



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Cs. Exactas, Físico-Químicas y Naturales

VISTO la propuesta de Protocolo de Trabajo entre la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Río Cuarto, Córdoba, Argentina) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria MANFREDI (INTA EEA MANFREDI); y

CONSIDERANDO:

Que dicho Protocolo de Trabajo se encuadra en el Convenio vigente entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, (Exp. N° 63295).

Que las actividades propuestas en el presente Protocolo se desarrollarán en forma conjunta entre la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Río Cuarto, Córdoba, Argentina) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria MANFREDI (INTA EEA MANFREDI).

Que se cuenta con el dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos N° 7321.

Que el mismo cumple con los requisitos establecidos en las reglamentaciones vigentes.

Que se cuenta con el despacho de la Comisión de Investigación, Postgrado y Transferencia.

Por ello y en uso de las atribuciones conferidas por el Artículo 32 del Estatuto de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

EL CONSEJO DIRECTIVO

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

FISICO-QUIMICAS Y NATURALES

RESUELVE:

ARTÍCULO 1ro.- Aprobar el Protocolo de Trabajo entre la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO (RÍO CUARTO, CÓRDOBA, ARGENTINA) Y EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA MANFREDI (INTA EEA MANFREDI), según se detalla en ANEXO de la presente.

ARTICULO 2do.- Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Áreas de competencia. Cumplido, archívese.

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD A LOS CINCO DIAS DEL MES DE JUNIO DEL AÑO DOS MIL CATORCE.

RESOLUCION Nro.:

110

Ugr. Mariana DANIELE
Sec. Técnica de Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.

Dr. Roberto GATTI
Decano Facultad de Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



ANEXO

PROTOCOLO DE TRABAJO ENTRE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES Y EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA ESTACION EXPERIMENTAL AGROPECUARIA MANFREDI

En el marco del Convenio Marco entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi en adelante el "INTA", con domicilio en Ruta 9, Km 636, Manfredi, Provincia de Córdoba, representado en este acto por el Ing. Agr. ENRIQUE USTARROZ, por una parte y por la otra la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, en adelante la "FACULTAD" con domicilio en Ruta 36 Km. 602, de la ciudad de Río Cuarto, representada en este acto por su Decana, Dra. ROSA CATANA se estipula el presente protocolo que se registrá por las siguientes cláusulas:

PRIMERA: La Facultad a través del Departamento de Ciencias Naturales y el INTA a través de la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi desarrollarán parte de los siguientes proyectos:

- 1.- "Evaluación fisiológica y molecular de germoplasma de girasol en respuesta a problemas productivos"
- 2.- "Efectos fisiológicos y productivos de *Acrhomobacter xylosoxidans* y *Bacillus pumilus* sobre plantas de girasol".

SEGUNDA: Para obtener los resultados mencionados en la cláusula primera, se estructurará un Programa de Trabajo desde el hasta el 16 de Noviembre de 2013 y hasta el 16 de Octubre de 2014.-----

TERCERA: El proyecto de trabajo corresponde tipológicamente a un estudio de tipo colaborativo. Los aspectos específicos de este Protocolo de Trabajo, en lo que concierne a los detalles técnicos, operativos y metodológicos se detallan en el ANEXO I. -----

CUARTA: Para el logro de los objetivos arriba mencionados, la "FACULTAD" y el "INTA" aportarán personal, infraestructura y equipamiento del que disponen.

QUINTA: Las partes tienen la facultad de controlar y verificar la evolución de las actividades programadas. -----

SEXTA: En caso de accidente, los participantes mantendrán las respectivas relaciones contractuales y las correspondientes responsabilidades al respecto. En referencia a los alumnos de grado y postgrado, en este ultimo caso que no estuvieran cubiertos por ART y/o seguro provisto por organismos nacionales como CONICET, se le agregará un seguro de accidentes por parte de la "FACULTAD" siempre que realicen tareas fuera de la Universidad Nacional de Río Cuarto. -----



SEPTIMA: Las partes garantizan la observancia de las normas sobre secreto profesional y la confidencialidad de la información de conformidad con las disposiciones legales vigentes, ello por parte de todas las personas que participan de la actividad, motivo del presente protocolo. -----

OCTAVA: Los resultados serán informados por cualquiera de las partes, siempre que la restante sea participante de dicha publicación ó en caso de no serlo, haya sido informada fehacientemente de la difusión que se realizará y debiera contar con su aprobación. -----

NOVENA: Por parte de la "FACULTAD" se designa como Coordinadores de las actividades al Ing. Agr. Dr. Sergio ALEMANO del Departamento de Ciencias Naturales y como Coordinadores por parte del "INTA" al Ing. Agr. MS. Daniel ALVAREZ y al Ing. Agr. Dr. Jorge GIECO. -----

