas sin inocular. En la raíz de las plántulas control el contenido de AIA fue mayor en las inoculadas con SF3 y en las co-inoculadas con SF2/SF3 y SF3/SF4, respecto a las sin inocular (Fig. 22a).

En condiciones de estrés, el contenido de AIA en tallo de las plántulas inoculadas no mostró diferencias con el de las plantas no inoculadas. Mientras que el contenido de esta hormona aumentó significativamente en las co-inoculadas con SF2/SF3 y SF2/SF4, en particular, el último tratamiento causó un incremento de 6 veces en comparación a las plantas no inoculadas (Fig. 22a). El contenido de AIA en raíces de plántulas estresadas aumentó con todos los tratamientos bacterianos, simples o combinados, aunque las co-inoculaciones causaron un incremento más notable que las inoculaciones simples. El mayor contenido de la hormona (5,5 veces mayor que el contenido de las no inoculadas) se observó en las plántulas co-inoculadas con SF3/SF4 (Fig. 22b).

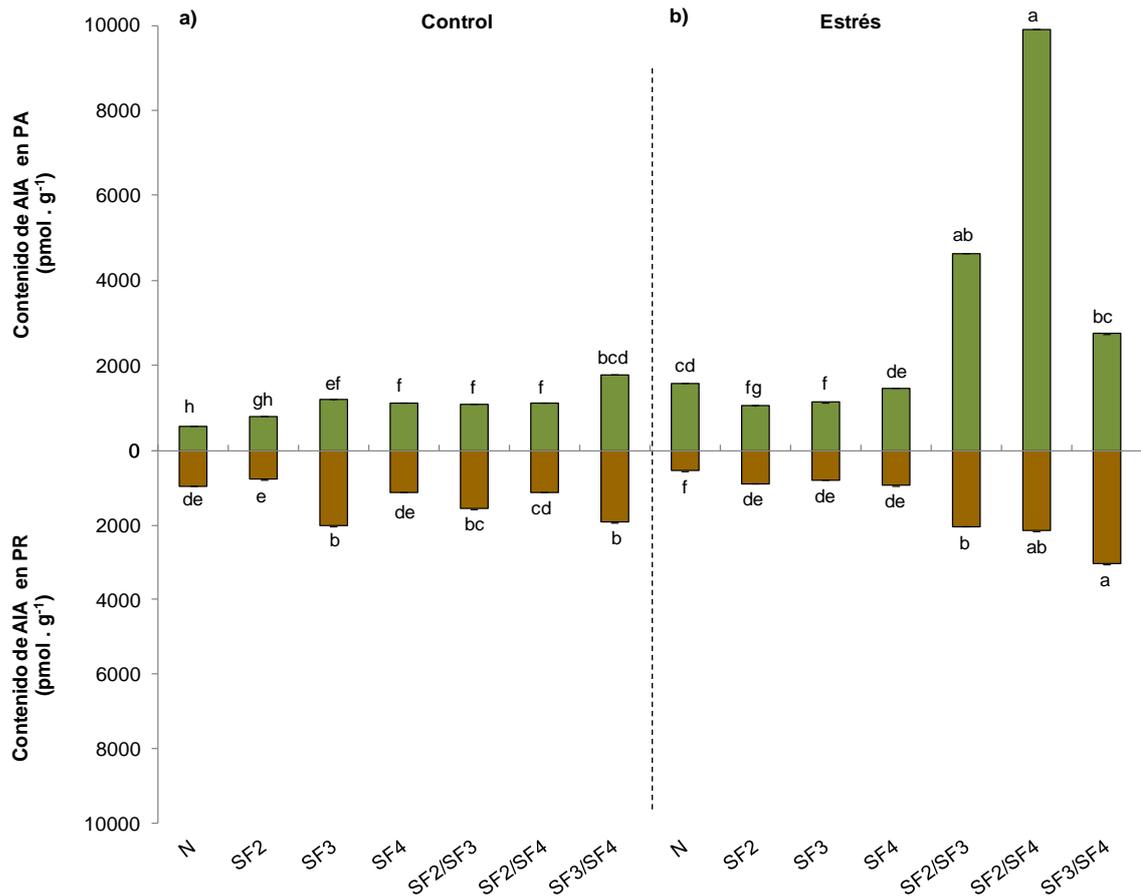


Fig. 22. Contenido de AIA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Letras diferentes representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.7. Contenido de ABA

En condiciones control, el contenido de ABA en tallos y raíces no mostró diferencias en las plantas tratadas con los inoculos simples respecto a las plantas sin inocular mientras que las co-inoculaciones si produjeron incremento significativo (Fig. 23a).

En estrés, el contenido de ABA en tallos aumentó en las plántulas co-inoculadas aproximadamente 6 veces respecto al control sin inocular (Fig. 23b). Asimismo, en las raíces de plántulas estresadas, ABA incrementó significativamente 10, 12 y 11 veces en los tratamientos de co-inoculaciones con SF2/SF3, SF2/SF4 y SF3/SF4 respectivamente (Fig. 23b).

En ambas condiciones de crecimiento, el contenido de ABA en los órganos de las plántulas fue modificado principalmente por las co-inoculaciones, siendo mayor la acumulación en tallos que en raíces.

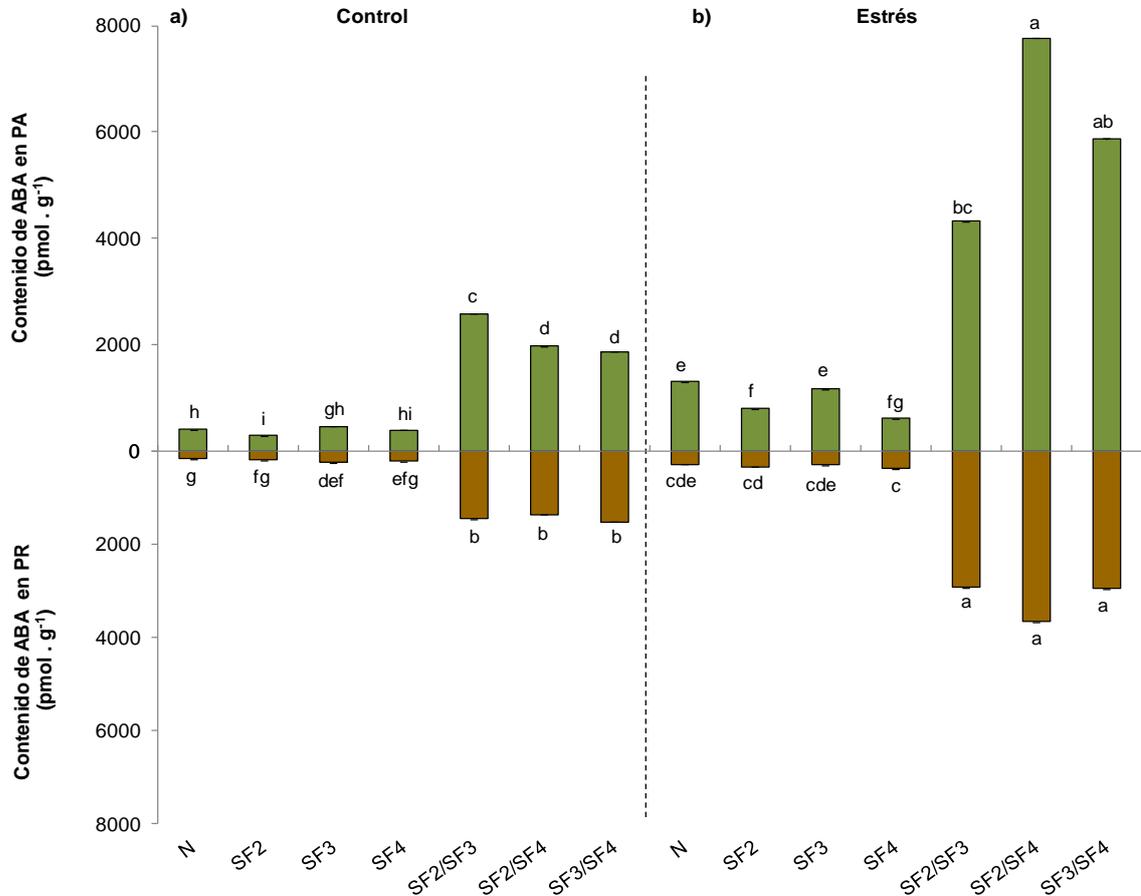


Fig. 23. Contenido de ABA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Letras diferentes representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

4.8. Contenido de JA

El contenido de JA en los tallos de plántulas crecidas en condiciones control e inoculadas con una sola bacteria fue significativamente menor que en las no inoculadas, mientras que la co-inoculación no tuvo efecto. En las raíces la inoculación con SF2 y SF4

produjo una leve disminución de JA, mientras que la co-inoculación con SF2/SF3 incrementó aproximadamente 2 veces el contenido respecto de las no inoculadas (Fig. 24a).

En los tallos de las plántulas estresadas JA aumentó por efecto de las co-inoculaciones con SF2/SF3 y SF2/SF4; mientras que en las raíces el contenido de JA no se modificó por los tratamientos bacterianos (Fig. 24b).

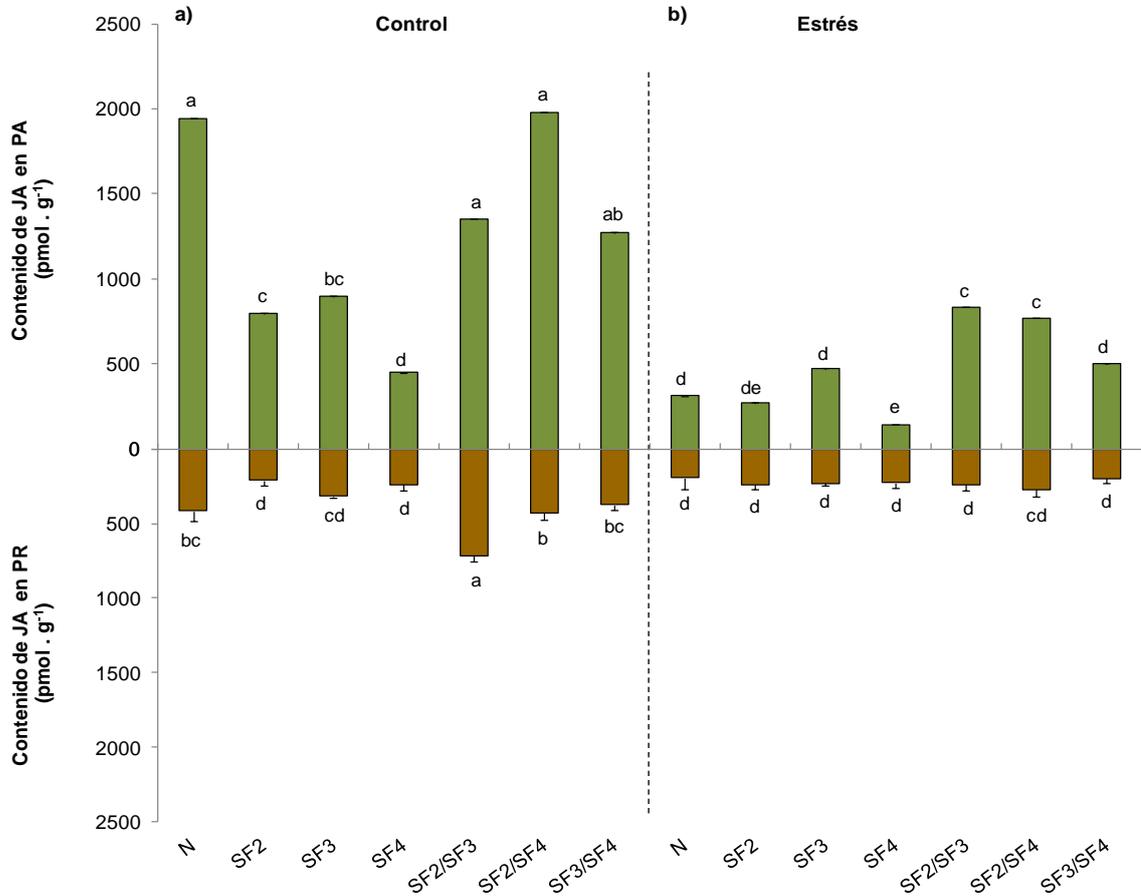


Fig. 24. Contenido de JA en parte aérea y radical, de plántulas de girasol inoculadas y co-inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4. Las barras indican medias \pm EE. Letras diferentes representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y test a posteriori LSD de Fisher ($n=5$).

En síntesis, en condiciones de crecimiento de estrés hídrico, la hormona más abundante en la parte aérea de las plantas de girasol fue SA, alcanzando concentraciones

entre 20000-45000 pmol.g⁻¹ PS. En la parte radical el ABA fue la hormona que mostró mayor incremento, alcanzando concentraciones entre 500-4000 pmol.g⁻¹ PS.

4.9. Contenido total de hormonas

El efecto de la inoculación y co-inoculación sobre el contenido de hormonas en las plántulas enteras se ilustra en Fig. 25. Como se observa, en condiciones de estrés SA es la hormona principal en las plántulas inoculadas y co-inoculadas. El contenido de ABA aumentó por las co-inoculaciones, en ambas condiciones de crecimiento. En estrés, el contenido de AIA disminuyó por efecto de la inoculación simple, mientras que la co-inoculación tuvo el efecto inverso. Por su parte, el JA disminuyó en mayor medida por efecto de los tratamientos bacterianos en condiciones de estrés.

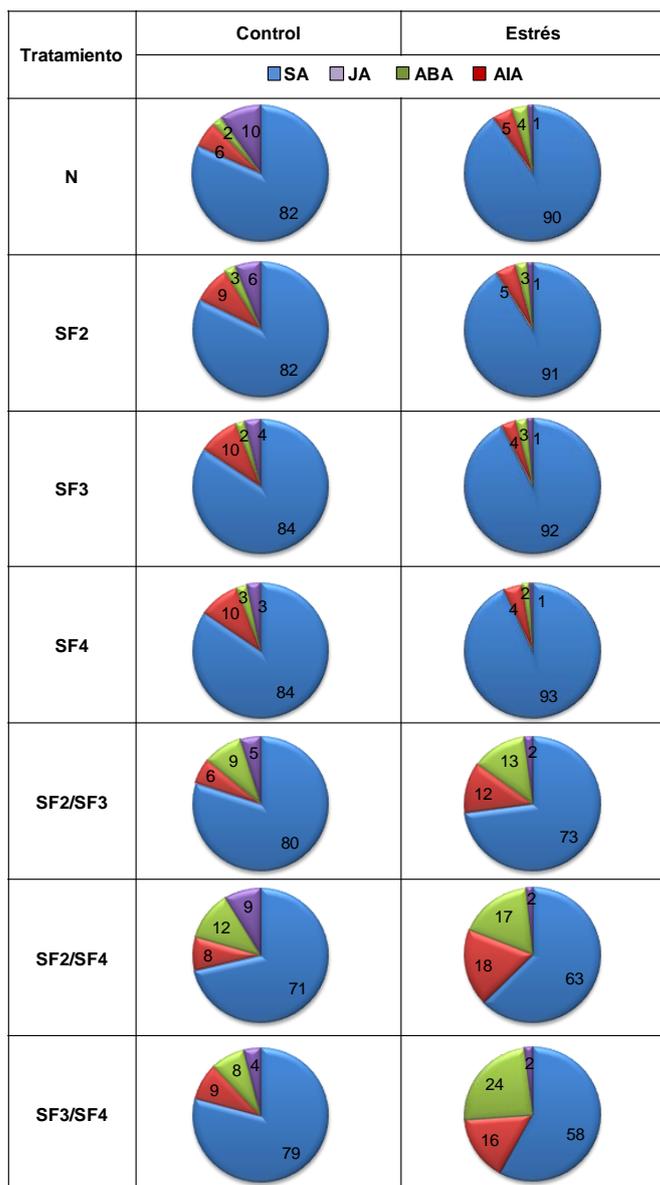


Fig. 25. Patrón de distribución hormonal, expresado en porcentaje, en plántulas enteras (tallo + raíz), crecidas en condiciones control y de estrés hídrico. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4; SF2/SF3: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF3; SF2/SF4: plántulas co-inoculadas con SF2 y SF4; SF3/SF4: plántulas co-inoculadas con SF3 y SF4.

4.10. Contenido relativo de agua (CRA)

En condiciones de crecimiento control, el CRA fue mayor en las plantas tratadas con inóculos simples (95,8%) y en aquellas co-inoculadas (97,9%) respecto a las no inoculadas (94,6%). En condiciones de estrés, los valores de CRA de todos los tratamientos fueron menores que los obtenidos de plantas sin estrés. El valor más alto se registró para las plantas co-inoculadas (80%), seguido de las plantas tratadas con inóculos simples (72%) y las plantas no inoculadas (70,4%). Si bien, la condición de estrés hídrico disminuyó el CRA en todos los tratamientos, las bacterias combinadas mejoraron el estado hídrico de las plantas.

5. Efecto de la inoculación simple de plántulas de girasol cultivadas en condición control y de estrés, en sustrato líquido,

Los ensayos de hidroponía mostraron, al igual que los realizados en macetas, que la condición de estrés hídrico afecta el desarrollo de las plántulas, disminuyendo visiblemente los parámetros de crecimiento (Fig. 26).

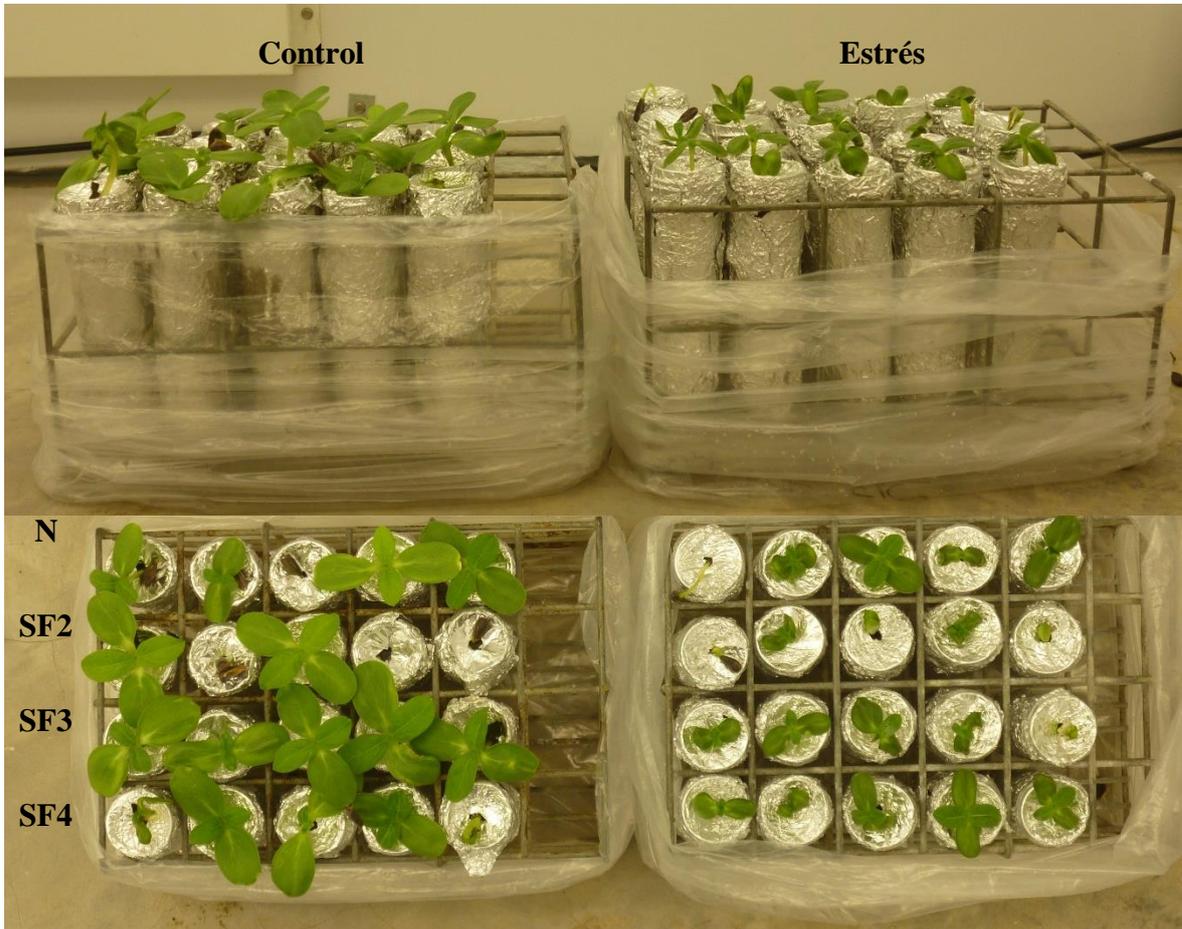


Fig. 26. Plántulas de girasol inoculadas, crecidas en condiciones control y de estrés, en sustrato líquido. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4.

5.1. Longitud de parte aérea y radical

Las plántulas crecidas en condiciones de estrés hídrico mostraron menores valores de la longitud de parte aérea y radical respecto a las plántulas en condiciones control (Figs. 27a y b).

En condiciones control, las inoculaciones no mostraron diferencias en la longitud de parte aérea y radical, respecto a las plántulas sin inocular (Fig. 27a). Por otro lado, las plantas

crecidas en condiciones de estrés e inoculadas mostraron mayores valores de longitud de tallo de aproximadamente un 10% mayor (Fig. 27b).

En raíz se observó una mayor longitud en las plántulas inoculadas con las tres cepas bacterianas, superando al control sin inocular en promedio en un 7% (Fig. 27b).

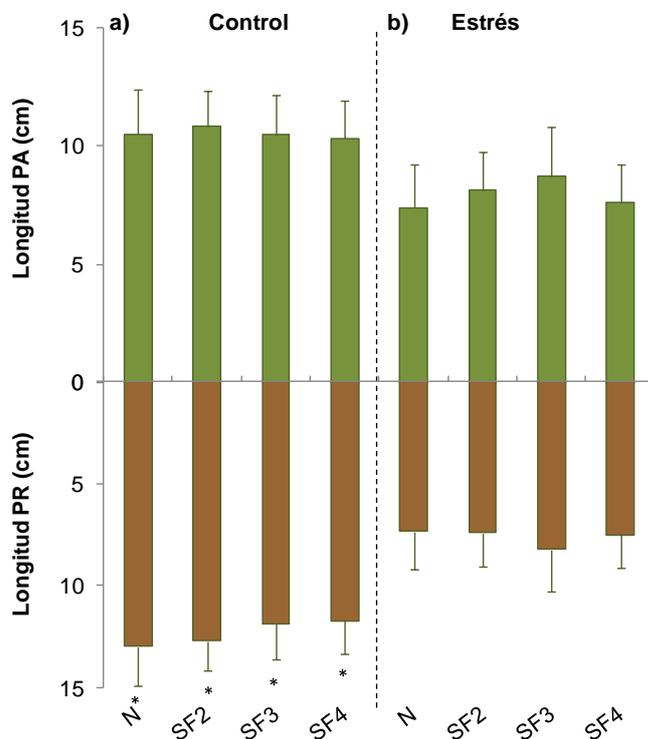


Fig. 27. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y análisis MLGM ($n=5$).