DECIMA: La "Facultad" designa como participantes del presente protocolo a las docentes Dra. Ana Vigliocco y Dra. Andrea Andrade, a los becarios doctorales de CONICET, Mic. Paula Castillo y de ANCTyP Lic. Maximiliano Escalante, el alumno de postgrado Mic. Cristian Fernández, Técnico del CONICET, Oscar Masciarelli, y los alumnos de Ingeniería Agronómica Javier Bartolomei, Javier Leceta, Melisa Andrea Apud Reinhold y Gonzalo Compagnucci y Federico Ramirez de Microbiología Marisol Vazquez y Solange Alejandra Merigo Figueroa, de Biología Agostina Nicola y Daiana Fernandez, y por el "INTA" designa a la MSc. María Valeria Moreno, Claudia Vega, Diego CORDES, Juan José Peroglia, Luís Ceballos, Gabriel Rojo, Cristian Bordese, Nancy Gabriela Grandón, Mauro Yane y Carolina Del Pilar Diaz. De incorporarse nuevos participantes, se deberán dar las altas correspondientes a través de los coordinadores en las partes respectivas. -----

DECIMA PRIMERA: Los documentos y/o proyectos que se elaboren, sean parciales o definitivos, como resultado de las tareas realizadas en el marco del presente Convenio, serán de propiedad intelectual, del "INTA" y de la "FACULTAD", y cuando los signatarios lo consideren conveniente, inscribirán esos derechos del autor o de los responsables del trabajo. -----

DECIMA SEGUNDA: En toda circunstancia o hecho que tenga relación con este Protocolo, las partes tendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas, académicas y administrativas y asumirán particularmente, por lo tanto, las responsabilidades consiguientes. -----



DECIMA TERCERA: Ambas partes acuerdan que por cualquier contingencia derivada del presente acuerdo, se someten a los Tribunales Federales de la Ciudad de Río Cuarto, y constituyen como sus domicilios especiales los consignados para cada uno de ellos. -----

En prueba de conformidad firman tres ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, la Sra. Decana de la "Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales" ROSA CATTANA y por el "INTA" ENRIQUE USTARROZ, en la ciudad de Río Cuarto, a losdías del mes de del año dos mil catorce.-----

=====


Agr. María Elena DANIELE
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.


Dra. Rosa Irene CATTANA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



Evaluación fisiológica y molecular de germoplasma de girasol en respuesta a problemas productivos

Antecedentes

El estrés hídrico es uno de los factores ambientales que en mayor grado limita el crecimiento y la productividad de los cultivos en el mundo (Bohnert et al. 1995; Boyer 1982). En este sentido, las plantas han desarrollado un amplio rango de mecanismos que les permiten afrontar en forma más o menos óptima condiciones adversas.

Entre los mecanismos de respuestas al estrés por sequía, se encuentra el incremento en la síntesis de fitohormonas, tales como jasmonatos (JAs), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA) (Zhu 2002; Xiong y Zhu 2003; Hayat et al. 2008). La participación de los JAs en respuesta a estrés biótico y abiótico fue ampliamente estudiada en diversas especies (Lehmann et al. 1995; Penninckx et al. 1996; Kramell et al. 2000; Wasternack y Hause 2002; Wasternack 2005). Recientemente nuestro grupo ha demostrado la existencia de cambios en las concentraciones de los miembros de la familia de los JAs en semillas de girasol generadas por plantas crecidas en sequía o en irrigación, tanto en líneas que se comportan como tolerantes o sensibles a sequía (Vigliocco et al. 2007). En adición, ha sido extensamente documentado que los niveles endógenos de ABA incrementan en respuesta a condiciones de estrés hídrico, siendo este aumento esencial como factor desencadenante de la respuesta de la planta (Bray 1997; Leung y Giraudat 1998; Zhu 2002). Similarmente, en hojas de *Phillyrea angustifolia* sometidas a estrés hídrico los niveles endógenos de SA incrementaron más de 5 veces durante la sequía (Munne-Bosch y Peñuelas 2003). En raíces de plantas de cebada, un estrés hídrico moderado o severo aumentó los niveles de SA, mientras que su contenido no varió en hojas (Bandurska y Stroinski 2005).

En respuesta a estrés hídrico no sólo se observan cambios hormonales sino también de compuestos del metabolismo secundario, tal como lo observado en raíces de plantas de distintos genotipos de cítricos (Arbona et al. 2010). En este contexto, la metabolómica permite evaluar el metaboloma, que representa el fenotipo final producido por la perturbación de la expresión génica y la modulación de las funciones de las proteínas, alteraciones causadas por ejemplo, por situaciones de estrés ambiental. Los aspectos que subyacen en la respuesta a estrés hídrico se han estudiado en un reducido número de especies vegetales. Por tal motivo, este proyecto aportará conocimientos sobre los metabolitos que participan en dicha respuesta durante el crecimiento temprano de plántulas de girasol. Asimismo, la información resultante brindará conocimientos que contribuirán a dilucidar las redes biológicas en diferentes estadios fisiológicos, al mismo tiempo que complementará a la transcriptómica y proteómica (Fernie et al. 2004; Bino et al. 2004).

Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la expresión de algunos genes. El análisis de expresión de genes inducidos por estrés en *Arabidopsis*, arroz y maíz entre otras especies,



ha permitido estimar que cientos de genes están involucrados a nivel transcripcional en la respuesta a estrés hídrico y la afectan en diferentes niveles (Seki et al. 2002; Rabhani et al. 2003; Kawaguchi et al. 2004; Boominathan et al. 2004). A consecuencia de este estrés, también se ve alterada la transcripción de ciertos genes implicados en la síntesis y metabolismo de ácido jasmónico (JA), ABA, SA y etileno (ET). Ma et al. (2006) pusieron en evidencia la complejidad de las respuestas a estrés; estos autores analizaron 1500 genes mediante técnicas de micro-arreglos de DNA, de los cuales aproximadamente el 25% responden a tratamientos de estrés u hormonas.

El control genético de la respuesta al estrés hídrico es esencial para definir cuales genes podrían servir como marcadores en los distintos estadios fisiológicos de la planta y cuales productos génicos pueden ser considerados metabolitos secundarios inducidos por este estrés (Sorrells et al. 2000). Por ello, el uso de marcadores moleculares neutros de genes ligados a la tolerancia a estrés hídrico (microsatélites) de la población segregante F2, y los datos fenotípicos en condiciones de estrés hídrico, permitirán definir las asociaciones marcador-gen o marcador -QTL y finalmente determinar las distancias en los ligados y cuantificar la participación relativa de cada QTL en la expresión total del carácter en evaluación. Esto proveería una rápida selección de alelos en programas de mejoramiento (Al-Chaarani 2005) e incrementaría la eficiencia de transferencia de estos genes de interés a nuevas líneas endogámicas "elite" de girasol con la finalidad de desarrollar híbridos tolerantes a sequía.

En adición a la problemática planteada, cabe mencionar que en algunas campañas agrícolas el cultivo de girasol presenta problemas de dormición en sus semillas, lo cual representa un importante retraso para la siembra inmediata y conlleva dificultades en su comercialización. En esta especie la dormición impuesta por el embrión comprende un corto período de tiempo (4 a 8 semanas), mientras que aquella inducida por la cubierta seminal y el pericarpo persiste generalmente por más de 32 semanas. En general, los híbridos mostraron elevados niveles de dormición en relación a otros genotipos cultivados (Maiti et al. 2005), inclusive el mismo genotipo presentó variabilidad de acuerdo a su origen (condición agro-ecológica). Además, el girasol es un excelente modelo para estudiar el proceso de dormición porque sus semillas están profundamente dormidas al momento de cosecha, disminuyendo progresivamente durante el período de almacenamiento (Corbineau et al. 1990; Corbineau y Côme 2003).

La germinación y dormición de semillas están reguladas por la acción simultánea de diferentes fitohormonas las cuales actúan promoviendo o inhibiendo dichos procesos. Así, el balance hormonal entre ABA y giberelinas (GAs) juega un rol central en la modulación de la germinación y/o dormición (Nambara y Marrion-Poll 2005; Feurtado y Kermode 2007; Hilhorst 2007; Yamaguchi 2008). Otras hormonas como etileno, citocininas, auxinas, JA y brasinoesteroides pueden interactuar en dichos procesos (Kucera et al. 2006; Holdsworth et al. 2008). Más aún, se ha observado que el metabolismo de las hormonas vegetales depende uno de otro, y cambios en los niveles endógenos de una de ellas eventualmente altera el contenido de las otras (Preston et al., 2009). Numerosas evidencias demostraron que durante la imbibición de las semillas ABA se comporta como inductor de la dormición primaria y de su mantenimiento: sintetizado en el embrión contribuye a la imposición de la



dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006), en tanto que su síntesis de novo es un requisito para el mantenimiento de tal estado en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Cvi (Ali-Rachedi et al. 2004), *Nicotiana glauca* (Grappin et al. 2000) y *Helianthus annuus* (Le Page-Degivry y Garello 1992). En relación a esto, Millar et al. (2006) y Gubler et al. (2008) observaron que el mantenimiento de la dormición en *Arabidopsis* y cebada depende del balance entre síntesis y catabolismo de ABA (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). A nivel molecular, la mayoría de las modificaciones bioquímicas y fisiológicas que ocurren durante los procesos de germinación y/o dormición de semillas están regidas por la expresión de diversos grupos de genes (Toorop et al. 2005; Pestsova et al. 2008; Preston et al. 2009). Las modificaciones en la expresión de algunos genes que codifican enzimas del metabolismo de ABA y GAs son considerados los principales reguladores genéticos de estos procesos. En tal sentido, estudios en semillas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana glauca* demostraron que genes asociados con la síntesis y desactivación de ABA y GAs están recíprocamente regulados durante el mantenimiento y remoción de la dormición (Bove et al. 2005; Cadman et al. 2006; Finch-Savage et al. 2007).

Hipótesis

- 1.- En oleaginosas como girasol existen germoplasmas tolerantes y sensibles a estrés hídrico que presentan perfiles genéticos y hormonales diferentes en respuesta a sequía durante la germinación y el crecimiento vegetativo.
- 2.- Semillas de líneas endocriadas de girasol con diferente grado de dormición a la cosecha evidencian cambios en el poder germinativo y en los perfiles hormonales.