5.2. Peso fresco de parte aérea y radical

Las plántulas crecidas en estrés mostraron un peso fresco de la parte aérea y radical significativamente menor, respecto a las plántulas control.

En condiciones control, las inoculaciones con las cepas SF2 y SF3, mostraron valores levemente mayores de peso fresco de parte aérea (Fig. 28a). Mientras que en estrés los tres tratamientos bacterianos produjeron incremento de este parámetro, incluso mayor que el observado en la condición control, llegando a aumentarlo en promedio en un 11% (Fig. 28b). En raíz la respuesta al estrés y a las inoculaciones fue similar que en la parte aérea. En condiciones control se observó un mayor peso fresco de la raíz de las plántulas inoculadas

con las tres cepas bacterianas, superando al peso de las plantas sin inocular, en un promedio de 17% (Fig. 28a). De manera similar, en estrés, los tratamientos bacterianos incrementaron el peso fresco radical en un 23%, respecto al de las plantas sin inocular (Fig. 28b).

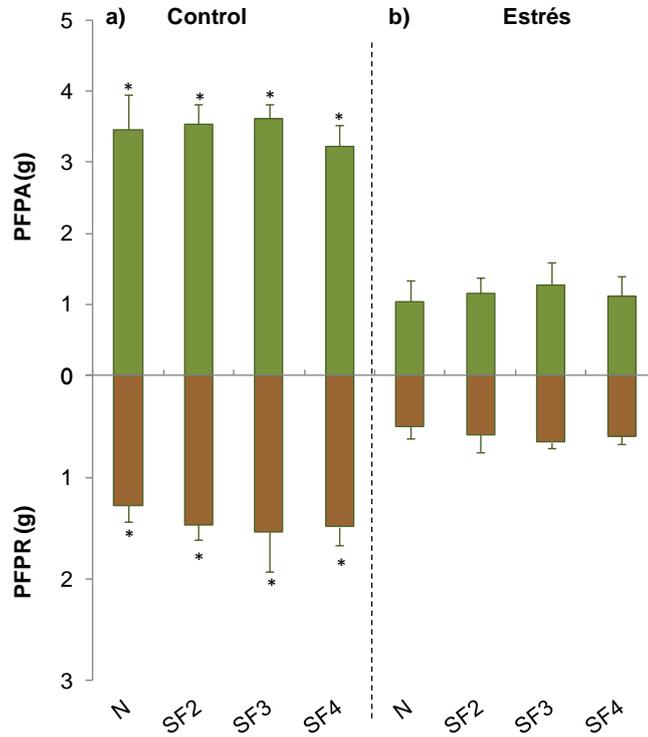


Fig. 28. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y análisis MLGM ($n=5$).

5.3. Peso seco de parte aérea y radical

Las plántulas crecidas en estrés mostraron una disminución significativa del peso seco de la parte aérea, respecto a las plántulas control.

En condiciones control, las inoculaciones con las cepas SF2 y SF3, incrementaron levemente el peso seco del tallo, superando al del control sin inocular en 5% y 11%, respectivamente (Fig. 29a). Si bien el estrés redujo el peso seco de la parte aérea de todas las plántulas, las tres inoculaciones produjeron incrementos del parámetro medido, en un 10%, 18% y 3%, respecto al peso registrado en las plántulas no inoculadas (Fig. 29b).

Por otro lado, en la condición control se observó incremento en el peso seco de raíz en las plántulas crecidas inoculadas con las tres cepas respecto a las plántulas sin inocular.

Dichos tratamientos superaron al control 5%, 22% y 7% (Fig. 29a). En estrés el incremento producido por los tratamientos bacterianos superó al control en 30%, 13% y 17% (Fig. 29b).

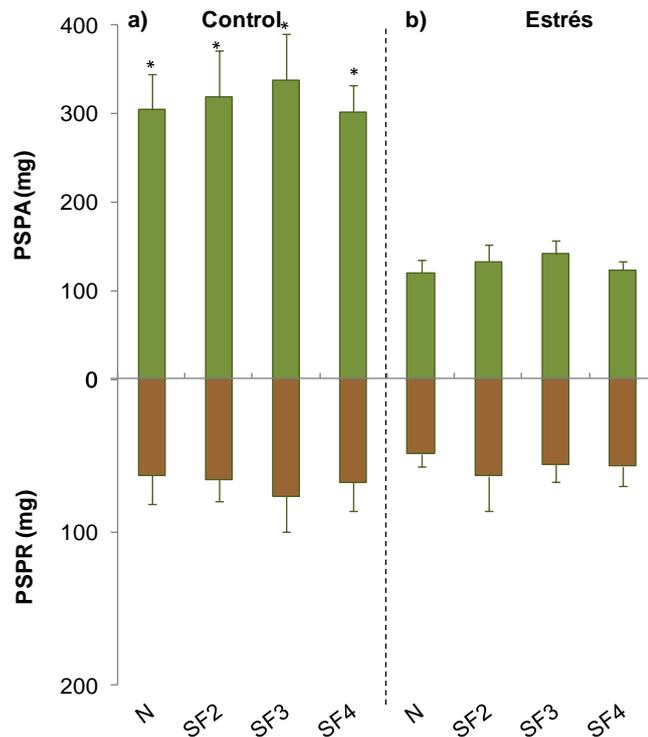


Fig. 29. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol inoculadas, crecidas en condiciones control a) y de estrés hídrico b), en sustrato líquido. N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras indican medias \pm EE. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular, con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías y análisis MLGM ($n=5$).

6. Ensayos de inoculación a campo

6.1. Localidad de Manfredi

En los ensayos realizados en el campo experimental del INTA-Manfredi las plantas inoculadas con las cepas bacterianas mostraron un mayor número de capítulos por parcela que su control sin inocular en el ciclo 2008/2009, mayor número de semillas por capítulo en los cuatro ciclos agrícolas y, solo el SF2 produjo aumento del peso de mil semillas en tres de los cuatro ciclos (Tabla 3).

La inoculación con la cepa SF2 produjo aumento en el rendimiento de granos en los ciclos 07/08, 08/09 y 11/12; los mismos resultaron un 20% ($250 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), 13% ($339 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) y 11% ($189 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) superiores al de las plantas sin inocular. Estos resultados se vieron

reflejados directamente sobre el rendimiento de la materia grasa, incrementándolo en ~ 18, 12 y 11% respectivamente (Fig. 30).

La inoculación con la cepa SF3 produjo aumento del rendimiento de granos en los dos ciclos en las que se aplicó (10/11 y 11/12); siendo los rendimientos 4% y 7% (123 y 114 Kg.ha⁻¹) superiores al de las plantas sin inocular. Además produjo incremento en el rendimiento de materia grasa del 3% y 10% (40 y 75 Kg.ha⁻¹) (Fig. 30).

La inoculación con la cepa SF4 causó incremento en el rendimiento de granos en los ciclos 07/08 y 08/09, superando al control sin inocular en ~ 10 y 11% respectivamente (117 y 277 Kg.ha⁻¹); éstos aumentos incidieron positivamente en el rendimiento de la materia grasa, superando al obtenido en las plantas control en 8 y 14% (34 y 136 Kg.ha⁻¹) (Fig. 30).

El tratamiento con Nitrógeno, aumentó solo el número de semillas por capítulo (Tabla 3). El rendimiento de granos se modificó en promedio un 3% con dicho tratamiento, lo que implicó un aumento en materia grasa del 8%. El mismo tratamiento combinado con la cepa SF2, aumentó ambos rendimientos aunque, en promedio, no superó al tratamiento sin inocular, incluso en algunas repeticiones el efecto fue menor que el producido por la cepa individual. Respecto a las cepas SF3 y SF4 combinadas con Nitrógeno, se observó un leve incremento en ambos parámetro de rendimiento, en los ciclos 07/08, 08/09 y 10/11, sin embargo al igual que en el caso de la inoculación con SF2, algunas repeticiones no superaron a los rendimientos de los tratamientos en ausencia de Nitrógeno (Fig. 30).

Tabla 3. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas (gr) de plantas de girasol inoculadas con cepas comercial y nativas, correspondiente a los ciclos agrícolas 2007/2008, 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 de la localidad Manfredi.

	Número de capítulos por parcela				Número de semillas por capítulo				Peso de mil semillas (gr)			
	07/08	08/09	10/11	11/12	07/08	08/09	10/11	11/12	07/08	08/09	10/11	11/12
N	16,2	16,5	15,5	15	406,4	741,4	1110	817,4	71,6	76,3	67,5	55,6
Azo	16,2	17,0	16,0	15	434,7	829,2	1077	788,7	72,6	77,5	70,0	56,5
SF2	16,0	17,0	14,0	13,7	480,5	810,7	1235	949,4	74,2	77,3	62,5	56,7
SF3	-	-	14,0	14,5	-	-	1396	883,4	-	-	65,0	56,4
SF4	15,2	17,0	15,0	13,5	482,8	883,4	1134	893,4	70,2	75,7	67,5	52,2
Nit	15,2	16,5	15,2	15	437,1	795,1	1337	884,6	73,7	74,2	65,0	54,4
Nit-Azo	15,2	16,5	13,2	15	524,4	859,4	1439	899,5	66,9	75,4	70,0	61,3
Nit-SF2	16,0	17,0	14,5	15	446,7	817,8	1391	925,2	70,9	75,1	65,0	59,7
Nit-SF3	-	-	15,0	13,5	-	-	1343	927,9	-	-	67,5	57,6
Nit-SF4	16,0	16,7	14,0	16	490,7	816,7	1262	838	75,4	65,5	67,5	55,7

N: plantas sin inocular; Nit: plantas sin inocular tratadas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y con fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y con fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y con fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y con fertilización química.

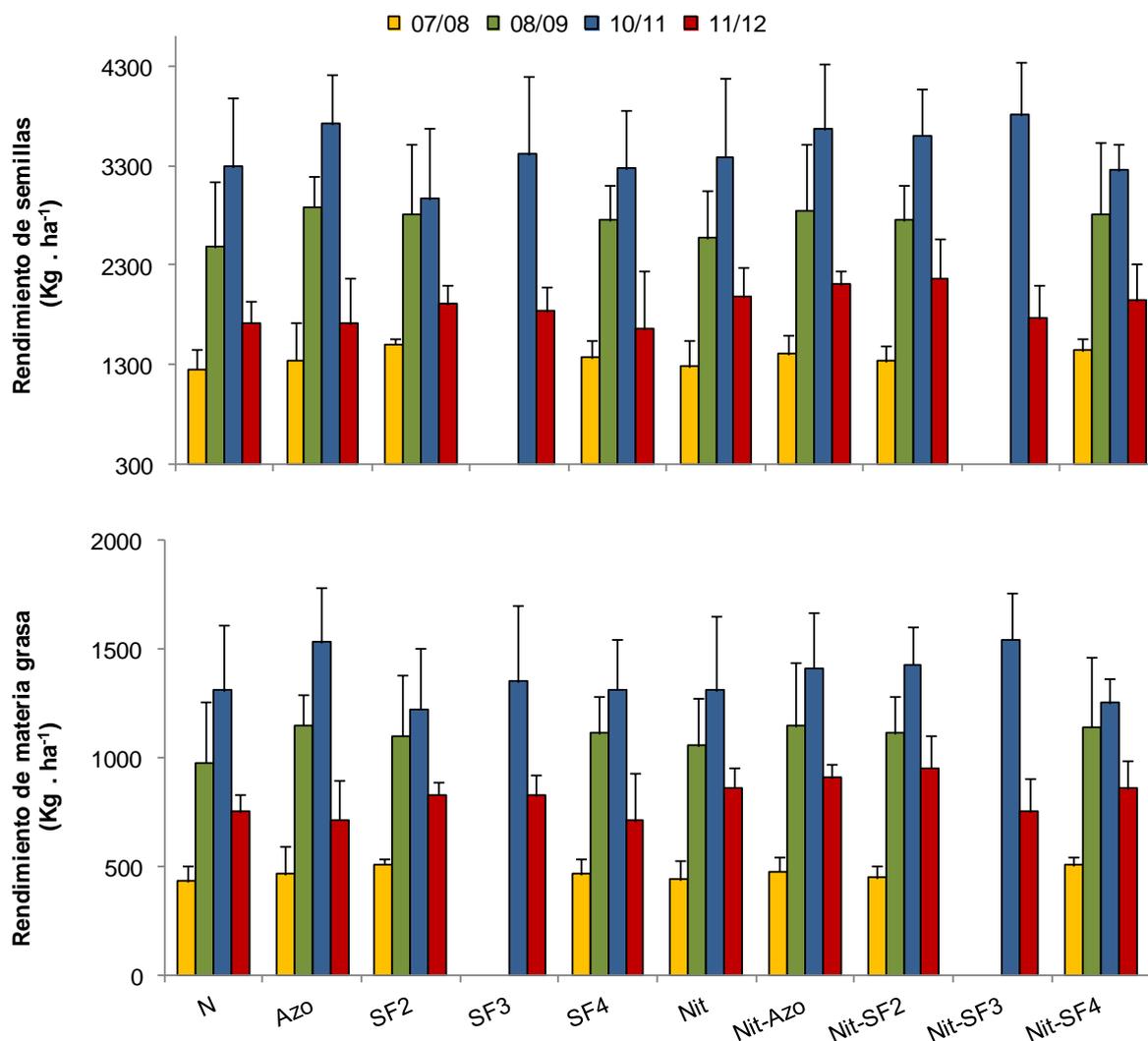


Fig. 30. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondientes a los ciclos agrícolas 2007/2008, 2008/2009 y 2011/2012 en la localidad Manfredi. N: plantas sin inocular; Nit: plantas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química.

6.2. Localidad de Vicuña Mackenna

En los ensayos realizados en el campo de la localidad de Vicuña Mackenna las cepas nativas aplicadas incrementaron el peso de granos en el ciclo agrícola 08/09; el número de semillas por capítulo en el ciclo 10/11 y el número de capítulos por parcela en el ciclo 11/12 (Tabla 4)

La inoculación con la cepa SF2 produjo aumento en el rendimiento de granos en los ciclos agrícolas 08/09 y 11/12; siendo los mismos de 124 y 10 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, respecto a las plantas sin inocular. Estos resultados incidieron positivamente en el rendimiento de materia grasa, incrementándolo ~5 y 26% respectivamente (Fig. 31).

La inoculación con la cepa SF3 produjo un leve aumento en el rendimiento de granos en ambos ciclos, aunque el aumento observado en el rendimiento de materia grasa fue más notable (75 y 135 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) (Fig. 31).

La inoculación con la cepa SF4, en los ciclos agrícolas 10/11 y 11/12, produjo rendimiento de granos que superaron al del control sin inocular en ~ 330 y 170 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ respectivamente. Estos resultados incidieron positivamente en el rendimiento de materia grasa, siendo mayores al control en 170 y 180 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Fig. 31).

El tratamiento con Nitrógeno, en esta localidad, tuvo efecto positivo en el ciclo 11/12, donde se observó incremento en el número de capítulos por parcela (Tabla 4); dicho parámetro reflejó aumento en los rendimiento de granos (61 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) y materia grasa (164 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), aunque estos valores no superaron a los de las cepas aplicadas individualmente. El mismo tratamiento combinado con la cepa SF2 tuvo un efecto positivo en los ciclos 08/09 y 11/12, aunque las diferencias obtenidas no superaron a las producidas por la inoculación con la misma cepa sin nitrógeno (Fig. 31).

La cepa SF3, combinada con la aplicación de nitrógeno, causó aumento de los rendimientos en los dos ciclos en los que se la aplicó, aunque nuevamente las diferencias observadas no superaron a las producidas por la cepa individual respecto su control sin inocular (Fig. 31).

La cepa SF4, combinada con nitrógeno, produjo un leve incremento solo en el ciclo 10/11 y, al igual que en los otros dos tratamientos bacterianos, las diferencias provocadas no superaron a las obtenidas por la aplicación de la cepa individual (Fig. 31).

Tabla 4. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas (gr) de plantas de girasol inoculadas con cepas comercial y nativas, correspondiente a los ciclos agrícolas 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 en la localidad Vicuña Mackenna.

	Número de capítulos por parcela			Número de semillas por capítulo			Peso de mil semillas (gr)		
	08/09	10/11	11/12	08/09	10/11	11/12	08/09	10/11	11/12
N	16,0	16,7	11,7	1499,8	1268,2	1137,6	55,3	62,5	32,8
Azo	15,2	16,5	14	1455,0	1369,4	1438	56	60	35,9
SF2	16,0	14,7	13	1432,2	1520,6	1131,6	59,3	60	30,2
SF3	-	16,5	15	-	1361,8	974,2	-	60	30,2
SF4	14,7	16,7	13,2	1376,1	1512,8	1383,2	56	57,5	28,1
Nit	14,7	16,0	13,5	1471,4	1360,1	1115,4	58,3	60	30,9
Nit-Azo	15,0	16,2	13,7	1407,3	1400,0	1006,5	55,5	60	35,9
Nit-SF2	15,5	16,2	13,5	1577,6	1230,0	1252,9	52,3	60	35,4
Nit-SF3	-	15,7	13	-	1538,0	1166,1	-	57,5	33,6
Nit-SF4	15,2	16,2	13,5	1467,4	1351,3	1048,7	52,8	60	31,5

N: plantas sin inocular; Nit: plantas sin inocular tratadas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química.

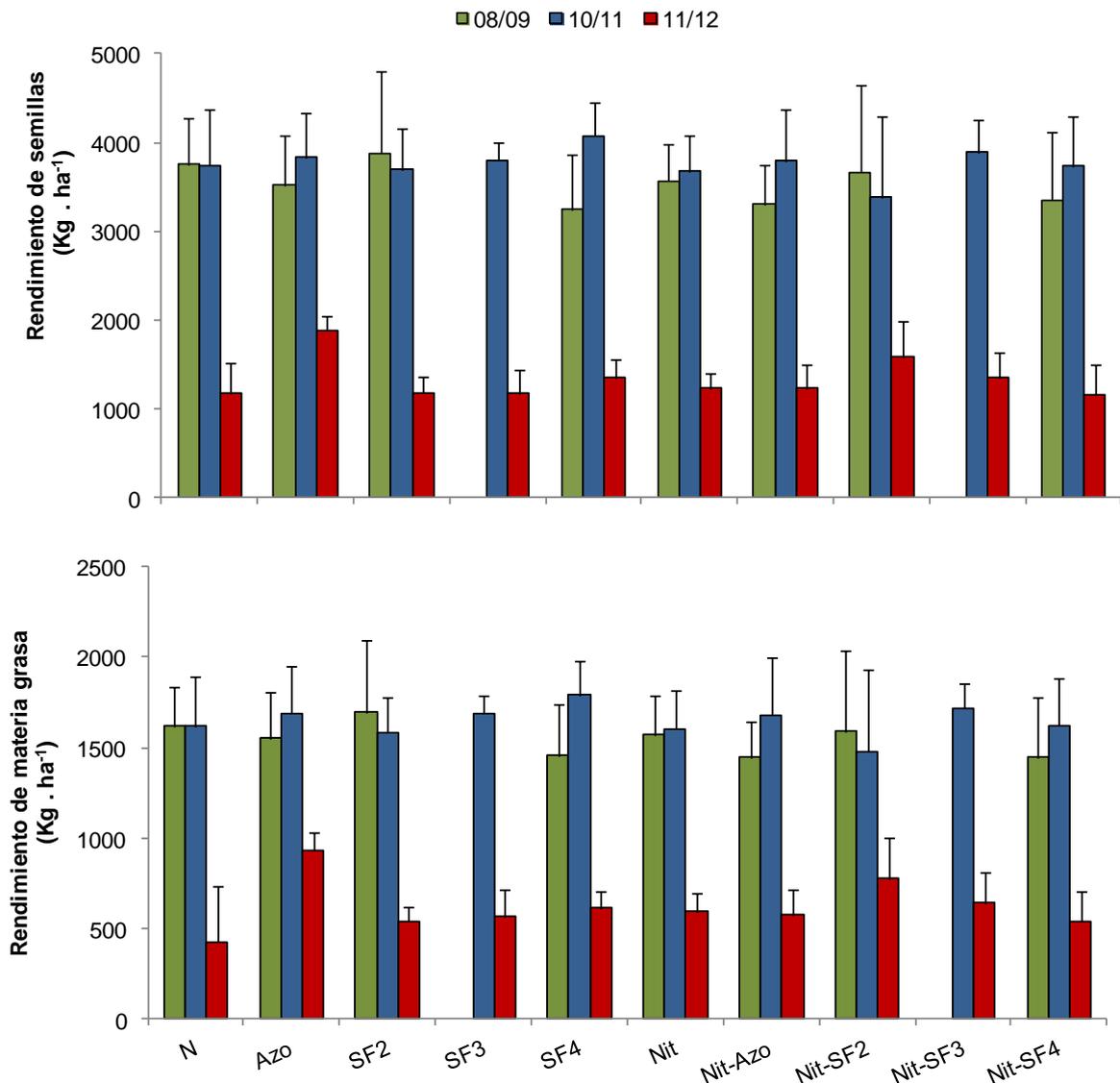


Fig. 31. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondientes a los ciclos agrícolas 2008/2009, 2010/2011 y 2011/2012 en la localidad Vicuña Mackenna. N: plantas sin inocular; Nit: plantas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química.

6.3. Localidad de Bulnes

En los ensayos realizados en el campo de la localidad de Bulnes los tratamientos bacterianos no tuvieron efecto significativo sobre el número de semillas por capítulo y el peso de las mismas. Sólo fue posible observar un aumento en el número de capítulos por parcela en las plantas inoculadas con SF3 y SF4 (Tabla 5). Este aumento no fue suficiente

como para provocar un efecto positivo sobre el rendimiento de granos y materia grasa (Fig. 32).

La aplicación de Nitrógeno tampoco modificó significativamente los parámetros medidos, incluso combinado con las cepas bacterianas.

Tabla 5. Número de capítulos por parcela, número de semillas por capítulo y peso de mil semillas (gr) de plantas de girasol inoculadas con cepas comercial y nativas, correspondiente al ciclo agrícola 2010/2011 en la localidad Bulnes.