Objetivo general

Nuestro grupo ha caracterizado líneas de girasol en condiciones de campo en conjunto con el INTA Manfredi durante todo el ciclo de cultivo y en laboratorio desde la siembra hasta la obtención de plántula en respuesta a condiciones de estrés hídrico. Entre estas líneas se determinaron la B59 como sensible y las HAR4, B71 y R432 como tolerantes (Andrade et al., 2009). Además se detectaron cambios en la configuración hormonal de semillas generadas bajo irrigación o sequía en las líneas B59 y B71 (Vigliocco et al. 2007; Andrade et al. 2009). Por otra parte, y a fin de profundizar la caracterización de la respuesta a estrés hídrico, se generaron dos poblaciones segregantes F2 a partir del cruzamiento de las líneas B59 x B71 y B59 x R432, cuyas parentales propiedad del INTA Manfredi se caracterizaron genotípicamente con marcadores moleculares neutros, los cuales actualmente se encuentran en revisión. Las familias F3 (B59 x R432) se evaluaron fenotípicamente a través de parámetros morfo-fisiológicos y perfiles hormonales durante el crecimiento vegetativo temprano (V2), y genotípicamente las plantas F2 provenientes del mismo cruzamiento. Se encuentra en avance la evaluación genotípica y fenotípica de las líneas endocriadas recombinantes (RILs) (F6) del mismo cruzamiento durante el crecimiento vegetativo tardío (V6).



En relación a la segunda hipótesis nuestro grupo se encuentra abocado a la caracterización fisiológica de semillas de dos líneas endocriadas de girasol con diferente capacidad germinativa al momento de cosecha. Resultados preliminares han permitido detectar diferencias en este parámetro, estableciéndose la línea B123 como dormante y la línea B91 como no dormante. A partir de las implicancias que tendría conocer las respuestas a estrés hídrico durante la germinación y el crecimiento vegetativo -etapas que a campo impactan en el rendimiento de granos y materia grasa- así como los mecanismos que regulan la germinación y/o dormición de las semillas en germoplasmas de girasol, proponemos como objetivo general de este proyecto "caracterizar germoplasma de girasol mediante parámetros fisiológicos genéticos en estrés hídrico durante germinación y crecimiento y dormición durante la etapa de germinación".

Objetivos específicos

- 1- Determinar la concentración de hormonas (JAs, ABA y catabolitos y SA) en semillas y plántulas de girasol de las líneas endocriadas B59 y B71, en condiciones óptimas de humedad, sometidas a estrés hídrico y/o inhibidores hormonales.
- 2- Detectar y caracterizar locus polimórficos en plantas de plantas de líneas parentales (B59; B71 y R432) y su población segregante (F2) y en las líneas RILs (F6) (cruzamientos B59 x B71 y B59 x R432) mediante la utilización de microsatélites.
- 3.- Evaluar fenotípicamente las familias F3 del cruzamiento B59 x B71 en crecimiento vegetativo temprano (V2) y las líneas RILs (F6) de los cruzamientos B59 x B71 y B59 x R432 en crecimiento vegetativo tardío (V6).
- 4- Determinar el poder germinativo y cuantificar los niveles endógenos de ABA, GAs, JAs, SA y ácido indol-3-acético (AIA) en semillas secas y embebidas de las líneas endocriadas dormante (B123) y no dormante (B91), correlacionando ambos parámetros.
- 5- Aislar e identificar genes que se expresen diferencialmente en semillas secas y embebidas de las líneas mencionadas en el objetivo 4.

Material vegetal

Se utilizarán semillas de girasol de las líneas endocriadas B59, B71, R432, B123 y B91 (INTA Manfredi)

Objetivo específico 1

Ensayo de germinación en semillas

Para evaluar la velocidad de germinación, las semillas se sembrarán en bandejas entre toallas de papel humedecidas a saturación con las soluciones de imbibición (tratamientos): 1- Agua destilada (control); 2- Manitol 400 mM (agente de estrés hídrico severo); 3- SHAM 10 μ M (inhibidor de la síntesis de JA) y 4- Manitol 400 mM+SHAM 10 μ M, y se colocarán en cuartos ambientales Conviron programados según condiciones antes descriptas. Para cada tratamiento se determinará el tiempo requerido para alcanzar el 50% de germinación (T50%), el cual permitirá comparar los efectos de diferentes



edades de las semillas y tratamientos sobre la germinación (Gosparini et al., 2005). La evaluación de la capacidad germinativa se efectuará por recuento de semillas germinadas a T50% para cada tratamiento. Como criterio de germinación se considerará la profusión de la radícula a través del pericarpo. Las semillas germinadas se cosecharán, congelarán en N₂ líquido, liofilizarán y seccionarán en embrión (eje embrionario+cotiledones) y pericarpo. Estas partes se conservarán a -80 °C hasta la determinación de JA y OPDA.

Ensayo de germinación en plántula

Cien semillas de las líneas B59 y B71, desinfectadas con hipoclorito de sodio 3%, se sembraron en bandejas plásticas entre toallas de papel humedecidas a saturación con agua destilada. Se colocaron a germinar en cámara de crecimiento Conviron E15 con un fotoperíodo de 8 h de osc. a 20°C y 70% de HR y 16 h de luz (130 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 28°C y 65% de HR, por el término de 48 h. Como criterio de germinación se considero la profusión de la radícula a través del pericarpo. Se cosechó el 50% de semillas germinadas a las 48 h.

Ensayo de crecimiento y tratamiento de estrés hídrico

Las semillas germinadas a las 48 h se transplantarán a bandejas plásticas conteniendo arena fina como sustrato. El contenido hídrico al momento de la siembra será de 60% de la capacidad de campo. A los 4 días del transplante (6 días de edad de las plántulas) se comenzo a aplicar los tratamientos: 1- riego a capacidad de campo cada 3 días mediante ascenso capilar con solución de Hoagland 50% de fuerza iónica (control); 2- estrés hídrico proporcionado mediante riego con solución de manitol 400 mM durante 8 días.

Determinaciones hormonales

Para la extracción y purificación se utilizará el protocolo modificado de Durgbanshi et al. (2005). Se utilizará 200 mg de peso seco de parte aérea y radical de plántulas (controles y estresadas) y se triturará en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). A la mezcla obtenida se adicionarán los correspondientes estándares deuterados, se homogeneizará y mediante una partición líquido-líquido con éter etílico se purificará. Posteriormente se secará en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspenderán con metanol, se filtrarán y finalmente se secarán a temperatura ambiente en SpeedVac. La identificación y cuantificación se realizará mediante Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas Tándem (LC-ESI/MS-MS), en modo Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM). Los valores de concentración de cada hormona se obtendrán mediante curvas de calibración para el compuesto endógeno y su estándar deuterado. Los valores se expresarán en pmol de hormona por gr. PS⁻¹. El software ha utilizar será MassLynx TM v.4.1.

Objetivo específico 2

Material vegetal

Se generaron plantas de poblaciones segregantes F2 provenientes del cruzamiento de las líneas endocriadas B59 y B71 y líneas RILs (F6) obtenidas de los cruzamientos B59 x B71 y B59 x R432.



Extracción de DNA

El DNA se extraerá de hojas provenientes de plantas en estado vegetativo, pertenecientes a las líneas parentales y a cada una de las progenies F2 y a las líneas RILs (F6) mediante el protocolo CTAB (Hoisington et al. 1994).

Análisis molecular con marcadores microsatélites

Se continuara el análisis de las líneas parentales y de las familias F2 provenientes de la autofecundación de la F1 resultante del cruzamiento de los parentales enunciados anteriormente y de las líneas RILs (F6) obtenidas de los cruzamientos B59 x B71 y B59 x R432.

Objetivo específico 3

Ensayo de crecimiento y tratamiento de estrés hídrico

Se utilizarán plántulas de las familias F3 (B59 x B71) de 11 días post-siembra crecidas en laboratorio bajo condiciones control y de estrés hídrico generado por aplicación de manitol 400 mM.

Las líneas RILs (F6) serán obtenidas de los cruzamientos B59 x B71 y B59 x R432 en invernáculo bajo condiciones control y de estrés hídrico moderado (-0.65 MPa) durante la etapa de crecimiento vegetativo tardío (V6). El diseño experimental consistirá en parcelas sub-divididas con 6 repeticiones (macetas individuales).

Determinaciones morfo-fisiológicas y hormonales

En las familias F3 el recuento final de germinación (RFG) se determinará a los 11 días post-siembra considerando aquellas plántulas cuya longitud de parte aérea y/o radical sea igual o mayor a 0,5 cm y se descartarán las que presenten anomalías según criterios establecidos por reglas de la International Seed Testing Association (ISTA). El peso fresco (PF) y seco (PS) se evaluará en las plántulas normales obtenidas.

En las líneas RILs (F6) las variables a determinar serán área foliar, peso fresco y materia seca relativa al final del período de estrés.

El contenido hormonal endógeno (JAs, ABA y SA) se evaluará en plántulas de las familias F3 y en hojas jóvenes de las líneas RILs según protocolo descrito en objetivo específico 1.

Construcción de mapa genético o Análisis de Segregantes Agrupados (BSA)

El mapeo de genes o BSA (según corresponda) se realizará utilizando los datos genéticos obtenidos a través de los marcadores moleculares neutros citados anteriormente y las determinaciones fenotípicas (variables fisiológicas y hormonales) de las plantas de la familia F3 y de las líneas RILs (F6).

Objetivo específico 4

Material vegetal

Semillas de las líneas endocriadas dormante (línea B123) y no dormante (línea B91) (INTA Manfredi).

Determinación de poder germinativo

Veinticinco semillas (por repetición) se colocaran a germinar entre toallas de papel húmedo bajo condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento Conviron E15 con un fotoperíodo de 8 h de osc. a 20°C y 70% de HR y 16 h de luz (130 μ E.m².s⁻¹) a 28°C y 65% de HR.



El recuento de germinación se realizará a los 4 días post-siembra (energía germinativa) y a los 10 días post-siembra (poder germinativo), según reglas ISTA para la especie en estudio. Se considerarán germinadas aquellas semillas que presenten la emergencia de la radícula.

Condiciones de imbibición de las semillas y determinaciones hormonales
Veinticinco semillas (por repetición) se colocarán a germinar entre papel húmedo bajo condiciones ambientales generadas por una cámara de crecimiento Conviron E15 con un fotoperíodo de 8 h de osc. a 20°C y 70% de HR y 16 h de luz (130 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 28°C y 65% de HR. A las 3, 6, 12, 18 y 24 hs de imbibición se recolectarán las semillas y se separarán en embrión y pericarpo.