	Número de capítulos por parcela	Número de semillas por capítulo	Peso de mil semillas (gr)
N	16,33	1131,06	60
Azo	16,75	933,82	57,5
SF2	16	1054,72	60
SF3	17,25	1116,45	57,5
SF4	16,5	1020,52	60
Nit	16,75	1049,26	60
Nit-Azo	16	1072,04	55
Nit-SF2	16,5	1086,27	55
Nit-SF3	16,75	1094,84	57,5
Nit-SF4	16	1211,93	57,5

N: plantas sin inocular; Nit: plantas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química.

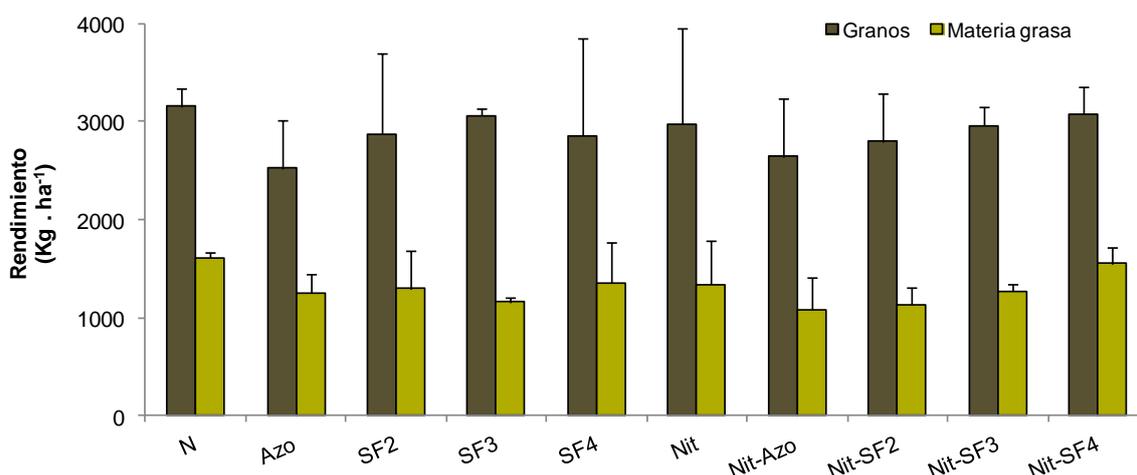


Fig. 32. Rendimiento de granos y materia grasa de plantas de girasol inoculadas con cepas nativas, cepa comercial y fertilización química, correspondiente al ciclo agrícola 2010/2011 en la localidad Bulnes. N: plantas sin inocular; Nit: plantas con fertilización química; Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp.; SF2: plantas inoculadas con SF2; SF3: plantas inoculadas con SF3; SF4: plantas inoculadas con SF4; Nit-Azo: plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. y fertilización química; Nit-SF2: plantas inoculadas con SF2 y fertilización química; Nit-SF3: plantas inoculadas con SF3 y fertilización química; Nit-SF4: plantas inoculadas con SF4 y fertilización química.

7. Aplicación exógena de hormonas en plántulas de girasol

El efecto de la aplicación exógena de hormonas sobre plantas de girasol se determinó mediante el análisis de parámetros de crecimiento en plántulas de 18 días de crecimiento.

7.1. Diámetro de tallo

El riego con las soluciones de hormonas incrementó levemente el diámetro del tallo, excepto en las plántulas regadas con GA₃-1 y 2, AIA-1 y SA-1, que no mostraron diferencia respecto a las plantas control (Fig. 33). El tratamiento con la solución AIA-2 causó el mayor incremento (17%), mientras que las demás soluciones produjeron un aumento de ~12% (Fig. 33).

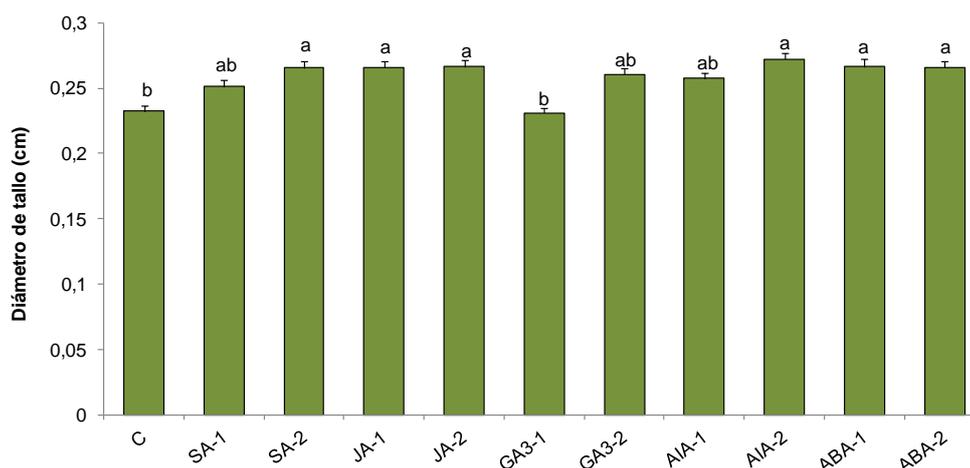


Fig. 33. Diámetro de tallo de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas. C: plántulas regadas con HOA; SA-1 y SA-2: plántulas regadas con soluciones de SA; JA-1 y JA-2: plántulas regadas con soluciones de JA; GA₃-1 y GA₃-2: plántulas regadas con soluciones de GA₃; AIA-1 y AIA-2: plántulas regadas con soluciones de AIA; ABA-1 y ABA-2: plántulas regadas con soluciones de ABA. Las barras representan media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para ANOVA de una vía con test a posteriori DGC ($n=5$).

7.2. Longitud de parte aérea y radical

La longitud de parte aérea mostró valores significativamente mayores en los tratamientos con riego con ambas soluciones de GA₃, aumentando el parámetro medido en alrededor de un 30% (Figs. 34 y 35).

En raíz los riegos con hormonas redujeron levemente la longitud, respecto a las plántulas sin tratar (Figs. 34 y 35).

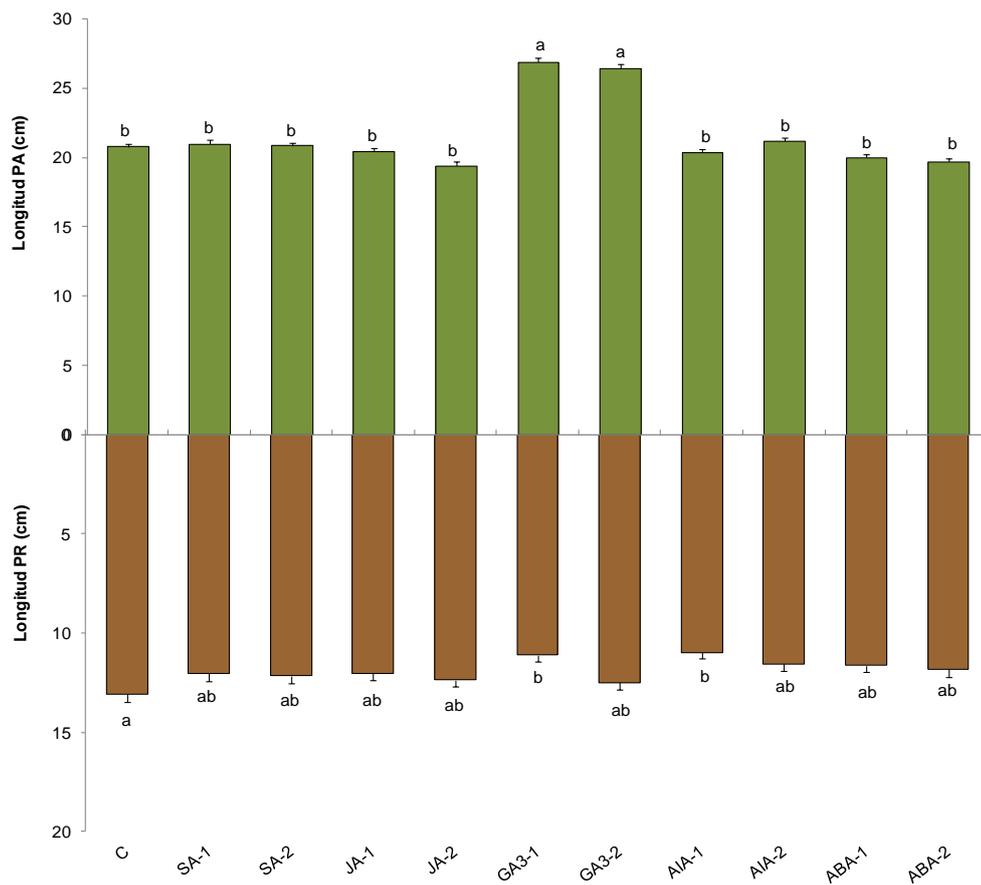


Fig. 34. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas. C: plántulas regadas con HOA; SA-1 y SA-2: plántulas regadas con soluciones de SA; JA-1 y JA-2: plántulas regadas con soluciones de JA; GA₃-1 y GA₃-2: plántulas regadas con soluciones de GA₃; AIA-1 y AIA-2: plántulas regadas con soluciones de AIA; ABA-1 y ABA-2: plántulas regadas con soluciones de ABA. Las barras representan media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para ANOVA de una vía con test a posteriori DGC ($n=5$).



Fig. 35. Plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas. CONTROL: plántulas regadas con HOA; SA-1 y SA-2: plántulas regadas con soluciones de SA; JA-1 y JA-2: plántulas regadas con soluciones de JA; GA₃-1 y GA₃-2: plántulas regadas con soluciones de GA₃; AIA-1 y AIA-2: plántulas regadas con soluciones de AIA; ABA-1 y ABA-2: plántulas regadas con soluciones de ABA.

7.3. Peso fresco de parte aérea y radical

El peso fresco de parte aérea de las plántulas regadas con AIA-2 y ambas soluciones de ABA incrementaron el peso fresco de parte aérea en 25 y ~24% respectivamente, mientras que ambas concentraciones de JA aumentaron este parámetro en ~20% (Fig. 36).

El peso fresco radical fue mayor principalmente en las plántulas regadas con las soluciones de JA, AIA y ABA, superando en los dos últimos tratamientos, en ~43 y 50% respectivamente, respecto a las plántulas sin tratar (Fig. 36).

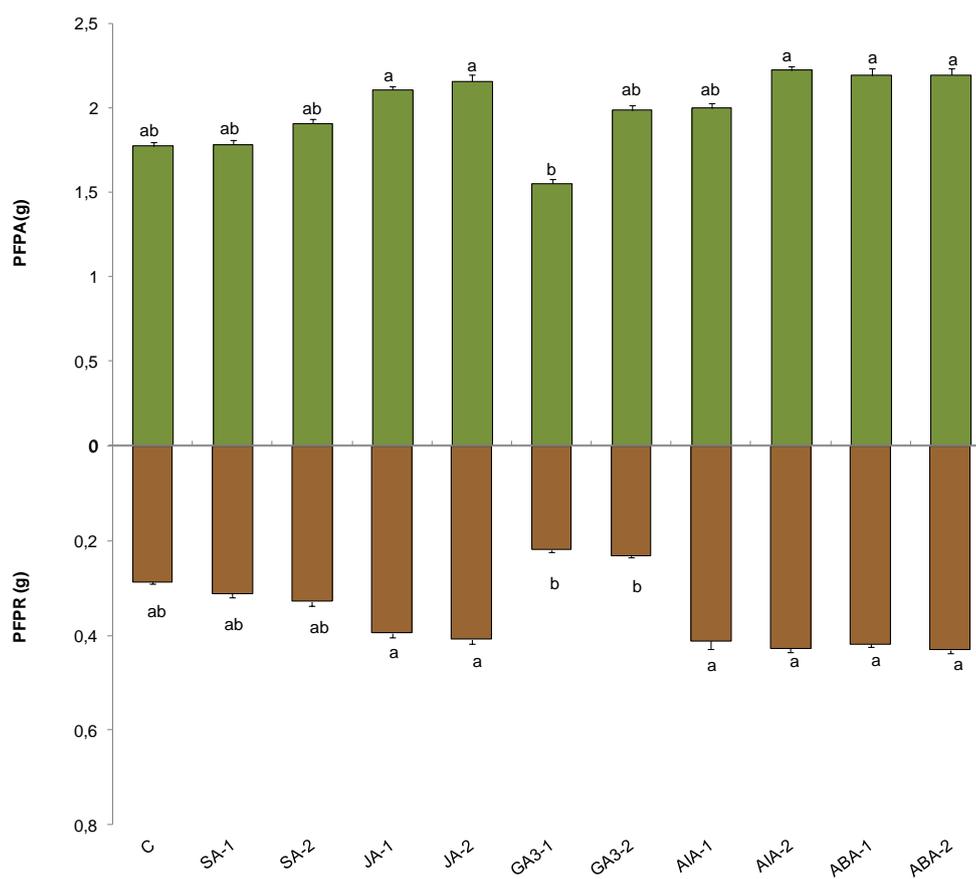


Fig. 36. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas. C: plántulas regadas con HOA; SA-1 y SA-2: plántulas regadas con soluciones de SA; JA-1 y JA-2: plántulas regadas con soluciones de JA; GA₃-1 y GA₃-2: plántulas regadas con soluciones de GA₃; AIA-1 y AIA-2: plántulas regadas con soluciones de AIA; ABA-1 y ABA-2: plántulas regadas con soluciones de ABA. Las barras representan media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para ANOVA de una vía con test a posteriori DGC ($n=5$).

7.4. Peso seco de parte aérea y radical

El peso seco de parte aérea incrementó significativamente en las plántulas regadas con las soluciones de ABA-2, AIA-2 y JA-2, superando el peso de las controles en ~40%, ~34% y ~22% respectivamente (Fig. 37).

El peso seco de raíz mostró incremento significativo en las plántulas regadas con las soluciones de AIA (entre 50 y 70%) y en menor medida con las de ABA, JA-1 y GA₃-1 (Fig. 37).

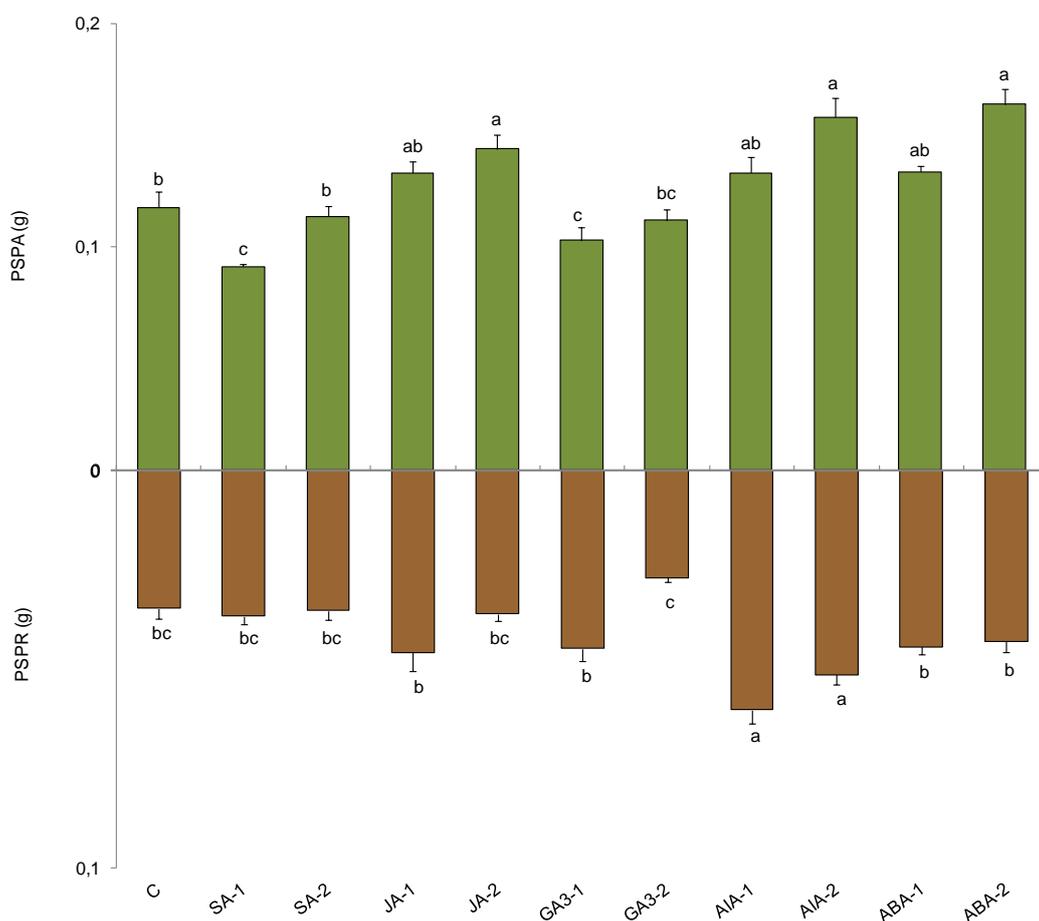


Fig. 37. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con soluciones de hormonas. C: plántulas regadas con HOA; SA-1 y SA-2: plántulas regadas con soluciones de SA; JA-1 y JA-2: plántulas regadas con soluciones de JA; GA₃-1 y GA₃-2: plántulas regadas con soluciones de GA₃; AIA-1 y AIA-2: plántulas regadas con soluciones de AIA; ABA-1 y ABA-2: plántulas regadas con soluciones de ABA. Las barras representan media ± EE. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para ANOVA de una vía con test a posteriori DGC ($n=5$).

8. Aplicación exógena de mezclas hormonales en plántulas de girasol inoculadas

Las combinaciones hormonales M1 y M2 se conformaron de acuerdo a los resultados del ensayo anterior, en el cual se observó que AIA-2 produjo incremento, si bien en algunos casos muy leves, de todos los parámetros evaluados, seguido de ABA-2 y JA-2. Dichas concentraciones hormonales conformaron ambas combinaciones. A M2 se le adicionó además SA-2 y GA₃-1 debido a que las plantas tratadas con dichas concentraciones hormonales mostraron una respuesta similar al control o levemente superior en los parámetros evaluados. En los casos que hubo una respuesta similar en las mediciones de ambas concentraciones, se optó por experimentar con la concentración más baja (Fig. 38).

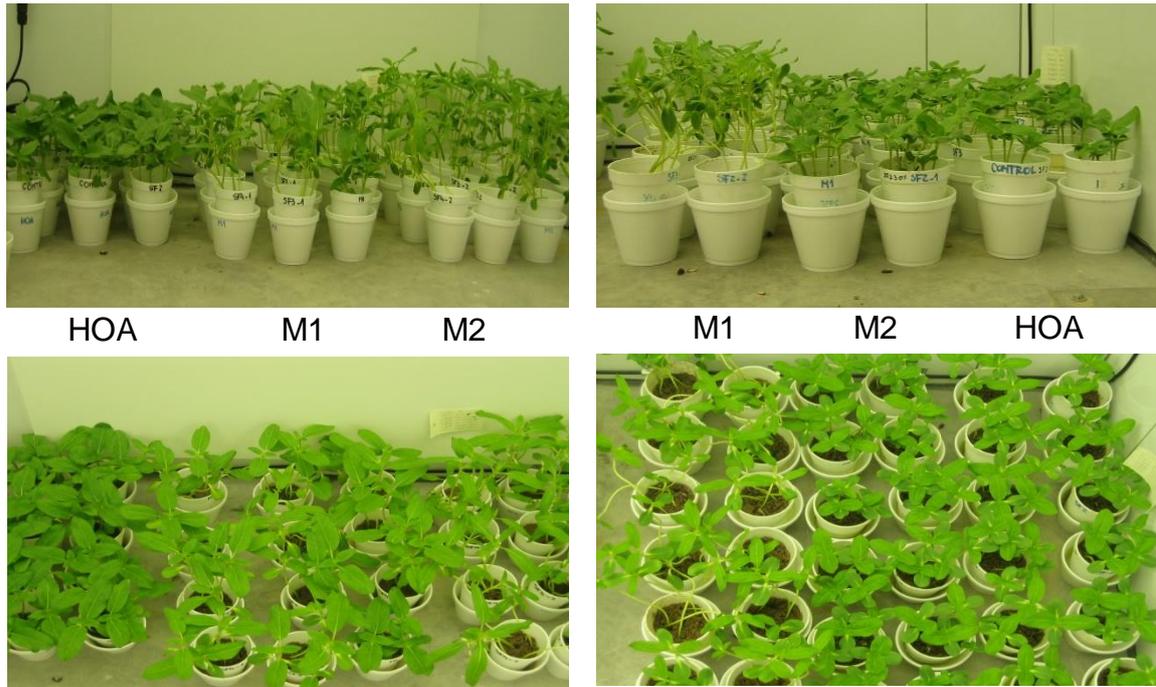


Fig. 38. Plántulas de girasol regadas con HOA y mezclas hormonales M1 y M2, no inoculadas e inoculadas con las cepas bacterianas. La imagen muestra dos de los cinco ensayos realizados.

8.1. Longitud de parte aérea y radical

Al comparar las plántulas tratadas con hormonas e inoculadas, con las sin inocular se observó que la longitud del tallo de aquellas regadas con M1, incrementaron levemente la longitud alcanzada por las plántulas regadas con HOA. Por su parte, las plántulas tratadas con M2 duplicaron la longitud del parámetro medido. Este efecto no se vio reflejado de la misma manera cuando se midió la longitud radical, ya que los riegos con las mezclas hormonales no incrementaron dicho parámetro (Fig. 39).

La longitud del tallo de las plántulas regadas con HOA fue similar independientemente de los tratamientos bacterianos. En cuanto a la longitud de las raíces, las plántulas inoculadas con las tres cepas mostraron un leve aumento, aunque no significativo, comparadas con las de plántulas sin inocular (Fig. 39a).

En las plántulas regadas con M1, los tratamientos bacterianos no mostraron efecto sobre la longitud del tallo y raíz respecto de las plantas sin inocular, (Fig. 39b).

Las plántulas regadas con M2 e inoculadas con SF4 incrementaron levemente, aunque no significativamente, la longitud del tallo respecto a las plántulas sin inocular. Mientras que en raíz no se observó efecto, producto de la inoculación (Fig. 39c).

La relación longitud radical/ longitud aérea de las plantas regadas con HOA y M1, no inoculadas e inoculadas, fue 0,6 y 1, respectivamente; mientras que la longitud de parte aérea de las plantas regadas con M2 excedió al doble de la longitud radical, lo cual implicó una relación entre las partes radical y aérea igual a 0,3; valor inferior al de las plantas control. Además estas plantas presentaron tallos delgados y largos, y hojas finas y alargadas; lo cual resulta morfológicamente anormal, por lo que dichas plántulas serían no viables en un tiempo de cultivo más prolongado (Fig. 40).

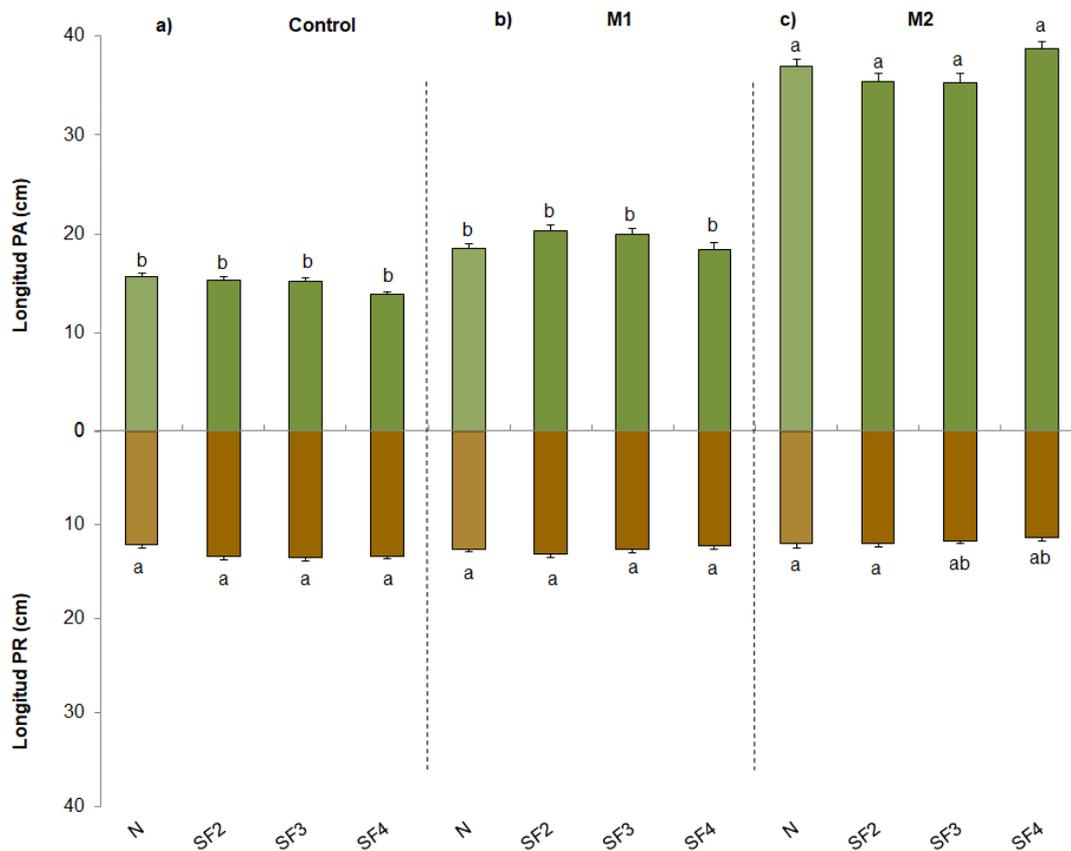


Fig. 39. Longitud de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras representan la media \pm EE, letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías, y test a posteriori DGC ($n=5$).



Fig. 40. Morfología de plántulas regadas con soluciones Control a) y d), M1 b) y M2 c) y e)

8.2. Peso fresco de parte aérea y radical

La combinación hormonal M2 incrementó el peso fresco aéreo en plántulas sin inocular, respecto plántulas regadas con HOA, aunque dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa. En raíz M2 produjo un efecto inverso al observado en tallo, reduciendo el peso fresco, respecto a las plántulas regadas con HOA (Fig. 41).

El peso fresco aéreo de las plántulas regadas con HOA e inoculadas con las tres cepas bacterianas no se vio modificado significativamente. Asimismo, el peso fresco radical de las mismas plántulas superó levemente al peso fresco de las raíces de las plántulas control (Fig. 41a).

En las plántulas regadas con M1 las inoculaciones produjeron un incremento no significativo en parte aérea respecto a las plántulas no inoculadas. En raíz el tratamiento con SF4 aumentó levemente el parámetro medido aunque dicho aumento resultó no significativo (Fig. 41b).

Las plántulas regadas con M2 e inoculadas con SF4 incrementaron levemente el peso fresco de parte aérea. El peso fresco de raíz de las plántulas regadas con M2 no se modificó por ninguna de las inoculaciones (Fig. 41c).

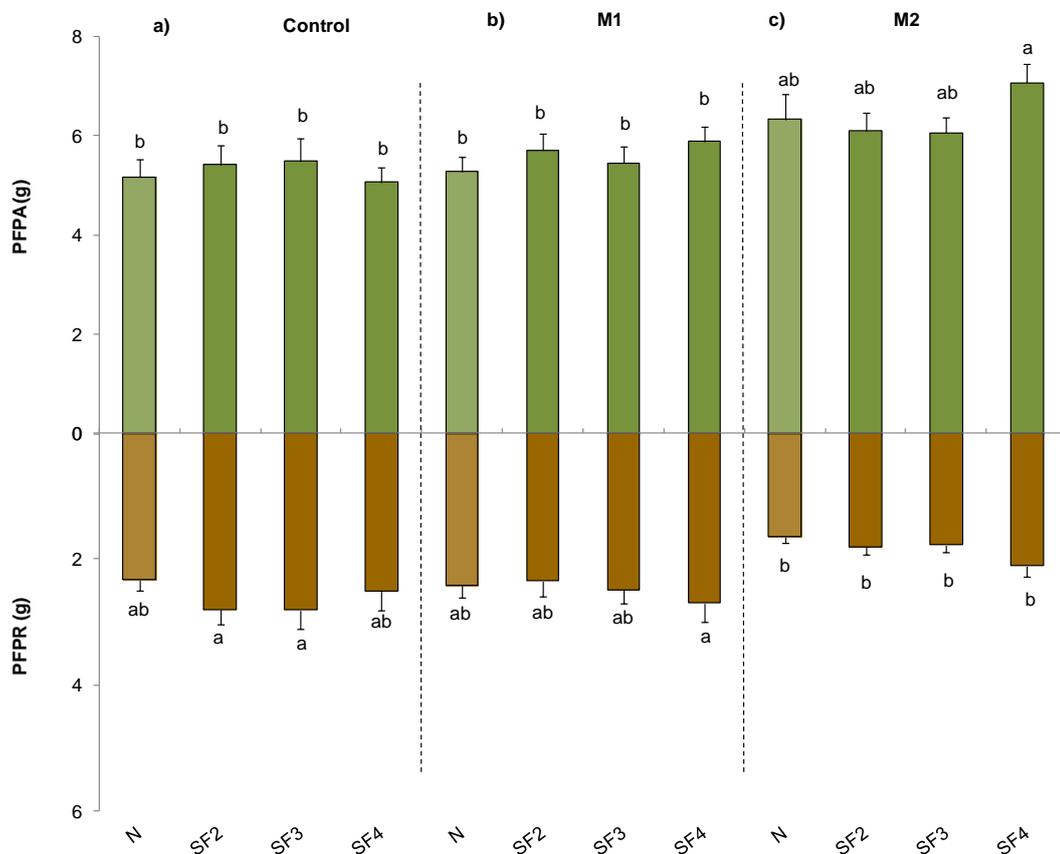


Fig. 41. Peso fresco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras representan la media \pm EE, letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías, y test a posteriori DGC ($n=5$).

8.3 Peso seco de parte aérea y radical

La combinación hormonal M1, no produjo diferencias en los valores de los parámetros medidos respecto de las plántulas control. Mientras que el riego con M2 incrementó levemente el peso seco de la parte aérea de las plántulas y disminuyó el peso radical (Fig. 42), lo que provocó una disminución a la mitad, de la relación peso seco radical/peso seco parte aérea (R/A) respecto a la de las plántulas regadas con HOA (Fig. 43).

En las plántulas regadas con HOA los tratamientos bacterianos con SF2 y SF3, incrementaron levemente el peso seco del tallo y de la raíz (Fig. 42a). Si bien las diferencias encontradas no fueron significativas, incrementaron la relación R/A (Fig. 43), implicando una mejora en el crecimiento de la plántula.

Las plántulas regadas con M1 e inoculadas modificaron levemente el peso seco aéreo, respecto de las plántulas sin inocular. En raíz las inoculaciones con SF3 y SF4 incrementaron el peso seco, respecto del peso seco radical de plántulas sin inocular, aunque las diferencias encontradas resultaron no significativas (Fig. 42b). Estas pequeñas diferencias no modificaron de manera relevante la relación R/A (Fig. 43).

Las plántulas regadas con M2 e inoculadas no presentaron diferencias en el peso seco del tallo respecto del control sin inocular. En raíz, los tres tratamientos bacterianos incrementaron, aunque no significativamente, el peso seco (Fig. 42c). Si bien no se observaron incrementos respecto a las plántulas control, si fue modificada la relación R/A (Fig. 43).

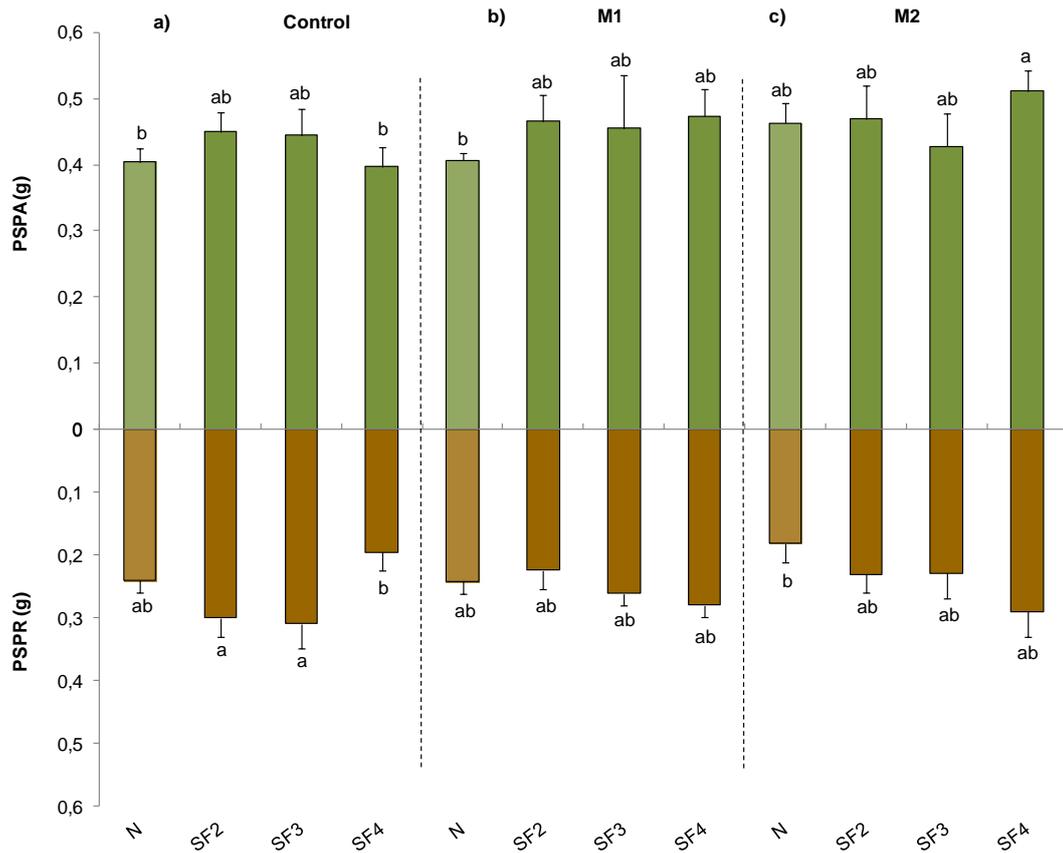


Fig. 42. Peso seco de parte aérea y radical de plántulas de girasol regadas con las soluciones Control a), M1 b) y M2 c). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4. Las barras representan la media \pm EE, letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$ para ANOVA de dos vías, y test a posteriori DGC ($n=5$).

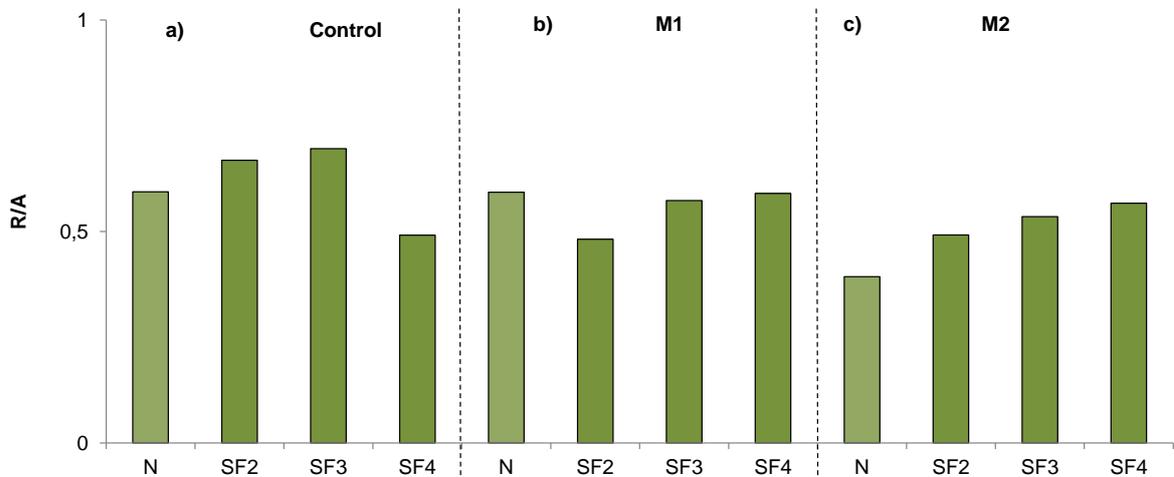


Fig. 43. Relación peso seco de parte radical y aérea (R/A) de plántulas girasol inoculadas y no inoculadas, regadas con soluciones Control a), M1 b) y M2 c). N: plántulas sin inocular; SF2: plántulas inoculadas con SF2; SF3: plántulas inoculadas con SF3; SF4: plántulas inoculadas con SF4.

Discusión

El uso de inoculantes en la actualidad aun es moderado, aunque cada vez son más los agricultores que las utilizan debido a las ventajas que se observan en los cultivos tratados, entre las que se destacan aumento de la productividad (Lugtemberg y Kamilova, 2009), disminución del uso de fertilizantes químicos (Dobbelaere y col., 2001) y de compuestos tóxicos como pesticidas y herbicidas (Myresiotis y col., 2012). Esto hace que los microorganismos sean la mejor elección en la agricultura ya que son altamente compatibles con el entorno, son amigables con el medio ambiente, y reducen los costos de los procesos previos a la cosecha.

Las bacterias utilizadas en este trabajo, por sus características PGPB, podrían constituir parte de un inoculante específico para el cultivo de girasol. Se sabe que la formulación elegida en un inoculante biológico determina, en parte, el éxito del mismo (Fages, 1992). Hedge (2002) y más tarde Vendan y Thangaraju (2006) demostraron que el desarrollo de la formulación de un inoculante líquido tiene varias ventajas, incluyendo un alto recuento celular, mayor vida durante el almacenamiento, mayor protección contra las agresiones del medio ambiente y mayor eficacia a campo. Estos autores atribuyen los beneficios mencionados a que si los microorganismos forman esporas, dan lugar a células activas después de la aplicación en el campo, lo cual ayuda a aumentar la vida útil del formulado líquido por más de un año. Trabajando con microorganismo no esporuladores, Manikandan y col. (2010) informaron que *P. fluorescens* Pf1 en formulados líquidos mostraron mejor resultado que otros soportes, cuando inocularon plantas de tomate. Asimismo, algunos factores importantes que contribuyen a la complejidad de la respuesta de las plantas a los efectos de la inoculación no es solo el inoculante aplicado, sino también la variedad o el cultivar utilizado, las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo y las interacciones, sinérgicas y antagónicas entre suelo, inoculante y cultivar (Pedraza y col. 2010).

En el presente estudio, cuando se analizó la viabilidad de las bacterias individuales, las cepas *Achromobacter xylosoxidans* (SF2) y *Bacillus pumilus* (SF3) crecen en número adecuado en el medio de cultivo LB a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. Por su parte, la cepa de *Bacillus pumilus*, SF4, creció adecuadamente en los medios OM y GY, si bien su desarrollo en el medio LB indicó que los recuentos estuvieron dentro de los valores exigidos. El medio LB es de origen biológico, tanto la tripteína bacteriológica como el extracto de levadura presentes en él, proporcionan a los microorganismos en desarrollo, aminoácidos y bioelementos derivados de proteínas tales como C, N, S y P, fundamentales para la síntesis de nuevas biomoléculas, vitaminas (principalmente del complejo B) y

carbohidratos, también importantes para síntesis de nuevos compuestos y desarrollo microbiano. Además, el cloruro de sodio que contiene en este medio, ayuda a mantener el equilibrio osmótico, esencial para el desarrollo de las bacterias. Los medios GY y OM, proporcionan diversas fuentes de los bioelementos fundamentales para el desarrollo de los microorganismos, aunque quizás en este ensayo las proporciones resultaron poco favorables, principalmente para las cepas SF2 y SF3, que mostraron recuentos por debajo de los obtenidos con LB. Nuestros hallazgos sugieren que el crecimiento diferencial de las cepas nativas de girasol está ligado a la preferencia por las fuentes de nutrientes de los medios de cultivos utilizados, lo cual resultaría de guía al momento de formular un soporte adecuado. Aunque cabe destacar que el primero (LB) es económico y sencillo de preparar, lo cual al momento de utilizarlo como soporte resulta prometedor. Además, como ya se mencionó, en dicho medio el crecimiento microbiano es adecuado, incluso cuando existe la combinación bacteriana.

En concordancia con nuestros resultados, estudios realizados por Manikandan y col. (2010) mostraron que la cepa *P. fluorescens* Pf1 presentó alta viabilidad en medio de cultivo líquido, luego de 150 días de almacenamiento.

El crecimiento en co-inóculo mostró que las cepas SF2 y SF4 incrementaron su viabilidad mientras que la cepa SF3 disminuía. Aunque en los ensayos de laboratorio realizados en el presente trabajo no se pudieron tener en cuenta todas las interacciones que ocurren en el ambiente de donde fueron aisladas las bacterias, el hecho de que los microorganismos combinados se mantengan viables y en número elevado durante el periodo de almacenamiento es algo esperado, ya que las cepas provienen de una misma comunidad microbiana, en la cual conviven e interactúan, no solo entre sí sino también con el entorno. Lo anterior sugiere que estas bacterias aisladas de las raíces de girasol, realizan intercambios de nutrientes, remoción y/o estimulación y liberación de reguladores del crecimiento o la combinación de dichos efectos, ayudándose entre sí para sobrevivir en la rizósfera. Estos resultados indican que las bacterias estudiadas podrían utilizarse como inoculantes para girasol de manera conjunta y en medio líquido; lo mejoraría su aplicación a campo, resultando además económico y fácil de aplicar para el agricultor.

Estudios realizados por Chowdappa y col. (2013) mostraron que *B. subtilis* OTPB1 produce AIA y GA₃, incrementando el contenido de estas hormonas en 86.42% y 82.02%, respectivamente, en comparación con los caldos nutritivo y dextrosa, sin inocular. Actualmente, Camelo-Rusinque y col. (2017) reportaron también, la producción de indoles

en fermentaciones discontinuas de *A. chroococcum*, sugiriendo, estos hallazgos, que dichos microorganismos son prometedores en la formulación de un biofertilizante líquido, apartir de que los compuestos microbianos quedarían disponibles para que la planta pueda utilizarlos mejorando su desarrollo y crecimiento. La producción de hormonas por los microorganismos en el presente estudio, en los tres medios de cultivo utilizados, sugieren que la mayoría de las hormonas cuantificadas (ABA, JA y AIA), se mantienen a un nivel estable cuando las bacterias se cultivan en el medio LB; mientras que el medio OM es en el que se observa mayor producción de SA. La producción de hormonas puede estar influenciada por las condiciones de crecimiento de los microorganismos y el medio de cultivo, las especies o cepas bacterias, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustratos (Arshad y Frankenberger, 1991). Además, se ha visto que las bacterias pueden recurrir a diferentes vías de biosíntesis y que una cepa bacteriana puede utilizar más de una vía de síntesis para obtener un determinado producto, según sean las condiciones en las que se encuentre (Patten y Glick, 1996, 2002).

Las interacciones beneficiosas entre bacterias y plantas aceleran la germinación de semillas, promueven el crecimiento, aumentan los rendimientos de los cultivos y la producción de metabolitos secundarios, aumentando así el éxito reproductivo. Más recientemente, a las interacciones planta-microorganismo se les ha atribuido un aumento de la tolerancia al estrés biótico y abiótico, incluida la resistencia a enfermedades de las plantas y tolerancia a la sal y la sequía (van Hulten y col., 2006; Zhang 2010; Ashrf 2010; Hayat y col., 2010; Marques y col., 2010; Rudrappa y col., 2010; Medeiros y col., 2011; Cappellari y col., 2013; Diagne y col., 2013).

Si bien las poblaciones de bacterias nativas en el suelo interactúan entre ellas, lo que puede resultar en una competencia, también pueden facilitar el establecimiento de los consorcios bacterianos por inoculación, mejorando la fertilidad del suelo a través de la regulación de los ciclos biogeoquímicos e influyendo en la cinética de afluencia de nutrientes y agua, en el incremento de elementos químicos disponibles y en la activación o inhibición de enzimas microbianas y de procesos de degradación (Hipólito-Romero y col., 2017). Es por ello que la inoculación con cepas nativas, y más aún la co-inoculación, se han propuesto como una nueva herramienta que busca mejorar las condiciones de los cultivos y su adaptación a ambientes desfavorables. En el caso de la co-inoculación, procura combinar características intrínsecas de cada cepa bacteriana, para potenciar los mecanismos de

promoción de crecimiento en plántulas. Raupach y Kloepper (1998) reportaron que la co-inoculación de semillas de pepinos con *B. pumilus*, *B. subtilis* y *Curtobacterium flaccumfaciens* mejora la promoción del crecimiento y reduce las enfermedades. Figueiredo y col. (2008) reportaron resultados similares cuando co-inocularon frijol con *Rhizobium* sp. y dos cepas de *Paenibacillus polymyxa*. Estos autores incluso observaron mayor crecimiento de plantas y de nodulación en comparación a la inoculación con cepas individuales. Yuming y col. (2003) demostraron que la co-inoculación de soja con *Bacillus* sp. y *Bradyrhizobium japonicum* aumenta la fijación de nitrógeno y el número y peso de nódulos. Más recientemente Hungria y col. (2015), realizaron ensayos de co-inoculación de soja con *Bradyrhizobium* spp. y *Azospirillum brasilense*, y demostraron que dicho tratamiento es eficiente y benéfico para el cultivo, ya que incrementa el rendimiento del mismo, incluso sin añadir fertilizantes químicos. Por su parte, Stajković-Srbinović y col. (2014) reportaron efectos benéficos de la aplicación de bacterias individuales y combinadas en avena y cebada, aunque los resultados que obtuvieron no son iguales en los diferentes tratamientos y especies vegetales ensayadas. En nuestro caso, además permitiría brindar una respuesta estable a diferentes contenidos hídricos del suelo a partir de los resultados observados en SF2 y SF4.