El contenido hormonal endógeno (ABA, GAs, JAs, SA y AIA) se ha evaluado en pericarpo y se encuentra en evaluación las pertenecientes al embrión de semillas las líneas B123 y B91 según protocolo descrito en objetivo específico 1.

Objetivo específico 5

Evaluación de la expresión de genes por PCR-semicuantitativa

Los niveles de expresión de los genes candidatos NCED1, AAO3, ABA-8'-OH, GT, β -Glucosidasa, ABI5 (factor de transcripción relacionado a la señalización de ABA), GA20-ox (GA20-oxidasa), GA2-ox (GA2-oxidasa) y GA3oxs (GA3 β -hidroxilasa) serán probados en embrión de semillas secas y embebidas. Para ello, se empleará la metodología de PCR-semicuantitativa. El RNA total se extraerá de 200 mg de peso fresco utilizando el reactivo de TRIZOL (Invitrogen, Argentina), según especificaciones del fabricante. La transcripción reversa (RT) se realizará a partir de 1 μg de RNA total tratado con DNasas, utilizando First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Argentina) según protocolo descrito por el fabricante.

Análisis estadísticos

Los datos de parámetros morfo-fisiológicos se analizarán con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1 (Manugistics 1997) empleando el test ANNOVA simple por comparación de medias de las variables evaluadas. Se empleará a posteriori un test de Rangos Múltiples de diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher; $p \leq 0.05$). Para el análisis de perfil metabólico se realizarán comparaciones por parejas empleando el Test t de Student a fin de detectar picos cromatográficos cuyas áreas hayan sido significativamente alteradas. Los datos transcriptómicos se analizarán utilizando la plataforma Babelomics. Para el mapeo de genes o regiones genómicas asociadas a genes de tolerancia a estrés hídrico se realizará un ANNOVA monofactorial. Para la construcción del mapa de ligamiento se llevará a cabo un análisis multi-punto a través del programa MapMaker/Exp versión 3.0. Se realizarán pruebas Chi-cuadrado para cada marcador a fin de verificar la proporción mendeliana esperada, la cual en ausencia de distorsión de la segregación deberá ser 1:2:1.



Bigliografía

- Al-Chaarani G.R.** 2005. Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.* 169: 221-227.
- Ali-Rachedi S., Bouinot D., Wagner M.-H., Bonnet M., Sotta B., Grappin P., Jullien M.** 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Island, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479-488.
- Andrade A., Vigliocco A., Alemano S., Alvarez D., Abdala G.** 2009. Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Sci. Res.* 19: 201-211.
- Andrich G., Balzini S., Zinnai A., Silvestri S., Galoppini C.** 1996. The effect of drought stress on some characteristics of sunflower seeds. *Agric. Med.* 126: 285-291.
- Arbona V., Argamasilla R., Gómez-Cadenas A.** 2010. Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Journal of Plant Physiology* 167: 1342-1350.
- Bandurska H., Stroński A.** 2005 The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol. Plant.* 27: 379-386.
- Bino R.J., Hall R.D., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J., Nikolau B.J., Mendes P., Roessner-Tunali U., Beale M.H., Trethewey R.N., Lange B.M., Wurtele E.S., Sumner L.W.** 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.* 9: 418-425.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G.** 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Boominathan P., Shukla R., Kumar A., Manna D., Negi D., Verma P.K., Debasis C.** 2004. Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol.* 135: 1608-1620.
- Bove J., Lucus P., Godin B., Oge´ L., Jullien M., Grappin P.** 2005. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signalling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.* 57: 593-612.
- Boyer J.S.** 1982. Plant productivity and environmental. *Science* 218: 443-448.
- Bray E.A.** 1997. Plant response to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48-54.
- Cadman C.S.C., Toorop P.E., Hilhorst H.W.M., Finch-Savage W.E.** 2006. Gene expression profiles of *Arabidopsis Cvi* seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* 46: 805-822.
- Corbineau F., Bagniol S., Côme D. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed dormancy and its regulation by ethylene. *Isr. J. Bot.* 39: 313-325.
- Corbineau F., Côme D.** 2003. Involvement of energy metabolism and ABA in primary and secondary dormancies in coat (*Avena sativa* L.) seeds: a physiological approach. En: *The biology of seeds: recent research advances.* (Eds.) Nicolas G., Bradford K.J., Côme D., Pritchard H. Oxford: C.B.A. International. pp.: 113-120.



- Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O., Miersch O., Sancho J.V., Gómez-Cádenas A.** 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8437-8442.
- Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L.** 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 763-769.
- Feurtado J.A., Kermode A.R.** 2007. A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. En: *Seed Development, Dormancy and Germination.* (Eds). Bradford K., Nonogaki H.. Annual Plants Reviews 27. Blackwell Publishing. Oxford. pp.: 176-223.
- Finch-Savage W.E., Cadman C.S.C., Toorop P.E., Lynn J.R., Hilhorst H.W.M.** 2007. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J.* 51: 60-78.
- Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523. Grappin P., Bouinot D., Sotta B., Miginiac E., Jullien M. 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285.
- Gubler F., Hughes T., Waterhouse P., Jacobsen J.** 2008. Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellins metabolism. *Plant Physiol.* 147: 886-896.
- Hayat S., Hasan S.A., Fariduddin Q., Ahmad A.** 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *J. Plant Int.* 3: 297-304.
- Hilhorst H.W.M.** 2007. Definitions and hypotheses of seed dormancy. En: *Seed development, dormancy, and germination.* (Eds.) Bradford K., Nonogaki H. Blackwell Publishing, Oxford. pp.: 50-71.
- Hoisington D., Khairallah M., González De León D.** 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2.ed. Mexico, D. F.: CIMMYT. 51 pags.
- Holdsworth M.J., Bentsink L., Soppe W.J.J.** 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179: 33-54.
- Iqbal N., Ashraf M., Ashraf M.Y., Azam F.** 2005. Effect of exogenous application of glycinebetaine on capitulum size and achene number of sunflower under water stress. *Int. J. Biol. and Biot.* 2: 765-771.
- Kawaguchi R., Girke T., Bray E.A., Bailey-Serres J.N.** 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38:823-839.
- 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.
- Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G.** 2006. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.



- Le Page-Digivry M.-T., Garello G.** 1992. In situ abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus*. *Plant Physiol.* 98: 1386-1390.
- 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.
- Leung J., Giraudat J.** 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** 2001. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods* 25: 402-408.
- Lorens G.F., Bennet J.M., Loggale L.B.** 1987. Differences in drought resistance between two corn hybrids. II. Component analysis and growth rates. *Agr. J.* 79: 808-813.
- Ma S., Gong Q., Bohnert H. 2006. Dissecting salt stress pathways. *J Exp. Bot.* 57: 1097-1107.
- Miersch O., Neumerkel J., Dippe M., Stenzel I., Wasternack C.** 2008. Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.* 177: 114-127.
- Maiti R.K., Vidyasagar P., Shahapur S.C., Seiler G.J.** 2005. Genotypic variability in seed dormancy in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes and the effects of priming in breaking dormancy and improving seedling vigour. *Crop Res.* 30: 291-298.
- Millar A.A., Jacobsen J.V., Ross J.J., Helliwell C.A., Poole A.T., Scofield G., Reid J.B., Gubler F.** 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45: 942-954.
- Munne-Bosch S., Peñuelas J.** 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217: 758-766.
- Nambara E., Marion-Poll A. 2005. Abscisic Acid biosynthesis and metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.
- Penninckx I., Eggermont K., Terras F.R.G., Thomma B.P.H.J., De Samblanx G.W., Buchala A., Métraux J.-P., Manners J.M., Broekaert W.F.** 1996. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pestsova E., Meinhard J., Menze A., Fischer U., Windhovel A., Westhoff P.** 2008. Transcript profiles uncover temporal and stress-induced changes of metabolic pathways in germinating sugar beets seeds. *BMC Plant Biol.* 8: 122-142.
- Petcu E., Arsintescu A., Stanciu D. 2001. The effect of drought stress on fatty acid composition in some Romanian sunflower hybrids. *Rom. Agric. Res.* 15: 39-42.
- Preston J., Tatematsu K., Kanno Y., Hobo T., Kimura M., Jikumaru Y., Yano R., Kamiya Y., Nambara E.** 2009. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol.* 50: 1786-1800.



- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Ayub Khan M., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.* 133: 1755-1767.
- Reddy G.K.M., Dangi K.S., Kumar S.S., Reddy A.V.** 2003. Effect of moisture stress on seed yield and quality in sunflower, *Helianthus annuus* L. *J Oilseeds Res.* 20: 282-283.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K.** 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279-292.
- Sorrells M.E., Diab A., Nachit M.M.** 2000. Comparative genetics of drought tolerance. En: *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region, New Challenges: Proceedings of the Seminar: Zaragoza, Spain; 12-14 Apr.* (Eds.) Royo C., Nachit M., Di Fonzo N., Araus J. L. *Option Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens.* pp: 191-201.
- Toorop P.E., Barroco R.M., Engler G., Groot S.P.C., Hilhorst H.W.M.** 2005. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta* 221: 637-647.
- Vigliocco A., Alemano S., Miersch O., Alvarez D., Abdala G.** 2007. Endogenous jasmonates during sunflower germination in seeds from plants grown under different soil moisture content. *Seed Sci. Res.* 17: 91-98.
- Wasternack C.** 2005. Jasmonates. Introductory remarks on biosynthesis and diversity in actions. *J. Plant Growth Regul.* 23: 167-169.
- Wasternack C., Hause B.** 2002. Jasmonates and octadecanoids - Signals in plant stress responses and development. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 165-221.
- Xiong L., Zhu J.K.** 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133: 29-36.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-51.
- Zhu J.K.** 2002 Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 247-273.

Proyecto II.

Efectos fisiológicos y productivos de *Achromobacter xylosoxidans* y *Bacillus pumilus* sobre plantas de girasol



Antecedentes

En el ciclo de vida de una planta, la germinación y el crecimiento de las plántulas son condicionantes de la productividad de los cultivos, y ambos estadios son muy sensibles a estrés (Bewley y Black, 1994; Koornneef y col., 2002). Estas condiciones de estrés no sólo modifican el desarrollo de las plantas sino también causan alteraciones en la rizósfera de los cultivos, donde se desarrollan rizobacterias con capacidad de colonizar las raíces. Bacterias asociadas con el crecimiento de plantas en condiciones de estrés crónico se han adaptado a dichas condiciones lo cual proveen beneficios a las plantas. Así, bacterias crecidas en sitios donde el agua es limitada o donde se suceden frecuentes períodos de sequía promueven en mayor medida el crecimiento de plantas que bacterias crecidas en sitios donde el agua es abundante (Mayak y col., 2004).