En el presente trabajo de tesis se observó variación en los parámetros de crecimiento de las plantas de girasol tratadas con las bacterias. Por ejemplo aumento del diámetro del tallo en las plántulas inoculadas con SF2 y co-inoculadas con SF2/SF3 en condiciones control. Estos resultados coinciden con los reportados por Aditya y col. (2009), quienes observaron un aumento significativo del mismo parámetro co-inoculando *Chukrasia tubularis* con *Bacillus megaterium* y *Azotobacter* sp. Respecto a la longitud del tallo de las plantas de girasol, los tratamientos de inoculación y co-inoculación tuvieron un efecto mínimo sobre este parámetro. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Desai y col. (2007), cuando inocularon *Jatropha curcas* L. (piñón) con una cepa de *B. pumilus*, y con Cassán y col. (2009) en plantas de soja y maíz inoculadas y co-inoculadas con *A. brasilense* Az39 y *B. japonicum* E109. Han y col. (2014) publicaron que *Bacillus subtilis* GB03 mejoró la longitud del tallo como la de la raíz de plantas de *Trifolium repens* L. cultivar Huia, tanto en condiciones control como de estrés salino. En girasol, resultados similares se reflejaron en las plantas crecidas en sustrato sólido, mientras que en sustrato líquido solamente hubo un leve incremento en la longitud aérea de las plantas inoculadas. Hipólito-Romero y col. (2017) inoculando cultivares de cacao con suspensiones de consorcios bacterianos, observaron resultados similares, es decir incrementos en la longitud

de los tallos, del número de ramas y de hojas en las plantas inoculadas, estos hechos concuerdan con lo mencionado anteriormente por otros autores y con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En condiciones control, el incremento del peso de parte aérea, en las plántulas de girasol co-inoculadas con las tres combinaciones bacterianas coincide con los ensayos realizados por Bai y col. (2003), quienes señalaron también un incremento en el peso de parte aérea cuando co-inocularon soja con cepas de *Bacillus* sp. y *Bradyrhizobium* sp. Previamente, Pereira y col. (1988) trabajando con *Sorghum vulgare* (sorgo) y *Oryza sativa* (arroz) y más tarde, Ma y col. (2009) en *Brassica juncea* (mostaza parda), demostraron que la inoculación con *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum seropedicae* y *A. xylooxidans* respectivamente, incrementó el desarrollo de la parte aérea, hecho que se reflejó en un mayor peso fresco y seco. Asimismo la co-inoculación con *Azotobacter chroococcum* y *Mesorhizobium ciceri*, aumentó significativamente la producción de granos y biomasa en *Cicer arietinum* L., comparados con las plantas inoculadas con las cepas por separado (Qureshi y col., 2009).

Malhotra y Srivastava (2009) propusieron que la inoculación de las semillas de varias especies vegetales con *Azospirillum brasilense* SM produce cambios en diferentes parámetros de crecimiento; en este sentido, la longitud radical y el número de raíces laterales de sorgo y judías, y la longitud del tallo en judías se incrementó luego de 2 semanas del tratamiento de las semillas con *A. brasilense* SM. Asimismo, la inoculación de sorgo con *A. brasilense* SM aumentó el peso seco total de plantas luego de 2, 10 y 16 semanas del tratamiento. En concordancia, nosotros observamos incremento del peso seco del tallo en plántulas crecidas en condiciones control e inoculadas con SF2 y co-inoculadas con las tres combinaciones bacterianas. Las variaciones observadas en el crecimiento de las diferentes especies vegetales, frente a las inoculaciones bacterianas, mostradas en los estudios mencionados e incluso en el presente, dependen de la especie vegetal, el estadio de crecimiento, el sustrato de crecimiento y de la/s cepa/s utilizada/s para la inoculación. Del mismo modo Stajković-Srbinović y col. (2016) reportaron los efectos benéficos de la co-inoculación con *Azotobacter chroococcum* A2 y *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas* sp. o *Bacillus megaterium*, y *A. chroococcum* A5 con *S. meliloti*. Sus resultados mostraron aumento en el peso seco y en el contenido de N, P y K, en plantas de *Dactylis glomerata* L. y *Festuca pratensis* Huds. Los mismos autores coinciden en que es difícil conectar la influencia positiva de las bacterias particulares, aplicadas en co-inóculos, debido a los

diversos mecanismos promotores del crecimiento que las mismas presentan *in vitro*. Aunque, como ya se mencionó, la presencia de características promotoras del crecimiento en una cepa bacteriana no garantiza la real promoción del crecimiento vegetal, si no que se deben tenerse en cuenta los demás factores asociados.

Todos estos hallazgos indicarían que la co-inoculación es la mejor manera de promover el crecimiento de los vegetales, debido a que existe, muchas veces, un sinergismo entre los microorganismos aplicados, que favorece la promoción del crecimiento y la respuesta de las plantas incluso frente a diferentes tipos de estrés.

Las plantas se adaptan al estrés, por ejemplo, a la sequía, minimizando la pérdida de agua y aumentando la captación de agua. Esto lo logra por ejemplo reduciendo el número de hojas y su área, y/o aumentando el crecimiento radical (Naderifar Alves y Setter, 2004; Poorter y col., 2009). El estrés por sequía también reduce la tasa de respiración (Bryla y col., 2001; Rizhsky y col., 2002). Actualmente nuestros suelos están sujetos a estrés no solo por sequía sino también por calor, salinidad, frío, inundaciones, microorganismos patógenos que causan enfermedades (Porter y col., 2014), incluso la combinación de ellos (Pandey y col., 2015). Bajo este escenario de cambio climático, se prevé que los rendimientos de los cultivos disminuyan tanto en zonas tropicales como en zonas templadas (Challinor y col., 2014), y que bajo condiciones de estrés las distintas especies vegetales intenten adaptarse para tolerar, sobrevivir y crecer en ambientes adversos.

En el presente estudio se midió el contenido relativo de agua (CRA) de las hojas, considerando que el mismo es un indicador del potencial hídrico de la planta. Una disminución en el CRA refleja una pérdida de turgencia que resulta en expansión celular limitada con la consiguiente reducción del crecimiento de las plantas (Ashraf, 2010; Lu y col., 2010). En estrés hídrico, el análisis *in vitro* del CRA en girasol, mostró una disminución del mismo, por lo tanto, la disminución del área foliar y del peso seco observada en este estudio puede atribuirse en parte a la reducción del CRA mencionado. También se observó que las plántulas crecidas bajo estrés, en sustrato sólido, mostraron mayor desarrollo del sistema radical, lo que indica un mecanismo de adaptación en respuesta a sequía, ya que la disminución de la parte aérea disminuye la pérdida de agua y el aumento de masa radical favorece a la toma de la misma (Pandey y col., 2015).

Distintas especies de plantas responden diferencialmente al estrés hídrico. Un prolífico sistema radical puede promover el crecimiento del cultivo durante estadios tempranos y extraer agua del suelo que de otra manera se perdería por evaporación de las

capas superficiales (Johansen y col., 1992). El peso seco, es un parámetro que representa la producción de biomasa de una planta, que puede ser modificado por la condición de estrés y por la inoculación con bacterias PGPB. La reducción del peso seco del tallo observada en las plántulas de girasol bajo condiciones de estrés hídrico, en sustrato sólido y líquido, concuerda con los hallazgos de Figueiredo y col. (2008), en poroto bajo tres niveles de estrés hídrico. Asimismo, en el presente estudio se observó un mayor peso seco de la raíz en las plántulas estresadas en sustrato sólido, lo cual concuerda con lo previamente reportado en girasol por Tahir y col. (2002) y en *Catharanthus roseus* por Jaleel y col. (2008). De manera similar, *Phoenix dactylifera* NHH respondió al estrés hídrico incrementando la longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y peso seco de raíz (Sané y col., 2005); por el contrario Andrade y col. (2017) reportaron que en líneas de girasol tolerantes al estrés se produce una disminución de la longitud de la raíz primaria debido a las condiciones de estrés. En el presente trabajo se observó que los tratamientos bacterianos aplicados a las plántulas de girasol en condiciones de estrés mejoran el CRA en las hojas de dichas plántulas (Castillo y col., 2013). Esto se debería a que las plántulas con mayor masa de pelos radiculares aumentan la capacidad de absorción de nutrientes y agua, y por consecuencia presentan un mejor desarrollo durante su ciclo de cultivo (Dufault, 1998). Las estrategias claves de adaptación que emplean las plantas para sobrevivir a la sequía también se han informado como algunas de las utilizadas por las bacterias del suelo para resistir el estrés. Por ejemplo, muchos de los solutos compatibles que ayudan a las bacterias a sobrellevar el estrés por sequía también ayudan a las plantas a tolerarlo (Ngumbi y Kloepper, 2016).

Asimismo, en este estudio se observó que la inoculación y co-inoculación promueven la elongación radical en condiciones de estrés hídrico. En concordancia, Díaz Vargas y col. (2001) realizaron ensayos de inoculación con *Beijerinckia indica*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, y *P. fluorescens*, en *Lactuca sativa* L. variedad Longifolia (lechuga), encontrando resultados similares a los observados en girasol. Este hecho podría indicar que en ambientes desfavorables las bacterias incrementan la capacidad de exploración de agua y de absorción de nutrientes por parte de la planta, apoyando lo propuesto previamente por Kloepper (1993), Glick (1995) y Forchetti y col. (2010). Kloepper y col. (1991) mencionaron que las bacterias promotoras del crecimiento se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo que afectaría directamente el crecimiento de la parte aérea y el rendimiento del cultivo. Así Naderifar y Daneshian (2012), trabajando con canola (*Brassica napus* L.) observaron que cepas de *Azotobacter* tienen múltiples funciones para el crecimiento de las plantas, que

pueden derivar tanto de su fijación de nitrógeno como del efecto estimulante sobre el desarrollo de las raíces. Al mismo tiempo, Dodd y Pérez-Alfocea (2012) reportaron que otros mecanismos de promoción de crecimiento de las plantas por rizobacterias, tales como la producción de fitohormonas, la fijación de N, y la absorción de minerales, pueden contribuir a mejorar la adaptación de las plantas inoculadas al déficit de agua.

El aumento observado en el peso seco de las plántulas de girasol inoculadas con las cepas SF2 y SF3 en condiciones de estrés, en sustrato sólido, y en menor medida en el líquido, sugiere un posible sinergismo entre la planta hospedante y los microorganismos, lo que permitiría mejorar la absorción de elementos esenciales como N y P. Estos elementos junto con las fitohormonas provocan mayor desarrollo de la parte aérea del cultivo (Arshad y Frankenberger, 1991; Forchetti y col., 2007). Más recientemente Han y col. 2014 establecieron también que la inoculación con *Bacillus subtilis* GB03 aumenta significativamente el crecimiento de la biomasa vegetal del trébol blanco incluso en condiciones de estrés salino.

Así los efectos negativos que se observa en las diferentes especies vegetales, como por ejemplo disminución del peso seco, debido al estrés, pueden mitigarse con la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento. En nuestros ensayos, la aplicación de las cepas bacterias SF2, SF3 y SF4 sobre plantas de girasol crecidas en estrés hídrico, incrementaron el peso seco de las raíces y la parte aérea, lo cual demuestra el efecto promotor del crecimiento, aun en un sustrato hidropónico. Aunque no todos los trabajos han reportado una correlación entre la producción de 1-ácido carboxílico amino ciclo propano-desaminasa (ACC-d) y la tolerancia al estrés por sequía, las cepas mencionadas contienen ACC-d, que probablemente se genera a través de la estimulación de la producción de etileno (ET) inducida por el estrés (Glick y col., 2007; Belimov y col., 2009). El ET actúa como un inhibidor del crecimiento y de este modo la disminución de los niveles de ACC en plantas, debido a la presencia de ACC-d de las rizobacterias, causa disminución de esta hormona, aumentando así el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés hídrico (Arshad y col., 2008; Belimov y col., 2009). Del mismo modo Lim y Kim (2013) demostraron que las plantas de pimienta (*Piper nigrum*) tratadas con *Bacillus licheniformis* K11 toleraron el estrés por sequía y mejoraron su supervivencia en comparación con las plantas no tratadas con bacterias.

AIA es una hormona vegetal involucrada en la división celular, senescencia foliar, movilización de nutrientes, dominancia apical, diferenciación de cloroplastos y mejora el

sistema radical por promoción del desarrollo de las raíces laterales y división celular en el meristema apical, dando lugar al alargamiento de la raíz (Sakakibara, 2010). La producción de auxinas es también una función bacteriana generalizada ya que el 80% de las especies dentro de ciertos géneros de rizobacterias las producen (Ahmad y col., 2008) y afectan el desarrollo de la planta a las que se asocian incrementando por ejemplo el crecimiento radical y el número de pelos y raíces laterales (Dimkpa y col., 2009). La inoculación simple y la co-inoculación de soja y maíz con *A. brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109 incrementa la longitud del tallo y el peso seco de parte aérea y radical a través de la producción de AIA y GA₃ (Cassán y col., 2009). Patten y Glick, (1996) y posteriormente Van Loon, (2007), Malhotra y Srivastava (2009) y más tarde Contesto y col., (2010), propusieron que el AIA producido por bacterias del suelo, puede incrementar significativamente la tasa de crecimiento de las raíces de las plantas, por lo que en condiciones de estrés hídrico se favorecería la elongación de las raíces para la exploración de horizontes con mayor disponibilidad de agua. En el presente estudio, las plántulas de girasol inoculadas con SF3 y SF4 y las co-inoculadas crecidas en condiciones control, incrementaron el contenido de AIA en tallos. Este incremento se vio reflejado en el aumento del peso seco del tallo de las plántulas co-inoculadas, aunque no en las inoculadas, sugiriendo nuevamente que la co-inoculación produce un efecto sinérgico. Spaepen y col. (2008) también reportaron que la producción de AIA bacteriana por *A. brasilense* SP245, genera un aumento del 10% en el peso seco del tallo de plantas de trigo, en comparación con plantas sin la aplicación bacteriana. Posteriormente Cassán y col. (2009) informaron que la inoculación individual y la co-inoculación de soja y maíz con *A. brasilense* Az39 y *Bradyrhizobium japonicum* E109 causaron un aumento significativo de la longitud y peso seco del tallo y la raíz, y atribuyeron dicho incremento a la producción bacteriana de AIA y de GA₃.

En el presente estudio, las plántulas de girasol bajo condiciones de estrés, respondieron diferencialmente a la inoculación y a la co-inoculación. En plántulas inoculadas con SF2 y SF3, el peso seco del tallo mostró un leve incremento; aunque el contenido de AIA no se modificó. El contenido de esta hormona en las plántulas co-inoculadas con SF2/SF3 y SF2/SF4 se reflejó en un leve aumento del peso seco del tallo. Además, las plántulas co-inoculadas con SF2/SF4 aumentaron el peso seco radical y el contenido de AIA, aunque las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas. En concordancia, Marulanda y col. (2009) observaron que plantas de *Trifolium repens*

inoculadas con *P. putida*, *B. megaterium*, y otras *Pseudomonas* sp, incrementaron el peso seco del tallo en todos los tratamientos, y en algunos tratamientos el peso seco radical. Estos autores reportaron que estas dos especies bacterianas pueden producir AIA en condiciones de estrés. La habilidad de ciertos microorganismos de producir AIA en condiciones de estrés podría explicar la efectividad en la promoción del crecimiento e incrementar la tolerancia a estrés por sequía de algunas plantas. En el presente estudio, se encontró una correlación positiva, aunque no significativa, entre el contenido de AIA y el crecimiento de plántulas de girasol, principalmente en aquellas tratadas con las combinaciones bacterianas. Asimismo, aún no está claro si los efectos de estas bacterias sobre el crecimiento de las plantas son debido a la modificación en la señalización de AIA tal como lo propusieron Dodd y col. (2010).

SA está relacionado no solo a la respuesta a patógenos biotrófos y hemibiotrófos, sino también al estrés abiótico. La inmunidad vegetal se basa en una compleja red de vías de señalización hormonal en la que el SA y el JA juegan un rol central (Gimenez-Ibañez y col., 2013) y, aunque existe evidencias en la mayoría de los caso estudiados de la relación antagónica entre ambos metabolitos, la misma no siempre se lleva a cabo de esa manera (Yamada y col., 2012; Tamaoki y col., 2013). En el presente estudio realizado con plantas de girasol, las condiciones de crecimiento y tratamientos bacterianos aplicados, causaron cambios notables en el contenido de SA. La inoculación con SF3 en las plántulas control incrementó el contenido de SA en raíz, lo cual podría deberse en parte a la habilidad de éstas bacterias de sintetizar la hormona en condiciones control y de estrés (Forchetti y col., 2010). La relación entre el incremento de SA y la disminución de JA observada en las plantas de girasol crecidas en estrés abiótico, podría, por una parte, poner de manifiesto el antagonismo mencionado anteriormente. Asimismo, el incremento de SA en las plantas estresadas y tratadas con las bacterias individuales podría deberse también a que la planta activa su sistema de defensa frente a estos microorganismos, sin llegar a eliminarlos, quedando alerta ante un posible ataque por patógenos biotrofos. Mientras que la combinación bacteriana, aplicada a las mismas plantas, incrementa el contenido de JA, lo cual implicaría un estado de alerta ante microorganismos necrotrofos. Por ello, esta respuesta diferente frente a las inoculaciones y co-inoculaciones confirmaría la respuesta antagónica de las hormonas en girasol. También se observó que el contenido de SA en tallo de plántulas de girasol en estrés fue más elevado que en raíces. SA se sintetiza a través de dos vías distintas, dependiendo de la especie de la planta: la vía isocorismato (IC) y la vía fenilalanina (Phe) (Dempsey y col.,

2011). Ambas vías se originan de corismato (Lee y col., 1995; Ribnicky y col., 1998) y tienen como enzimas principales isocorismato sintasa (ICS) y fenilalanina amonio liasa (PAL) (Catinot y col., 2008; Uppalapati y col., 2007). Klambt (1962) propuso que en girasol SA es sintetizado a partir de benzoato, el cual se origina a través de la vía PAL; mientras que la vía ICS es responsable de la síntesis de >95% de las especies de plantas (Catinot y col., 2008; Garcion y col., 2008; Chen y col., 2009). La localización de la enzima ICS en cloroplastos (Garcion y col., 2008), explicaría el alto contenido de SA en tallos de las plántulas de girasol respecto de raíces. Asimismo, el elevado contenido de SA en tallos de plántulas de girasol descrito en el presente trabajo, sugeriría que en esta especie la síntesis de la hormona se realizaría a través de la vía ICS, más que por la vía PAL. Otra posible explicación sería que el SA recircule entre tallo y raíz, como fue reportado por Jiang y col. (2012) para ABA en *P. sativum*.

SA es un compuesto fundamental en la respuesta al estrés e interviene en las redes de señalización que se ponen en marcha en dicha situaciones (Horváth y col., 2007; Khan y Khan, 2013). En girasol el contenido de SA en plántulas estresadas, resultó 3 veces superior al de plántulas control, lo cual sugiere que el contenido de esta hormona está directamente relacionado a las respuestas a estrés abiótico, particularmente al estrés hídrico. De manera similar Munne-Bosch y Peñuelas (2003) en *Pisctacea lentiscus*, Chini y col. (2004) en *Arabidopsis*, y Bandurska y Stroinski (2005) en cebada obtuvieron resultados que apoyan estas conclusiones.

Por otra parte, estudios previos mostraron que raíces de plantas vasculares crecidas bajo condiciones de estrés hídrico, sintetizan ABA (Parry y Horgan, 1991; Parry y col., 1992) y que esta hormona funciona como una molécula señal desde la raíz al tallo (Milborrow, 2001; Hartung y col., 2002), incrementándose los niveles endógenos en los distintos órganos de la planta. En girasol, como en otras especies, este aumento podría relacionarse igualmente con el contenido de agua en el suelo (Gomes y col., 2004). Mas recientemente, Zhang y col. (2012) informaron que la sequía redujo el CRA en hojas y aumentó el contenido de ABA en cultivares de maíz sensibles y tolerantes a sequía. Estos autores sugirieron que ABA endógeno modula el contenido de agua y el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía, a través de la regulación de la conductancia estomática, especialmente en el cultivar sensible. Del mismo modo, en el presente estudio, el CRA disminuyó en plantas bajo condiciones de estrés hídrico, en asociación con un aumento en el contenido de ABA.

Ha sido descrito que distintas especies bacterianas son capaces de producir ABA, en concentraciones suficientes para inducir cambios morfológicos y fisiológicos en los tejidos vegetales y en el contenido de la misma hormona en la planta (Dodd y col., 2010). Boiero y col., (2007) trabajando con *B. japonicum* USDA110, Perrig y col. (2007) inoculando con *A. brasilense* Az39 y *A. brasilense* Cd, y más tarde Cohen y col. (2008) con *A. brasilense* sp. 245, demostraron que estas bacterias producen ABA *in vitro* en condiciones control y de estrés salino. Cohen y col. (2008) observaron que la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* sp 245, causó un aumento del contenido de la hormona 2 veces mayor al de plantas sin inocular. Mas tarde, Cohen y col. (2009) informaron resultados similares cuando inocularon plantas de *Zea mays* con *A. lipoferum* USA59b, lo que indica que la producción de ABA bacteriana puede aumentar las concentraciones de ABA en las plantas.

En girasol las plántulas co-inoculadas con las tres combinaciones bacterianas, crecidas en condiciones control y de estrés hídrico, mostraron elevado contenido de ABA, sugiriendo que el incremento podría deberse a la producción de esta hormona parte de las bacterias. Dicho aumento permitiría que la planta reaccione con mayor rapidez, y/o de forma más eficaz frente a estrés, pudiendo sobrevivir a esta situación por un tiempo más prolongado. La acumulación de ABA representa una respuesta adaptativa que limita la pérdida de agua de la planta mediante la estimulación del cierre de los estomas, por ello las plantas, para optimizar el crecimiento, necesitan regular las concentraciones de ABA dentro de límites estrechos (Taylor et al., 2005). El ABA exudado por las raíces de las plantas a la rizósfera y el producido por los microorganismos, puede influir en las respuestas fisiológicas de las mismas, ya que el ABA suministrado a través del suelo en diferentes dosis, estimularía o limitaría el crecimiento de la planta y alteraría la conductancia de la raíz (Mulholland y col., 1996; Astacio y van Iersel, 2011). En este sentido, en plantas de maíz y trigo inoculadas con *Azospirillum* sp. crecidas en condiciones de estrés, un alto contenido relativo de agua estaría relacionado con la producción de ABA por parte de la bacteria; lo que provocaría el cierre de los estomas, mitigando el estrés por sequía (Casanovas y col., 2002; Creus y col., 2004). De hecho, Dodd y col. (2010) sugirieron que el efecto de la inoculación con bacterias sobre el contenido de agua de la planta se relaciona con la producción de ABA bacteriano y/o con la alteración de la sensibilidad de los procesos fisiológicos tales como el cierre estomático. Más recientemente Belimov y col. (2014) sugirieron que las bacterias en asociación con las raíces pueden utilizar ABA endógeno, disminuyendo así las

concentraciones de ABA en plantas inoculadas, sin embargo, el/los mecanismo/s por el cual los microorganismos intervienen en estos procesos, se desconocen.

Por otra parte, como ya se mencionó, los jasmonatos juegan un rol en la protección de las plantas bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. La participación de JA en las respuestas a estrés abiótico (por ejemplo, sequía y salinidad) ha sido reportada en varias especies (Creelman y Mullet, 1995; Wasternack, 2007). En girasol, se observó que el contenido JA en los tallos de las plántulas estresadas fue menor que en las control. De manera similar, Hamayun y col. (2010) observaron una disminución de JA en hojas de soja bajo estrés por sequía. Asimismo, Aimar y col. (2011), trabajando en *Panicum virgatum* encontraron que el contenido de JA no se modificó ante la condición de estrés. Harb y col. (2010) observaron que en condiciones de sequía moderada, bajos niveles de JA se relacionaron con altos contenidos de ABA en *A. thaliana* durante etapas tempranas del crecimiento, lo cual estimuló respuestas necesarias para la aclimatación a sequía, por ejemplo, cierre estomático y modificaciones en la pared celular. Debido a ello, probablemente no se requiere de una alta concentración de JA en las plantas para que sobrevivan a estrés hídrico y respondan a las condiciones adversas.

Estudios recientes se han abocado al análisis de la interrelación entre vías de transducción de señales de JA y ABA. Así, De Ollas y col. (2012) reportaron una relación clara a nivel de la biosíntesis entre JA y ABA en cítricos. Estos autores encontraron un aumento transitorio en los niveles de JA que precedió a la acumulación de ABA en las raíces, bajo condiciones de estrés por sequía. Resultados similares se obtuvieron en hojas de cítricos crecidos en suelos inundados (Arbona y Gómez-Cadenas 2008), en papaya bajo sequía moderada (Mahouachi y col., 2007) y en *Arabidopsis* en condiciones de sequía severa (Arbona y col., 2010). En cada uno de estos casos, la acumulación JA fue precedida, o se produjo simultáneamente, con el incremento de ABA, lo cual sustenta la idea de una conexión temporal entre la acción de las dos hormonas. De manera similar, en el presente estudio, una baja acumulación de JA ocurrió simultáneamente con un aumento de ABA en tallos de plántulas co-inoculadas en condiciones de estrés. Las diferencias en la acumulación hormonal entre los diversos sistemas experimentales reflejan el efecto de diferentes factores tales como diferentes condiciones de estrés abiótico, material vegetal utilizado, tiempo de crecimiento de las plantas después del tratamiento de estrés y, en el presente estudio, el efecto de la inoculación bacteriana.

Además, JA es conocido por mediar resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas bajo condiciones de estrés biótico. Se ha observado ISR mediada por JA para ciertas cepas no patógenas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Kloepper y col., 2004; Van Loon y Bakker, 2006). Así, es posible considerar la posibilidad de que las bacterias asociadas a girasol puedan inducir ISR a través jasmonatos con actividad biológica, tales como JA-ILe (Katsir y col., 2008; Fonseca y col., 2009; Howe, 2010).

En este estudio la relación entre hormonas se modificó dependiendo de las condiciones de crecimiento y los tratamientos bacterianos. El perfil hormonal se alteró notablemente cuando las plántulas fueron co-inoculadas. Las co-inoculaciones en plántulas estresadas convirtió la relación de SA: otras hormonas en ~ 50:50, y el contenido de ABA y AIA se incrementó más que en las plántulas sin inocular. En las plántulas estresadas y co-inoculadas SA representó alrededor de un 70% de las hormonas totales y el 30% restante lo conformaron principalmente ABA y AIA.

Si bien estudios recientes han proporcionado nuevos conocimientos sobre la interacción entre muchas de las hormonas vegetales (Dombrecht y col., 2007; An y Mou, 2011; Sun y col., 2011; Chen y col., 2011; Khan y col., 2012; Heinrich y col., 2013; Chini y col., 2016; Wani y col., 2016; Liu y col., 2016), el alto contenido de SA observado principalmente en plántulas de girasol en condiciones de estrés indica un destacado rol de esta fitohormona en la respuesta al estrés abiótico.

El conocimiento logrado hasta el presente sobre las hormonas vegetales es lo que ha orientado a la industria agroquímica a desarrollar formulaciones a base de compuestos hormonales naturales o sintéticos, llamados biorreguladores, para aplicarlos a las plantas en pequeñas concentraciones, y manipular sus procesos y eventos fisiológicos, ya sea promoviéndolos, inhibiéndolos o modificándolos (Camargo y col., 2009).

La aplicación de biofertilizantes o inoculantes, con agregados de reguladores del crecimiento, se utiliza actualmente para reducir los efectos negativos del estrés y aumentar la germinación, el crecimiento y rendimiento de las plantas. Así, se ha observado que aplicaciones foliares de SA aumentan la biomasa de plantas de soja (Gutiérrez-Coronado y col., 1998) y el rendimiento de trigo (López-Tejeda y col., 1998). Además aumenta la actividad de catalasa y peroxidasa, en tomate (Ortega-Ortiz y col., 2007) y extiende la vida de plátanos luego de la cosecha (Srivastava y Dwivedi, 2000). SA incrementa significativamente el crecimiento de las raíces en soja (Gutiérrez-Coronado y col., 1998) y *Pinus patula* (San Miguel y col., 2003). Por otro lado, aplicaciones de SA (500uM) en *H.*

vulgare incrementaron la asimilación del CO₂ y la conductancia estomática (Habibi, 2012). En maíz la aplicación foliar de SA (1uM) refuerza el sistema de defensa antioxidante del cultivo (Saruhan y col., 2012). En otras especies vegetales por ejemplo, en pino y crisantemo, estudios realizados sobre el uso de diferentes dosis de SA mostraron incrementos en la biomasa radical (San Miguel y col., 2003; Echeverría- Machado y col., 2007; Villanueva-Couoh y col., 2009). Así, es abundante la literatura que indica que el efecto del SA en el crecimiento de las raíces es positivo (Gemes y col., 2008; Ahmad y col., 2013). Aunque el efecto de la aplicación exógena del SA en el crecimiento de las plantas, depende de la especie, la etapa de desarrollo y de la concentración aplicada (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011).

Otros estudios demostraron que la aplicación exógena de GAs en una concentración de 1000 mg L⁻¹, induce un aumento significativo de estróbilos masculinos en *Pinus pinea* L. Además, este regulador incrementa el largo de los brotes apicales, y combinado con bencilaminopurina (BAP) produce un aumento de brotes vegetativos en la misma especie (Venegas-González y col., 2015). Carranza y col. (2016) aplicaron los mismos reguladores del crecimiento, en diferentes concentraciones, sobre semillas de *Passiflora quadrangularis* L. y reportaron aumentos en el porcentaje de germinación y disminución del tiempo en el que ocurre dicho proceso, en las semillas a las que se les aplicó GA₃ (1200 ppm). Por el contrario, Amador-Alfárez y col. (2013) realizaron ensayos de aplicación de GA y AIA, en diferentes concentraciones, sobre semillas de dos especies de *Ferocactus*, demostrando que la aplicación de los reguladores no modifica significativamente el porcentaje ni el tiempo de germinación.

Por otra parte el tratamiento con auxinas es una práctica muy frecuente entre los productores hortícolas, siendo la respuesta del cultivo dependiente del genotipo, las condiciones ambientales imperantes durante el ciclo del cultivo, zona de producción, las dosis del regulador aplicado y momento y forma de aplicación (Martinez y col. 2015). Incluso, en la actualidad, se realizan aplicaciones exógenas de AIA, GAs y MeJA, en cultivos de *Glycyrrhiza uralensis*, destinados a la farmacología, con el fin de aumentar la producción de ácido glycyrrhizico, el cual es utilizado para tratar distintas patologías en seres humanos (Li y col., 2016).

También en nuestro país, Batistella y col. (2013) reportaron que la aplicación exógena de ABA en diferentes variedades de vides, mejora el color de las uvas. Aunque estos autores sugieren que es necesario seguir trabajando con diferentes productos, momentos de

aplicación, dosis y variedades, ya que son factores que impactan en forma decisiva en los resultados obtenidos. Por otro lado en trigo la aplicación foliar de GA3, AIA y ABA por separado, en diferentes variedades, modifica el rendimiento en condiciones de invernadero (Cai y col., 2014).

En girasol la aplicación de los reguladores del crecimiento se efectuó a través del riego por capilaridad, lo que implica una mejor disponibilidad para la planta y la rizósfera de las hormonas provistas. Asimismo, la aplicación de SA no produjo el efecto promotor del crecimiento radical citado por otros autores en diferentes especies, probablemente debido a que las concentraciones aplicadas fueron distintas y la especie y condiciones de crecimiento también. En cambio, las aplicaciones de JA, AIA y ABA si produjeron una respuesta positiva, aumento de peso seco de las raíces y por consiguiente en la relación R/A, principalmente cuando se aplicaron de manera individual, que concuerda con algunos de los resultados reportado por otros autores.

Es sabido que la producción de biomasa vegetal es producto fundamentalmente de la biomasa de la parte aérea aunque hay relativamente poca información sobre la biomasa de las raíces. Las raíces absorben el agua y los nutrientes del suelo y sustentan el crecimiento del tallo, cuyo rendimiento depende del crecimiento de la raíz. Por otra parte la relación R/A se utiliza para estimar la biomasa de las raíces (Bollinder y col., 1997, 2002), y ha sido interpretada como un reflejo del uso diferencial de los compuestos de la fotosíntesis entre los órganos superficiales y subterráneos (Titlyanova y col., 1999). Las proporciones R/A pueden variar a causa de múltiples factores como son las condiciones del suelo, la variedad del cultivo, el clima entre las regiones durante los diferentes períodos de crecimiento de los cultivos y factores bióticos (Mokany y col., 2006) aunque esta relación no es siempre directa. Los valores de R/A también varían con la profundidad de la muestra de suelo y edad del cultivo (Sainju y col., 2017), incluso el estrés hídrico puede provocar un mayor desarrollo de las raíces aumentando la profundidad de captación de agua de las mismas, dando como resultado una mayor biomasa radical y por lo tanto una mayor relación R/A (Weaver y Himmel, 1929; Skinner y Comas, 2010; Sainju y col., 2017). Por ejemplo, en árboles la relación R/A se ve muy afectada por la acumulación de biomasa muerta en el tejido leñoso a lo largo del tiempo, y varía entre 0,1-26 (Litton y col., 2003, Mokany y col., 2006); en gramíneas perennes la relación R/A oscila entre 0,57 y 6,25 en Estados Unidos (Mo y col., 1992; Mortimer, 1992) y de 0,18 a 2,44 en otros países (Bray, 1963; Bollinder y col., 2002). En girasol, Murcia y col. (2016) reportaron una respuesta diferencial a la bajas temperatura

en las partes aérea y radical de todos los cultivares estudiados, resultados que cambiaron la dinámica de crecimiento, con la consiguiente modificación del índice R/A.

En el presente trabajo el riego con M1 no modificó la relación R/A, mientras que la aplicación de M2 produjo una menor R/A. Esto, sugiere que los reguladores de crecimiento aplicados inducen a la plántula a que desarrolle su parte aérea aumentando en longitud, pero no en peso conduciendo a plantas con debilidad estructural y posibles problemas de vuelco a campo.

Asimismo, la aplicación de los inóculos bacterianos SF2 y SF3, incrementó la relación R/A de las plántulas control, debido principalmente a un aumento de la parte radical, lo que implica que las plántulas estarían mejor dispuestas para incorporar agua de mayores profundidades o frente a condiciones de estrés hídrico. Mientras que las plántulas inoculadas y regadas con M2 mostraron diferencia respecto a su control sin inocular, pero las mismas no superaron a las obtenidas en las regadas con solución de Hoagland (HOA). Esto indica por una parte que los microorganismos aplicados producen una mejora en desarrollo de la biomasa vegetal, independientemente de la aplicación de los reguladores del crecimiento. Aunque es claro que deben realizarse estudios más profundos teniendo en cuenta no solo la interacción planta-microorganismos, sino también la concentración de reguladores a aplicar, ello sin dejar de considerar las condiciones de crecimiento; ya que en condiciones de campo existen comunidades microbianas y condiciones ambientales y del suelo que seguramente arrojarán resultados diversos comparados con los obtenidos en el laboratorio.

El rendimiento del cultivo de girasol es atribuido a diferentes componentes: número de capítulos por hectárea, número de granos por capítulo y peso de granos (Pedraza y col., 2000). El número de capítulos por hectárea resulta de la cantidad de plantas capaces de desarrollar una inflorescencia, y por lo tanto depende del número de semillas sembradas y de la proporción que germina y se desarrolla. No obstante según Trápani y col. (2003) y Aguirrezábal y Arfan (2002), el número y peso de granos son los componentes que explican en mayor medida las variaciones en el rendimiento del cultivo. En los campos de las localidades de Manfredi, V. Mackenna y Bulnes, la inoculación con las cepas nativas de girasol incrementó el número de capítulos por parcelas, mientras que el número de semillas por capítulo y el peso de mil semillas solo aumentaron en las plantas inoculadas de V. Mackenna y Manfredi. Estos resultados coinciden con los de Gholami y col. (2009) en maíz, quienes reportaron que el peso y número de semillas por espiga se incrementó en plantas

inoculadas con distintos géneros de *Pseudomonas* y *Azospirillum*. Además, Yasari y Patwardhan (2007) demostraron que la inoculación de canola con *Azotobacter* y *Azospirillum* también incrementa el peso de semillas.

Considerando las variables que definen el rendimiento y las cepas utilizadas, observamos que en promedio, las inoculaciones con SF3 y SF4 causaron mayor número de capítulos por parcela y de semillas por capítulo, lo cual implica que ambas cepas incrementan el rendimiento en granos y materia grasa por hectárea. Por otra parte, la inoculación con SF2, aumentó el número de semillas por capítulo y peso de semillas, lo que también incidió positivamente sobre los rendimientos. Estos resultados coinciden con los de Metin y col. (2010), quienes demostraron aumento en el rendimiento total del cultivo de trigo por la aplicación de cepas de *Bacillus*, *Azospirillum* y *Paenibacillus*, bacterias fijadoras de N₂ y solubilizadoras de fosfatos. Estudios realizados por Dawwam y col. (2013) mostraron que las bacterias aisladas de raíces de papa, *Bacillus cereus* y *Achromobacter xylosoxidans*, promueven el crecimiento de las plantas cuando estas cepas se utilizan como bioinoculantes. Yasari y Patwardhan (2007), Gholami y col. (2009) y Ekin (2010) mostraron resultados similares en ensayos de inoculación de canola, maíz y girasol respectivamente; siendo este último tratado con una cepa de *Bacillus* sp. Así como la latitud de un determinado lugar puede afectar la calidad y el rendimiento del cultivo de girasol (Pereira-Irujo y Aguirrezabal, 2007), los resultados obtenidos en este estudio indicarían una respuesta diferencial del mismo a las precipitaciones de la zona y a las inoculaciones. Las plantas inoculadas con las cepas en estudio mostraron diferentes rendimientos en cada campaña, en los años de menores precipitaciones se produjeron mejores resultados en la inoculación con la cepa SF2, mientras que en los años de mayores precipitaciones las cepas SF3 y SF4 produjeron los mejores rendimientos. El aumento en el rendimiento obtenido en las plantas inoculadas se podría atribuir a la producción de sustancias producidas por las bacterias colonizadoras de las raíces. Estos hallazgos indicarían el efecto sinérgico antes mencionado, y que, si se formula un inoculante a base de las cepas nativas, el mismo se podría aplicar en zonas de diferentes condiciones climáticas, o bien se podría generar un producto específico para una determinada zona de aplicación.

Por lo tanto, las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4 se pueden recomendar como bioinoculantes para reducir la dependencia de fertilizantes químicos y proporcionar una mejora hacia la agricultura sostenible y amigable con el medio ambiente.

Actualmente, numerosos estudios muestran una tendencia a incrementar el uso de la inoculación en el campo de la tecnología, ya que actualmente se están desarrollando inoculantes con combinaciones de microorganismos y compuestos promotores del crecimiento. Estas mezclas permiten que las bacterias interactúen entre sí de manera sinérgica, aportando nutrientes la una a la otra o a la planta hospedante, eliminando productos inhibidores y mejorando entre sí algunos aspectos beneficiosos de su fisiología y de la planta. Asimismo, el uso de bacterias promotoras del crecimiento aumenta la productividad, la inmunidad de las plantas y también la absorción de nutrientes, lo que reduciría la necesidad de utilizar fertilizantes químicos con la consecuente prevención de la acumulación de nitratos y fosfatos en los suelos agrícolas. Una reducción en el uso de fertilizantes químicos disminuiría los efectos de la contaminación del agua por el escurrimiento, además no producen pérdida de la fertilidad del suelo y, para los agricultores supone un ahorro y una ganancia, ya que los inoculantes son más económicos y pueden dar mejor rendimiento que los compuestos químicos.

Conclusiones

Conclusiones

- Las cepas bacterianas *Achromobacter xylosoxidans* (SF2) y *Bacillus pumilus* (SF3 y SF4) se desarrollan y mantienen adecuadamente en el medio de cultivo LB, ya sea en forma individual o combinadas.
- En los tres medios de cultivo ensayados se identificó producción de las hormonas SA, AIA, JA y ABA sintetizadas por las bacterias. Siendo los medios GY y OM los que mayor proporción de SA mostraron, y el medio LB el que mayor concentración de JA, AIA y ABA exhibió.
- Las co-inoculaciones bacterianas producen un efecto sinérgico sobre la promoción del crecimiento de girasol mediante el incremento de la biomasa vegetal y la modificación del perfil hormonal de plántulas de 18 días crecidas en condiciones control y de estrés hídrico en sustrato sólido.
- Las inoculaciones con las cepas SF2, SF3 y SF4 mejoran levemente el crecimiento de plántulas de girasol crecidas en sustrato líquido, incluso en condiciones de estrés hídrico.
- La combinación de las inoculaciones con las cepas SF2, SF3 y SF4 y las mezclas de hormonas ensayadas, no producen modificaciones en el peso de las plántulas.
- Las plantas de girasol generan mayor rendimiento de granos y de materia grasa por ha, cuando son inoculadas con las cepas nativas de girasol SF2, SF3 y SF4.
- En condiciones de campo, en ambientes con regímenes de precipitaciones bajos, la cepa que mejor se comporta como PGPB es SF2; mientras que en ambientes con regímenes de precipitaciones medias y altas las que mejor se comportan son las cepas SF3 y SF4.

Conclusión final

La inoculación con las bacterias *Achromobacter xylooxidans* y *Bacillus pumilus* aumenta la productividad del girasol, lo que permitiría reducir la necesidad de utilizar fertilizantes químicos con la consecuente prevención de la acumulación de nitratos y fosfatos en los suelos agrícolas.

Ésta reducción del uso de fertilizantes químicos disminuye los efectos de la contaminación del agua por el escurrimiento y, para los agricultores supone un ahorro y una ganancia, ya que los bioinoculantes son más económicos y pueden dar mejor rendimiento que los compuestos químicos.

Bibliografĩa

- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:665-1681
- Aditya B, Ghosh A, Chattopadhyay D (2009) Co-inoculation effects of nitrogen fixing and phosphate solubilising microorganisms on Teak (*Tectona grandis*) and Indian Redwood (*Chukrasia tubularis*). *J Biol Sci* 1:23-29
- Adreani P (2008) Mercado del complejo soja y Análisis de la competitividad de los países exportadores. Programa de inserción agrícola 3:45
- Aguilar-Piedras JJ, Xiqui-Vásquez ML, García-García S, Baca BE (2008) Producción de ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev Lat Microbiol* 50:29-37
- Aguirrezabal LAN, Andrade YFH (2002) Ecofisiología. En: Manual práctico para el cultivo de girasol. Ed. Hemisferio sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 1ª Ed, Cap. 2. p 39-42
- Aguirrezabal LAN, Orioli GA, Hernández LF, Miravé JP, Pereyra VR, Cardinali FJ (2001) Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento. Balcarce EEA-Facultad de Ciencias Agrarias-UNMDP Serie de Divulgación p 127
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting characteristics. *Microbiol Res* 163:173-181
- Ahmad I, Basra SMA, Afzal I, Farooq M, Wahid A (2013) Growth improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide. *Int J of Agricul and Biol* 15:95-100
- Aimar D, Calafat M, Andrade AM, Carassay L, Abdala GI, Molas ML (2011) Drought tolerance and stress hormones: from model organisms to forage crop. En: *Plants Environ*. Hemanth KN, VasanthAIAh MCA (eds). USA, p 137-164
- Alba-Ordóñez A, Llanos-Company M (1990) El cultivo del girasol. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. p 158
- Amador-Alfárez KA, Díaz-González J, Loza-Cornejo S, Castro EYB (2013) Effect of plant growth regulators on seed germination and seedling development of two *ferocactus* species (cactaceae). *Polibotan* 35:109-131
- An C, Mou Z (2011) Salicylic acid and its function in plant immunity. *J Integrat Plant Biol* 53:412-428
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and

- jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460-3479
- Andrade A, Escalante M, Vigliocco A, Tordable MdC, Alemano S (2017) Involvement of jasmonates in responses of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings to moderate water stress. *Plant Growth Regul* DOI 10.1007/s10725-017-0317-9
- Antoun H, Prevost D (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and Fertilization*. Siddiqui ZA (ed). p 1-38
- Arbona V, Argamasilla R, Gómez-Cadenas A (2010) Common and divergent physiological, hormonal and metabolic response of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *J Plant Physiol* 167:1342-1350
- Arbona V, Gómez-Cadenas A (2008) Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J Plant Growth Regul* 27:241-250
- Arfan M, Athar HR, Ashraf M (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress? *J Plant Physiol* 6(4):685-694
- Arshad M, Frankenberger WTJr (1991) Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133:1-8
- Arshad M, Shaharoon B, Mahmood T (2008) Inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of water stress on growth, yield and ripening of *Pisum sativum* L. *Pedosph* 18:611-620
- ASAGIR (2009) <http://www.asagir.org.ar> associated. Historia y economía del girasol.
- Ashraf M (2010) Inducing drought tolerance in plants: Some recent advances. *Biotechnol Adv* 28:169-183
- Ashraf M, Akram NA, Arteca RN, Foolad MR (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Cri Rev Plant Sci* 29(3):162-190
- Astacio MG, van Iersel MW (2011) Concentrated exogenous abscisic acid drenches reduce root hydraulic conductance and cause wilting in tomato. *Hortsci* 46(12):1640-1645
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32: 1559-1570
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642-650

- Báez-Pérez A, González-Molina L, Solís Moya¹ E, Bautista-Cruz A, Bernal-Alarcón MA (2015) Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Rev Mex de Cien Agr* 6(3):523-537
- Bai Y, Zhou X, Smith DL (2003) Enhanced soybean plant growth resulting from co-inoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci* 43:1774-1781
- Bandurska H, Stroinski A (2005) The effect of salicylic acid on barely response to water deficit. *Acta Physiol Plant* 27:376-386
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lip* 44:85-95
- Barbafieri M, Tassi E (2010) Brassinosteroids for phytoremediation application. En: Brassinosteroids: a class of plant hormone. Hayat ESAA (ed). Heidelberg: Springer Sci. p 403-38
- Barbieri P, Galli E (1993) Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res in Microbiol* 144:69-75
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2004) Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. En: Plant surface microbiology. Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, (eds). Heidelberg, Germany: Springer-Verlag p 351-371
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promotion bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729-770
- Bashan Y, de-Bashan LE (2002^a) Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol* 68: 2637-2643
- Bashan Y, de-Bashan LE (2002b). Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. *Eur J Plant Pathol* 108:821-829
- Bashan Y, de-Bashan L (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth. A critical assessment. *Adv Agron* 108:77-136
- Bashan Y, Holguin G (1997a) *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances. *Can J Microbiol* 43:103-121

- Bashan Y, Holguin G (1997b) Short and medium term avenues for *Azospirillum* inoculation. En: Plant Growth Promoting Rhizobacteria present status and future prospects. Ogoshi A, Kobayashi K, Homma Y, Kodama F, Kondo F, Akino S (eds) Published Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. p 130-149
- Batistella M, Rodriguez M, Pacheco D, Recabarren A, Pugliese B, Carelli L, Zuluaga M (2013) Uso de reguladores de crecimiento para incrementar el color de uvas en zonas cálidas. XIV Congreso latinoamericano de Viticultura y Enología. Tarija, Bolivia.
- Belimov AA, Dodd I, Safronova V, Dumova VA, Shaposhnikov AG, Davies WJ (2014) Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth. *Plant Physiol and Biochem* 74:84e91
- Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ (2009) Rhizosphere bacteria containing ACC deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytol* 181:413-423
- Bensalim S, Nowak J, Asiedu SK (1998) A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am J Potato Res* 75:145-152
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci Soc* 64:1644-1650
- Bloembeg GV, Lutengberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin in Plant Biol* 4:343-350
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V (2007) Phytohormone production by *Bradyrhizobium japonicum* and posible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotech* 74:874-880
- Bollinder MA, Angers DA, Belanger G, Michaud R, Lavadiere MR (2002) Root biomass and shoot to root ratios of perennial forage crops in eastern Canada. *Can J Plant Sci* 82:731-737
- Bollinder MA, Angers DA, Dubuc JP (1997) Estimating shoot to root ratios and annual carbon inputs in soils for cereal crops. *Agric Ecosyst Environ* 63:61-66
- Bolsa de comercio de Rosario (2017) <https://www.bcr.com.ar>
- Borsani O, Valpuesta V, Botella A (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* 126:1024-1030

- Bottini R, Cassán F, Piccoli P (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:497-503
- Bray JR (1963) Root production and estimation of net productivity. *Can J Bot* 41:65-72
- Browse J (2009) Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Ann Rev Plant Biol* 60:183-205
- Browse J, Howe GA (2008) New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol* 146:832-838
- Bryla DR, Bouma TJ, Hartmond U, Eissenstat DM (2001) Influence of temperature and soil drying on respiration of individual roots in citrus: integrating greenhouse observations into a predictive model for the field. *Plant Cell Environ* 24:781-790
- Cabello-Conejo M, Centofanti T, Kidd P, Prieto-Fernández Á, Chaney R (2013) Evaluation of plant growth regulators to increase nickel phytoextraction by *Alyssum* species. *Int J Phytoremediation* 15:365-75
- Cabello-Conejo M, Prieto-Fernández Á, Kidd P (2014) Exogenous treatments with phytohormones can improve growth and nickel yield of hyperaccumulating plants. *Sci of the Total Environ* 494-495
- Cai T, Xua H, Penga D, Yina Y, Yanga W, Nia Y, Chenb X, Xua C, Yanga D, Cuia Z, Wang Z (2014) Exogenous hormonal application improves grain yield of wheat by optimizing tiller productivity. *Field Crops Res* 155:172-183
- Camargo C, Melinsky S, Andrade P, Mazza R, Rossi, G. (2009) Agroquímicos de Controle Hormonal, Fosfitos e Potencial de Aplicação dos Aminoácidos na Agricultura Tropical. Piracicaba. Serie Produtor Rural. <http://www2.esalq.usp.br/biblioteca/>
- Camelo-Rusique M, Moreno-Galván A, Romero-Perdomo F, Bonilla-Buitrago R (2017) Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Rev Argent Microbiol* 49(3):289-296
- Canbolat M, Bilen S, Cakmakcı R, Fiahin F, Aydın A (2006) Effect of plant growth promoting rhizobacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42:50-357
- Cappellari LR, Santoro MV, Nieves F, Giordano W, Banchio E (2013) Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Appl Soil Ecol* 70:16-22

- Carranza C, Castellanos G, Meaza D, Miranda D (2016) Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en condiciones de invernadero. Rev Col de Cs Hor 10(2):284-291
- Casanovas E, Barassi C, Sueldo R (2002) *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effect in maize seedlings. Cereal Res Comm 30:343-350
- Cassán F, Paz R, MAIAle S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruíz O (2005) Producción de cadaverina por *Azospirillum brasilense* Az39, Un nuevo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. En: XV Reunión de la Sociedad de Biología de Córdoba Agosto 2005. Córdoba. Argentina
- Cassán F, Perrig D, Sgroy V, Masciarelli O, Penna C, Luna V (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). Eur J of Soil Biol 45:28-35
- Cassán F, Picolli P, Bottini R (2003) Plant growth promoting by *Azospirillum* sp. through GAs production. An alternative model to increase crop yield. En: Microbiología Agrícola. Ed. Albanesi. p 143-158
- Cassina L, Tassi E, Morelli E, Giorgetti L, Remorini D, Chaney RL (2011) Exogenous cytokinin treatments of an Ni hyper-accumulator, *Alyssum murale*, grown in a serpentine soil: Implications for phytoextraction. Int J Phytorem 13:90-101
- Castillo P, Escalante M, Gallardo M, Alemanno S, Abdala G (2013) Effects of bacterial single inoculation and co-inoculation on growth and phytohormone production of sunflower seedlings under water stress. Acta Physiol Plant 35:2299-2309
- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Métraux JP (2008) Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana*. FEBS Letters 582:473-478
- Challinor AJ, Watson J, Lobell DB, Howden SM, Smith DR, Chhetri N (2014) A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. Nat Clim Chang 27:1-5
- Chaudhry NY, Rasheed S (2003). Study of the external and internal morphology of *Pisum sativum* L., with growth hormones i.e., indole-3-acetic acid and kinetin and heavy metal i.e., lead nitrate. Pak J Biol Sci 6:407-412
- Chen Q, Sun JQ, Zhai QZ (2011) The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. Plant Cell 23:3335-3352

- Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2009) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Sig Behaviour* 4:493-496
- Cheryl P, Glick B (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207-220
- Chimenti CA, Hhall AJ, Lopez MS (2001). Embryo-growth rate and duration in sunflower as affected by temperature. *Field Crops Res.* 69:81-88
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nat* 448:666-671
- Chini A, Gimenez-Ibanez S, Goossens A, Solano R (2016) Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr Op in Plant Bio* 33:147-156
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake G (2004) Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant J* 38:810-822
- Chowdappa P, Mohan Kumar SP, Jyothi Lakshmi M, Upreti KK (2013) Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biolog Control* 65:109-117
- Cindy HW, Thomas KW, Ashok M, Chen W (2006) Engineering plant microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *J Appl Environ Microbiol* 72:1129-1134
- Cleland RE (1990) Auxin and cell elongation. En: *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Davies PJ (ed). Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht. The Netherlands. p 132-148
- Cohen A, Bottini R, Piccoli P (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. *Plant Growth Regul* 54:97-103
- Cohen AC, Travaglia CN, Bottini R, Piccoli PN (2009) Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Bot* 87:455-462
- Connor D, Hall AJ (1997) *Sunflower Technology and Production*. Monografia de Agronomia N° 35. American Society of Agronomy, Science Society of America. p113-181

- Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G (2010) The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* 232:1455-1470
- Creelman RA, Mullet E (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4114-4119
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can J Bot* 82:273-281
- Cuesta G, Mondaca E (2014) Effect of an auxin-based bioregulator on growth of tomato seedlings. *Rev Chapingo Ser. Hortic* 20(2):215-222
- Davies W, Jones H (1991) Abscisic acid, physiol and biochem. BIOS Scientific Publishers, Oxford, U.K, p 266
- Dawwam GE, Elbeltagy A, Emara HM, Abbas IH, Hassan MM (2013) Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Ann of Agric Sci* 58(2):195-201
- De Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2012) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiol Plant* 147:296-306
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signaling pathway to cause disease. *EMBO J* 26:1434-1443
- Demirbas A (2007) Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide. *Energ Convers Manage* 48:937-941
- Dempsey DA, Vloth AC, Wildermuth MC, Klessig DF (2011) Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *American Soc of Plant Biol. The Arabidopsis book* 9:e0156
- Desai S, NarayanAIAh C, Kranti Kumari C, Reddy MS, Gnanamanickam SS, Rajeswara Rao G, Venkateswarlu B (2007) Seed inoculation with *Bacillus* spp. improves seedling vigour in oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Biol Fertil Soils* 44:229-234
- Destefano-Beltrán L, Knauber D, Huckle L, Suttle JC (2006) Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues. *Plant Mol Biol* 61:687-697

- Diagne N, Thioulouse J, Sanguin H, Prin Y, KrasovaWade T, Sylla S (2013) Ectomycorrhizal diversity enhances growth and nitrogen fixation of *Acacia mangium* seedlings. *Soil Biol Biochem* 57:468-476
- Díaz Vargas P, Ferrera Cerrato R, Almaraz-Suárez JJ, Alcántar González G (2001) Inoculation of plant growth-promoting bacteria in *Lettuce*. *Terra* 19:327-335
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ* 32:1682-1694
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aus J of Plant Physiol* 28:871-879
- Dodd IC, Pérez-Alfocea F (2012) Microbial amelioration of crops salinity stress. *J Exp Bot* 63:3415-3428
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann of Appl Biol* 157:361-379
- Dombrecht B, Xue GP, Sprague SJ (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2225-2245
- Dowling DN, O'Gara F (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol* 12:133-141
- Dufault, RJ (1998) Vegetable transplant nutrition. *Hor Technol* 8(4):515-523
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gomez-Cardenas A (2005) Simultaneous determinación of multiple phytohormones in plants extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53:8437-8442
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185-209
- Echeverría-Machado I, Escobedo GMRM, Larqué-Saavedra A (2007) Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiol and Biochem* 45:501-507
- Egamberdieva D (2009) Alleviation of salt stress by plant growth regulators and AIA producing bacteria in wheat. *Acta Physiol Plant* 31:861-864

- Ekin Z (2010) Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. *Afric J of Biotech* (9)25:3794-3800
- Emongor VE (1995) Thinning activity of benzyladenine on empire apples application timing and fruit storage PhD Thesis University of Guelph p 78-98
- Esteban-Soto L (2006) Efecto de diferentes dosis de AIB sobre el enraizamiento de *Benjamina ficus* L. en diferentes épocas del año. *Revista Ra Ximhai*. Universidad Autónoma Indígena de México (UAIM) 2:795-814
- Fages J (1992) An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Simb* 13:15-26
- Fairless D (2007) Biofuel: the little shrub that could maybe. *Nat* 449:652-655
- Fassler E, Robinson BH, Stauffer W, Gupta SK, Papritz A, Schulin R (2010) Phytomanagement of metal contaminated agricultural land using sunflower, maize and tobacco. *Agricult Ecosyst Environ* 136:49-58
- Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23:701-715
- Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR, Chanway CP (2008) Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *App Soil Ecol* 40:182-188
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59:387-415
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant cell* 14(S)15-45
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5:344-350
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2007) Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl Microbiol Biothech* 76(5):1145-1152

- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G (2010) Native bacteria from sunflower roots produce salicylic acid and improve seedling growth under water deficit stress. *Curr Microbiol* 61:485-493
- Freeman JL, Garcia D, Kim D, Hopf AM, Salt DE (2005) Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Physiol* 137:1082-1091
- Garcion C, Lohmann A, Lamodièrè E, Catinot J, Buchala A, Doermann P, Metroux JP (2008) Characterization and biological function of the isochorismate synthase2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147:1279-1287
- Gaviria-Giraldo J, Restrepo-Franco GM, Galeano-Vanegas NF, Hernández-Rodríguez A (2018) Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Cien Agri* 15(1): 19-27
- Gemes K, Poor P, Sulyok Z, Szepesi A, Szabo M, Tari I (2008) Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cv. Rio Fuego) under salt stress. *Acta Biol Szegediensi* 52:161-162
- Ghodrat V, Rousta MJ, Tadaion MS, Karampour A (2012) Yield and yield components of corn (*Zea mays* L.) in response to foliar application with indole butyric acid and gibberellic acid. *Amer-Eur J Agric and Environ Sci* 12 (9):1246-1251
- Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S (2009) The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of Maize. *Waset* 49:19-24
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Solano R (2015) Novel players fine-tune plant trade-offs. *Essays Biochem* 58:83-100
- Gimenez-Ibanez S, Solano R (2013) Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Front Plant Sci* 4(72):72
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 4:109-117
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1-7
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Europ J of Plant Pathol* 119:329-339

- Glick BR, Patten CL, Holguing G, Penrose DM (1999) Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London p 267
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63-68
- Gomes MMA, Lagôa AMMA, Medina CL, Machado EC, Machado MA (2004) Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Braz J Plant Physiol* 16:155-161
- González Mansilla A, Almaraz Suárez JJ, Ferrera Cerrato R, Rodríguez Guzmán MP, Taboada Gaytán OR, Trinidad Santos A, Alarcón A, Arteaga Garibay R (2017) Characterization and selection of plant growth promoting rhizobacteria in poblano pepper seedlings (*Capsicum annuum L.*) *Rev Int Contam Ambie* 33(3):463-474
- Gutiérrez-Coronado MA, Trejo-López C, Larqué-Saavedra A (1998) Effect of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol and Biochem* 36(8):563-565
- Gutiérrez-Espinoza LR, Melgoza-Castillo A, Alarcón-Herrera MT, Ortega-Gutiérrez JA, Prado-Tarango DE, Cedillo-Alcantar ME (2011) Germinación del girasol silvestre (*Helianthus annuus L.*) en presencia de diferentes concentraciones de metales. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 2(1):49-56
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo F, Talon M (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111:206-211
- Habibi G (2012) Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. *Acta Biol Szeged* 56:57-63
- Hamayun M, Khan SA, Shinawari ZK, Khan AL, Ahmad N, Lee I (2010) Effect of polyethylene glycol induced drought stress on physio-hormonal attributes of soybean. *Pak J Bot* 42:977-986
- Han Q-Q, Lü X-P, Bai J-P, Qiao Y, Paré PW, Wang S-M, Zhang J-L, Wu Y-N, Pang X-P, Xu W-B, Wang Z-L (2014) Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. *Front in Plant Sci* 525:1-8
- Hao JH, Wang XL, Dong CJ, Zhang ZG, Shang QM (2011) Salicylic acid induces stomatal closure by modulating endogenous hormone levels in cucumber cotyledons. *Russ J Plant Physiol* 58:906-913

- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MM, Pereira A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol* 154:1254-1271
- Hartung W, Sauter A, Hose E (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 53:27-32
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010a) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ Exp Bot* 68:14-25
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010b) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579-598
- Hegde SV (2002) Liquid biofertilizers in Indian agriculture. *Biofert News Letter* 12:17-22
- Heinrich M, Hettenhausen C, Lange T, Wünsche H, Fang J, Baldwin IT, Wu J (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *The Plant Jour* 73:591-606
- Hipólito-Romero E, Carcaño-Montiel MG, Ramos-Prado JM, Vázquez-Cabañas E, López-Reyesby L, Ricaño-Rodríguez J (2017) Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Rev Argent Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.003>
- Horváth E, Szalai G, Janda T (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul* 26:290-300
- Howe GA (2010) Ubiquitin-ligase-coupled receptors extend their reach to jasmonate. *Plant Physiol* 154:471-474
- Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS (2015) Soybean seed co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *Am J of Plant Sci* 6:811-817
- INTAGRO (2015) http://www.intagro.com/mapas/arg_gira.asp.
- Jacobson CB, Pasternak J, Glick BR (1994) Partial purification and characterization of ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2S. *Can J Microbiol* 40:1019-1025
- Jain M, Khurana JP (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J* 276:3148-3162

- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R (2008) Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agr Biol* 11:100-105
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res* 65:197-209
- Jeffries P, Gianinazzi S, Peroto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils* 37:1-16.
- Jha P, Kumar A (2009) Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb Ecol* 58:179-188
- Jiang F, Chen L, Belimov AA, Shaposhnikov AI, Gong F, Meng X, Hartung W, Jeschke DW, Davies WJ, Dodd IC (2012) Multiple impacts of the plant growth promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 63:6421-6430
- Johansen C, Baldev B, Brouwer JB, Erskine W, Jermyn WA, Li-Juan L, Malik BA, Ahad Miah A, Silim SN (1992) Biotic and abiotic stresses constraining productivity of cool season food legumes in Asia, Africa and Oceania. En: Expanding the production and use of cool season food legumes. Muehlbauer FJ, Kaiser WJ (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. p 75-194
- Jones JD, Dang JL (2006) The plant immune system. *Nat* 444:323-329
- Kang HM, Saltveit ME (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plantarum* 115:571-576
- Katsir L, Chung HS, Koo AJK, Howe GA (2008) Jasmonate signalings: a conserved mechanism of hormone. *Curr Opin Plant Biol* 11:428-435
- Kazan K, Manners JM (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* 17:22-31
- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Ann Rev in Plant Biol* 53:299-328
- Khan MIR, Khan NA (2013) Salicylic acid and jasmonates: approaches in abiotic stress. *J Plant Biochem Physiol* 1:e113

- Khan MIR, Syeed S, Nazar R, Anjun N (2012) An insight into the role of salicylic acid and jasmonic acid in salt stress tolerance. En: *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Khan NA (ed). Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg. p 277-300
- Khan N, Syeed S, Masood A, Nazar R, Iqbal N (2010) Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *Int J Plant Biol* 1(e1):1-9
- Klamt HD (1962) Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its b-D-glucoside. *Nat* 196:491
- Kloepper JW, Lifshitz R, Schroth MN (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Anim Plant Sci* 1:60-64
- Kloepper JW, Scher F, Laliberte M, Tipping B (1986) Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. En: *Iron, siderophores and plant diseases*. Swinburne TR (ed). Plenum Publishing Co. N Y. p 155-164
- Kloepper JWE (1993) Plant growth-promoting rhizobacteria as bioconsistent effects. NEB17 seems to be suitable for use control agents. En: *Soil microbiol ecology. Application in agricultural and environmental management*. Metting FB Jr (ed) New York Marcel Dekker Inc
- Kloepper JWE, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J of Microbiology* 38(12):1219-1232
- Kloepper JWE, Ryu CM, Zhang SA (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol* 94:1259-1266
- Kloepper JWE, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: *Station de Pathologie vegetale et Phyto-bacteriologie. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II*. Tours: Gilbert-Clary p 879-82
- Kloepper JWE, Zablutowicz R, Tipping EM, Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizer. En: *The rhizosphere and plant growth*. Keister DL, Cregan PB. Kluwer (eds). Dordrecht, The Netherlands p 315-326
- Knopf RR, Feder A, Mayer K (2012) Rhomboid proteins in the chloroplast envelope affect the level of allene oxide synthase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J* 72: 559-571
- Koch BL, Oya J (1974) Non-symbiotic nitrogen fixation in some Hawaiian pasture. *Soils Soil Biol Biochem* 6:363-367

- Kombrink E (2012) Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* 236(5):1351-1366
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol* 123:177-187
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kimatura S, Asami T, Hirai N, Koshiha T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *Embo J* 23:1647-1656
- Landjeva S, Neumann K, Lohwasser U, Börner A (2008) Molecular mapping of genomic regions associated with wheat seedling growth under osmotic stress. *Biol Plant* 52 (2):259-266
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138:882-897
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* 128:682-695
- Lee HI, Leon J, Raskin I (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4076-4079
- Lehmann J, Atzorn R, Brückner C, Reinbothe S, Leopold J, Wasternack C, Parthier B (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* 197:156-162
- Lehmann T, Hoffmannl M, Hentrich M, Pollmann S (2010) Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Europ J of Cell Biol* 89:895-905
- Li Y-P, Xia Yu C-X, Qiao J, Zang Y-M, Xiang Y, Ren G-X, Wang L, Zhang X-Y, Liu C-S (2016) Effect of exogenous phytohormones treatment on glycyrrhizic acid accumulation and preliminary exploration of the chemical control network based on glycyrrhizic acid in root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Rev Bras de Farmacog* 26:490-496
- Lim JH, Kim SD (2013) Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathol J* 29:201-208

- Liphadzi M, Kirkham M, Paulsen G (2006) Auxin-enhanced root growth for phytoremediation of sewage-sludge amended soil. *Environ Technol* 27:695-704
- Litton CM, Ryan MG, Tinker DB (2003) Belowground and aboveground biomass in young postfire lodgepole pine forests of contrasting tree density. *Can J of Forest Res* 33:351-363
- Liu L, Sonbol F-M, Huot B, GuY, Withers J, Mwimba M, Yao J, He SY, Dong X (2016) Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat Commun* 7:13099
- Liu Z, Sinclair J (1993) Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. *Soil Biol Biochem* 25:849-855
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* 29:325-332
- López-Tejeda R, Camacho-Rodríguez V, Gutiérrez-Coronado MA (1998) Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. *Terra Latinoamericana* 16(1):43-48
- Lu GH, Ren DL, Wang XQ, Wu JK, Zhao MS (2010) Evaluation on drought tolerance of maize hybrids in China. *J Maize Sci* 3:20-24
- Lu YY, Chen CY (2005) Molecular analysis of Lily leaves in response to salicylic acid effective towards protection against *Botrytis elliptica*. *Plant Sci* 169:1-9
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-56
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas I (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J of Environ Manag* 90:831-837
- Madejon P, Murillo JM, Maranon T, Cabrera F, Soriano M (2003) Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants 2 years after the Aznacollar mine spill. *Sci Total Environ* 307:239-257
- Mahouachi J, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2007) Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regul* 53:43-51
- Malhotra M, Srivastava S (2009) Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM its ability to modulate plant growth. *E J Soil Biol* 45:73-80

- Manikandan R, Saravanakumar D, Rajendran L, Raguchander T, Samiyappan R (2010) Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biol Cont* 54:83-89
- Mao P, Duan M, Wei C, Li Y (2007) WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol* 48:8338-42
- Marques AP, Pires C, Moreira H, Rangel AO, Castro PM (2010) Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol Biochem* 42:1229-1235
- Martinez S, Garbi M, Carbone A, Morelli G, Argerich C, Pacheco R, Puch L (2015) Aplicación de reguladores auxínicos: efecto sobre el cuajado de fruto en tomate para consumo fresco. *Hor Arg* 35(87):30-40
- Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J Plant Growth Regul* 28:115-124
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol and Bioch* 42:565-572
- Medeiros FH, Souza RM, Medeiros FC, Zhang H, Wheeler T, Payton P (2011) Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. *Plant Soil* 347:327-337
- Meier U (2001) Estadios de las plantas mono-y dicotiledóneas. BBCH Monografía. Girasol/Maravilla. 2^{da} Ed. p 36-39
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969-980
- Metin T, Medine G, Ramazan C, Taskin O, Fikretin S (2010) The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. p140-143
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* 132:272-281
- Milborrow BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* 52:1145-1164
- Minagri (2014) <http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/index.php>. 4

- MINAGRO (2017) <http://www.agroindustria.gob.ar>.
- Mo G, Nie D, Kirkham MR, He H, Ballou LK, Caldwell FW, Kanemasu ET (1992) Root and shoot weights in a tallgrass prairie under elevated carbon dioxide. *Environ Exp Bot* 32:103-201
- Mohr PG, Cahill DM (2003) Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Funct. Plant Biol* 30:461-469
- Mohr PG, Cahill DM (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Funct Integr Genomics* 7:181-191
- Mokany K, Raison RJ, Prokushkin AS (2006) Critical analysis of root : shoot ratios in terrestrial biomes. *Global Change Biology* 12:84-96
- Mori IC, Pinontoan R, Kawano T, Muto S (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol* 42:1383-1388
- Mortimer SR (1992) Root length/leaf area ratios of chalk grassland perennials and their importance for competitive interactions. *J Veg Sci* 3:665-672
- Mulholland BJ, Black CR, Taylor B, Roberts JA, Lenton JR (1996) Effect of soil compaction on barley (*Hordeum vulgare* L.) growth I. Possible role for ABA as a root-sourced chemical signal. *J Experim Bot* 47(297):539-549
- Munne-Bosch S, Peñuelas J (2003) Photo and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under mediterranean field conditions. *Annu Bot* 92:385-391
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140:249-262
- Myresiotis C, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E (2012) Biodegradation of soil-applied pesticides by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. *Biodeg* 23:297-310
- Naderifar Alves AAC, Setter TL (2004) Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Ann Bot* 94:605-613

- Naderifar M, Daneshian J (2012) Effect of seed inoculation with *Azotobacter* and *Azospirillum* and different nitrogen levels on yield and yield components of canola (*Brassica napus* L.). Iran J Plant Physiol 3(1):619-626
- Ngoma L, Babalola O, Ahmad F (2012) Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. Scient Res Essays 7:4003-4013
- Ngumbi E, Kloepper J (2016) Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. App Soil Ecol 105:109-125
- Niu Z, Sun L, Sun T, Li Y, Wang H (2007) Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. J Environment Sci 19:961-967
- Nowak J, Bensalim S, Smith C, Dunbar C, Asiedu SK, Madani A, Lazarovits G, Northcott DD, Sturz AV (1999) Behaviour of plant material issued from in vitro bacterization. Potato Res 42:505-519
- Oilseed (2017) <http://www.apps.fs.usda.gov>.
- Okasabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase 1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 17:1105-1119
- Okon Y, Labandera-González C (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem 26:1591-1601
- Ona O, Impe JV, Prinsen E, Vanderleyden J (2005) Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. FEMS Microb Let 246:125-132
- Oritani T, Kiyota H (2003) Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compound. Nat Product Reports 20:414-425
- Ortega-Ortiz H, Benavides-Mendoza A, Mendoza-Villarreal R, Ramírez-Rodríguez H, De Alba RK (2007) Enzymatic activity in tomato fruits as a response to chemical elicitors. J Mex Chem Soc 51(3):141-144
- Pallavi R, Nepolean P, Balamurugan A, Jayanthi R, Beulah T, Premkumar R (2012) In vitro studies of biocontrol agents and fungicides tolerance against grey blight disease in tea. Asian Pacific J Trop Biomed S435-S438
- Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. Front in Plant Sci 6(723):1-14

- Parry AD, Griffiths A, Horgan R (1992) Abscisic acid biosynthesis in roots. II. The effects of water stress in wild type and abscisic acid deficient mutant (*notabilis*) plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Planta* 187:192-197
- Parry AD, Horgan R (1991) Abscisic acid biosynthesis in roots. I. The identification of potential abscisic acid precursors and other carotenoids. *Planta* 187:185-191
- Pasturas y Forrajes (2010) <http://www.pasturasyforrajes.com/alfalfa/inoculacion-y-peleteo/conviene-semilla-peleteadas>
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207-220
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795-3801
- Pauwels L, Goossens A (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* 23:3089-3100
- Pauwels L, Inze D, Goossens A (2009) Jasmonate-inducible gene: what does it mean? *Trends Plant Sci* 14:87-91
- Pazurkiewicz Kocot K (2003) The effect of selenium on the accumulation of some metals in *Zea mays* L. plants treated with indole-3-acetic acid. *Cell Mol Biol Lett* 8:97-103
- Pedranzani H, Racagni G, Alemanno S, Miersch O, Ramírez I, Peña Cortés H, Machado-Domenech E, Abdala G (2003) Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul* 41:149-158
- Pedraza MV, Pereyra VR, Aguirrezábal LAN, Laurlund A (2000) Efectos de reducciones en el área foliar, en la densidad de plantas y en el número de capítulos. En: Manual de estimación de pérdidas de rendimiento en girasol. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina. p 21-30
- Pedraza R, Teixeira KR, Fernández-Scavino A, García de Salomone I, Baca B, Azcón R, Baldani-Divan VL, Bonilla R (2010) Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu* 11:155-64
- Pereira JAR, Cavalcante VA, Baldani JI, Dobereiner J (1988) Sorghum and rice inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum seropedicae* in field. *Plant Soil* 110:269-274
- Pereyra Irujo G, Aguirrezábal LAN (2007) Sunflower yield and oil quality interactions and variability: analysis through a simple simulation model. *Agric Forest Meteorol* 143:252-265

- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *App Microbiol and Biotechnol* 75:1143-1150
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347-75
- Pollmann S, Muller A, Weiler EW (2006) Many roads lead to “auxin”: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biol* 8:326-333
- Poorter H, Niinemets U, Poorter L, Wright IJ, Villar, R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytol* 182:565-588
- Porter JR, Xie L, Challinor AJ, Cochrane K, Howden SM, Iqbal MM, Lobell DB, Travasso MI, Netra Chhetri NC, Garrett K, Ingram J, Lipper L, McCarthy N, McGrath J, Smith D, Thornton P, Watson J, Ziska L (2014). An integrated approach to maintaining cereal productivity under climate change. *Global Food Security* 8:9-18
- Probanza A, Lucas JA, Acero N, Gutierrez-Mañero FS (1996) The influence of native rhizobacteria on European alder [*Alnus glutinosa* (L). (Gaerth)] growth. I. Characterization of growth promoting and nitrogen accumulation of inoculated alfalfa. *Plant Soil* 164:213-219
- Purcărea C, Cachiță-Cosma D (2010) Studies regarding the effects of salicylic acid on maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress. *Studia Universitatis Vasile Goldiș Seria Științele Vieții* 20(1):63-68
- Qualley AV, Widhalm JR, Adebessin F, Kish CM, Dudareva N (2012) Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(40):16383-16388
- Qureshi MA, Ahmad MJ, Naveed M, Iqbal A, Akhtar N, Niazi KH (2009) Co-inoculation with *Mesorhizobium ciceri* and *Azotobacter chroococcum* for improving growth, nodulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Soil Bacteriology Section, Ayub Agricultural Research Institute, Faisalabad* 28(2):124-129
- Rademacher W (1994) Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul* 15:303-314
- Raupach GS, Kloepper JW (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathol* 88:1158-1164

- Ribnicky DM, Shulaev V, Raskin I (1998) Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 118:565-572
- Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exper Bot* 62(10):3321-3338
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130:1143-1151
- Rock CD (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytology* 148:357-396
- Rojas-Tapias DF, Bonilla RB, Dussan J (2012) Effect of inoculation with plant growth promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. *Water Air Soil Pollut* 223:643-654
- Román N, Mamani G, García D (2013) Caracterización molecular de bacteria *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. *Prospect Univ* 10(1):13-16
- Ross J, O'Neill D, Smith J, Kerckhoffs, Elliot R (2000) Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* 21:547-552
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, Kunjeti SG, Donofrio NM, Czymmek K J, Paré PW (2010) The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Commun Integr Biol* 3:130-138
- Rural primicias (2014) <http://www.ruralprimicias.com>.
- Sainju UM, Allen BL, Lenssen AW, Ghimire RP (2017) Root biomass, root/shoot ratio, and soil water content under perennial grasses with different nitrogen rates. *Field Crops Research* 210:183-191
- Sakakibara H. (2010) Cytokinin biosynthesis and metabolism. En: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Davies PJ (ed) Dordrecht: Springer p. 95-114.
- San Miguel R, Gutiérrez M, Larqué-Saavedra A (2003) Salicylic acid increases the biomass accumulation of *Pinus patula*. *Southern J of App Forest* 27:52-54
- Sané D, Knyta MO, Diouf D, Badiane FA, Sagna M, Borgel A (2005) Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *Afric J Biotech* 4:968-972
- Santner A, Calderon-Villalobos LI, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5:301-307

- Saruhan N, Saglam A, Kadioglu A (2012) Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. *Acta Physiol Plant* 34:97-106
- Schaller A, Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis structure, function, regulation. *Phytochem* 70:1532-1538
- Scherer GFE, Ryu SB, Wang X, Matos AR, Heitz T (2010) Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends Plant Sci* 15:693-700.
- Schilmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Op Plant Biol* 8:369-377
- Schneiter AA, Miller JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Sci* 21:901-903
- Schmiesing A, Emonet A, Gouhier-Darimont C, Reymond P (2016) Arabidopsis MYC transcription factors are the target of hormonal SA/JA crosstalk in response to *Pieris brassicae* egg extract. *Plant Physiol* 170:2432-2443
- Schroth MN, Hancock JG (1982) Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Sci* 216:1376-1381
- Schweizer F, Fernandez-Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R, Reymond P (2013) *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* 25:3117-3132
- Seiler C, Thammegowda Harshavardhan V, Rajesh K, Sudhakar Reddy P (2011) ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *J Exp Bot* 62:2615-2632
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:1940-1950
- SENASA (2014) Fertilizantes: Resolucion 264/2011. En: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File4646-anexo-1-manual-fertilizantes.pdf>. p 16
- Seo M, Koshiba T (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7:41-48
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Op Plant Biol* 6:365-371

- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C R Biologies* 331:215-225
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nat* 468:400-405
- Shehata MM, El-Khawas SA (2003) Effect of two biofertilizers on growth parameters, yield characters, nitrogenous components, nucleic acids content, minerals, oil content, protein profiles and DNA banding pattern of sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Vedock) yield. *Pak J Biol Sci* 6:1257-1268
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A (2009) Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21:3823-3838
- Shu-Bin L, Mao F, Ren-Chao Z, Juan H (2012) Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* induced blight of *Anthurium*. *Biol Cont* 63:9-16
- Siia (2016) http://www.siia.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/estima2.php.
- Skinner RH, Comas LH (2010) Root distribution of temperate forage species subjected to water and nitrogen stress. *Crop Sci* 50:2178-2185
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil* 312:15-23
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770
- Srivastava MK, Dwivedi UN (2000) Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci* 158(1-2):87-96
- Stajković-Srbinović O, Delić D, Kuzmanović D, Sikirić B, Rasulić N, Nikolić B, Knežević-Vukčević J (2016) Growth and nutrient uptake of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) and Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds.) as affected by Rhizobacteria. *Not Bot Horti Agrobo* 44(1):296-301

- Stajković-Srbinović O, Delić D, Kuzmanović D, Sikirić B, Rasulić N, Nikolić B, Knežević-Vukčević J (2014) Growth and nutrient uptake in oat and barley plants as affected by rhizobacteria. *Romanian Biotechnol Lett* 19(3):9429-9436
- Stenzel I, Otto M, Delker C (2012) Allene Oxide Cyclase (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization. *J of Exp Bot* 63:6125-6138
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J, Farmer EE (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:12837-12842
- Sun JQ, Chen Q, Qi LL (2011) Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. *New Phytol* 191:360–375
- Tahir MHN, Imran M, Hussain MK (2002) Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance. *Int J Agr Biol* 4:398-400
- Tamaoki D, Seo S, Yamada S, Kano A, Miyamoto A, Shishido H, Miyoshi S, Taniguchi S, Akimitsu K, Gomi K (2013) Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signal Behav* 8(6)e24260
- Taylor IB, Sonneveld T, Bugg TDH, Thompson AJ (2005) Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors. *Jour Plant Growth Regul* 24:53-273
- Thines B, Katsir L, Melotto M (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCFC8II complex during jasmonate signalling. *Nat* 448:661-665
- Tien T, Gaskins M, Hubbell D (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
- Titlyanova AA, Romanova IP, Kosykh NP (1999) Pattern and process in above-ground and below-ground components of grassland ecosystems. *J of Veg Sc* 10:307-320
- Trapani N, Lopez Pereira M (2004) Bases ecofisiológicas para el cultivo de girasol. En: El cultivo de girasol en siembra directa. Gustavo Duarte (ed), B. Aires, Argentina. p 29-37
- Trapani N, Lopez Pereira M, Sadras VO, Hall AJ (2003) Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en Girasol. En: Producción de granos. Facultad de Agronomía, B. Aires, Argentina p 205-241

- Türkan İ, Bor M, Özdemir F, Koca H (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of droughttolerant *P. Acutifolius Gray* and drought-sensitive *P. vulgaris L.* subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci* 168:223-231
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, Mysore KS, Bender CL (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interac* 20:955-965
- Valdez Sepúlveda L, González Morales S, Alonso Valdez-Aguilar L, Ramírez-Godina F, Benavides-Mendoza A (2015) Efecto de la aplicación exógena de ácido benzoico y salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate, tomatillo y pimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp.* 12:2331-2343
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243-254
- Van Loon LC, Bakker PAHM (2006) Root-associated bacteria inducing systemic resistance. En: *Plant-Assoc Bact.* Gnanamanickam SS (ed) Springer, Dordrecht, p 269-316
- vanHulten M, Pelsler M, vanLoon LC, Pieterse CM, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5602-5607
- Vendan RT, Thangaraju M (2006) Development and standardization of liquid formulation for *Azospirillum* bioinoculant. *Indian J Microbiol* 46:379-387
- Venegas-González A, Loewe Muñoz V, Toral-Ibañeza M (2015) Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre brotes vegetativos y número de estróbilos masculinos en *Pinus pinea L.* en Chile. *Ciênc Florest* 26:4
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586
- Villanueva-Couoh E, Alcántar-González G, Sánchez-García P, Soria-Fregoso M, Larqué-Saavedra A (2009) Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura, en Yucatán. *Rev Chapingo Serie Hort* 15(2):25-31
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann Rev Phytopathol* 47:177-206

- Vurukonda SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microb Res* 184:13-24
- Wani SH, Kumar V, Shriram V, Saroj, Sah K (2016) Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The crop jour* 4:162-176
- Waseem M, Athar HUR, Ashraf M (2006) Effect of salicylic acid applied through rooting medium on drought tolerance of wheat. *Pak J Bot* 38(4):1127-1136
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* 1:198-217
- Wasternack C (2006) Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. En: *Plant hormone signaling. Annual Plant Reviews*. Hedden P, Thomas S (eds). Oxford, UK: Blackwell Publishing. p 185-228
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100:681-697
- Wasternack C, Hause B (2002) Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72:165-221
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann of Bot* 111:1021-1058
- Wasternack C, Kombrink E (2010) Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plants stress response and development. *ACS Chem Biol* 5:63-77
- Weaver JE, Himmel WJ (1929) Relation between the development of root system and shoot under long- and short-day illumination. *Plant Physiol* 4(4):435-457
- Weller DM, Thomashow LS (1994) Current challenges in introducing beneficial microorganisms in to the rizosphere. En: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and Release of GMOs*. O'Gara F, Dowling D, Boesten N (eds) New York: VCH. p 1-18
- Wu Q, Wu J, Sun H, Zhang D, Yu D (2011) Sequence and expression divergence of the AOC gene family in soybean: Insights into functional diversity for stress responses. *Biotechnol Let* 33:1351-1359
- Xiong L, Zhu JK (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *J Plant Physiol* 133:29-36

- Yamada S, Kano A, Tamaoki D, Miyamoto A, Shishido H, Miyoshi S, Taniguchi S, Akimitsu K, Gomi K (2012) Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant Cell Physiol* 53:2060-2072
- Yang ZM, Wang J, Wang SH, Xu LL (2003) Salicylic acid-induced aluminium tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta* 217:168-174
- Yang, J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14:1-4
- Yasari E, Patwardhan AM (2007) Effects of *Azotobacter* and *Azospirillum* inoculations and chemical fertilizers on growth and productivity of Canola. *Asian J Plant Sci* 6(1):77-82
- Yuming B, Xiaomin Z, Smith DL (2003) Enhanced soybean plant growth resulting from co-inoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci* 43:1774-1778
- Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:139-150
- Zander M, La Camera S, Lamotte O, Mettraux JP, Gatz C (2010) *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *Plant J* 61:200-210
- Zelicourt A, Al-Yousif M, Hirt H (2013) Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. *Mol Plant* 6(2):242-245
- Zhang F, Yao J, Ke J, Zhang L, Lam VQ, Xin XF, Zhou XE, Chen J, Brunzelle J, Griffin PR (2015) Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nat* 525:269-273
- Zhang H, Murzello C, Sun Y, Kim MS, Xie X, Jeter RM (2010) Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Mol Plant Microbe Interact* 23:1097-1104
- Zhang L, Gao M, Hu J, Zhang X, Wang K, Ashraf M (2012) Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycinebetaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Int J Mol Sci* 13:3189-3202
- Zheng XY, Spivey NW, Zeng W, Liu PP, Fu ZQ, Klessig DF, He SY, Dong X (2012) Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host Microbe* 11:587-596

Anexo

Medios de cultivo y soluciones de trabajo

-Luria Bertani (LB)

ClNa	10 g
Extracto de levadura	5 g
Tripeína bacteriológica	10 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH ~ 7	

Para realizar los recuento en placa se le agregó agar a razón 15g/L

-Omafuvbe modificado (OM)

Glicerol	4 ml
Triptona	0,1 g
PO ₄ HK ₂	0,5 g
PO ₄ H ₂ K	0,3 g
SO ₂ Mg	0,25 g
ClNa	0,75 g
NO ₃ K	0,3 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH ~ 7	

-Glucosa-Levadura (GY)

Acido Málico	5 g
KOH	4,8 g
PO ₄ HK ₂	0,4 g
PO ₄ H ₂ K	0,2 g
SO ₂ Mg	0,25 g
Glucosa	0,5g
Extracto de levadura	0,5g
ClNa	0,8 g
ClNH ₄	1,25 g
Tripeína bacteriológica	0,1 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH ~ 7	

-Solución Hoagland (HOA) ½ fuerza iónica

(NO ₃) ₂ Ca	236,15 g / 1000 ml	5 ml / 1000 ml sln
NO ₃ K	101,01 g / 1000 m	5 ml / 1000 ml sln
SO ₄ Mg	246,50 g / 1000 ml	2 ml / 1000 ml sln
PO ₄ H ₂ K	136,09 g / 1000 ml	1 ml / 1000 ml sln
CL ₃ Fe	5g / 1000 ml	1 ml / 1000 ml sln
Micronutrientes:		1 ml / 1000 ml de solución
BO ₃ H ₃	2,83 g / 1000 ml	
CL ₂ Mn ₄ H ₂ O	1,81 g / 1000 ml	
Cl ₂ Zn	0,11 g / 1000 ml	
SO ₄ Cu ₂ H ₂ O	0,05 g / 1000 ml	
Mo ₄ Na ₂ 2H ₂ O	0,025 g / 1000 ml	

-Solución Polietilenglicol (PEG) 14,7 % p/v (-2,03 MPa)

PEG 6000 147 g / 1000 ml

(Se enrasa con solución de HOA ½ fuerza iónica)

Protocolo para determinación y cuantificación de hormonas en los diferentes materiales de estudio

-Protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005)

Se utilizaron 200 mg de material vegetal liofilizado (parte aérea y radical, por separado) o 20 ml de medios bacterianos liofilizados, a los que se le agregaron 5 ml de agua desionizada. A cada muestra se adicionaron los estándares internos deuterados (²H₆)AIA, (²H₅)ABA, (²H₄)SA y (²H₆)JA (OlChemIm Ltd, Olomouc, Czech Republic). Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Se particionó, dos veces, con éter sulfúrico (1:1) descartándose la fase acuosa. La fase orgánica se evaporó a sequedad en rotavapor. Los extractos se disolvieron en 1,5 ml de metanol (MeOH), se filtraron a través de una jeringa filtro celulosa en cámara de vacío a un flujo menor a 1 ml.min⁻¹ y finalmente se evaporaron a 35 °C en Speed Vac. Los extractos evaporados se resuspendieron en 5 µl de MeOH grado HPLC y se inyectaron en el equipo LC-ESI/MS-MS.

La separación cromatografica se realizó con un HPLC Alliance 2695 (Waters, Inc., California, USA) equipado con una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2.1 mm, 3-µm),

el cual se encuentra acoplado con un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo (Quattro Ultima pt; Micromass, Manchester, UK), realizándose la ionización por electrospray en forma negativa (ESI).

La cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales sus transiciones para ABA: 263>153 y para su estándar interno 268>159, JA: 209>59 y para su estándar interno 215>59, SA: 137>93 y para su estándar interno 141>97 y para AIA 174>130 y para su estándar interno 180>135. El Software utilizado fue MassLynx TM v. 4.1, Micromass, Manchester, UK.