Estos microorganismos benéficos de vida libre fueron definidos por Bashan y col., 1998, como bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPB). Por ej. en cultivos de interés comercial (por ej. soja) la estimulación del crecimiento de las plantas por la inoculación con *B. japonicum* se produce a través de un incremento en la emergencia, vigor y peso de plántulas, un mayor desarrollo del sistema radical y un incremento en la fijación de nitrógeno (Dashti y col., 1997). La promoción del crecimiento por PGPB puede ocurrir por dos vías, una de ellas afecta directamente el metabolismo de la planta, y la otra la previene de los efectos deletéreos provocados por fitopatógenos (Bashan y col., 2008). Entre las PGPB se mencionan diversos géneros tales como:

Achromobacter, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y otros.

Para favorecer el establecimiento de bacterias benéficas en los cultivos, una de las estrategias más utilizadas es la pre-selección de microorganismos que se encuentran en la zona próxima a la raíz (bacterias del rizoplano) o dentro de los tejidos radicales (bacterias endofíticas). Las cepas "nativas" aisladas de la rizósfera promueven mejor el crecimiento de las plantas en comparación a cepas aisladas en otras regiones. La introducción de bacterias benéficas "no nativas" en la rizósfera de cultivos de interés agronómico no ha arrojado resultados muy satisfactorios, debido a la presencia de comunidades microbianas pre-establecidas. Este es el caso de experimentos de inoculación de plantas de girasol con bacterias no específicas, como por ej. *Azospirillum*.

En girasol, nuestro grupo de trabajo informó el aislamiento de *Bacillus* sp. (99.9% idéntico a *Bacillus pumilus*), y *Achromobacter* sp. (99.9% idéntico a *Achromobacter xylosoxidans*) de raíces de plantas cultivadas en irrigación y sequía (Forchetti y col., 2007). Las cepas aisladas de girasol pertenecientes al género *Bacillus* son bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, con alta tolerancia a condiciones ambientales adversas. Debido a su capacidad de formar esporas, las cepas de *Bacillus* se adaptan fácilmente a formulaciones comerciales para aplicar a campo (Liu y Sinclair, 1993; Vendan y Thangaraju 2006). *Achromobacter* sp. son bacilos Gram-negativos, aerobios, no formadores de esporas. Este género fue reportado por Koch y Oya (1974) como una especie de vida libre fijadora de nitrógeno.



Es importante destacar que en la "rizósfera", término que describe la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia del sistema radicular de las plantas (Garate y Bonilla, 2000), existen exudados radicales de distinta naturaleza química: hormonas, aminoácidos, péptidos, proteínas, azúcares, polisacáridos y ácidos orgánicos. Estos compuestos son aportados al suelo y utilizados por los microorganismos allí presentes como fuente energética y como señalización por parte de la planta, produciéndose en la rizósfera la interacción planta-microorganismo. Actualmente existen nuevos abordajes al estudio de las respuestas fisiológicas de la planta en situaciones de estrés o en su interacción con microorganismos benéficos. Tales estudios corresponden a la metabolómica (campo emergente de la investigación postgenómica), particularmente importante dado que un metaboloma representa el fenotipo final producido por la perturbación de la expresión génica y la modulación de las funciones de las proteínas, alteraciones causadas por ejemplo, por situaciones de estrés ambiental.

Desde el punto de vista fisiológico, una de las primeras respuestas de la planta al estrés hídrico es el incremento en la síntesis de fitohormonas, particularmente a estrés hídrico. Nuestro grupo identificó y cuantificó ácido jasmónico (JA), su precursor el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y ácido abscísico (ABA) en el medio de cultivo de las 3 cepas seleccionadas; además, el contenido de estos compuestos incrementó cuando las cepas se sometieron a estrés (Forchetti y col., 2007). Asimismo se han detectado en medios de cultivo líquido de *B. pumilus* y *B. licheniformis* bajo condiciones normales, auxinas (Gutiérrez-Mañero y col., 1996) y giberelinas GA1, GA3, GA4 y GA20 (Gutiérrez-Mañero y col., 2001). Por otra parte, la co-inoculación con cepas nativas de girasol se ha propuesto como una nueva herramienta tecnológica en la formulación de inoculantes. Se busca combinar características de cada microorganismo, con la finalidad de potenciar de manera sinérgica los mecanismos de promoción de crecimiento en las plántulas (Bashan y Holguin, 1997 a y b). El efecto sinérgico se debe a 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, 1997 b).

Existe una nueva tendencia comercial mediante la cual estos productos se le incorporan otros aditivos como sustancias promotoras del crecimiento que mejoran la "performance" del mismo en las etapas tempranas. En este sentido, estudios realizados por Rong-Min YU y col., (2006) mostraron que la aplicación exógena de fitohormonas favorece el crecimiento de los pelos radicales en *Polygonum multiflorum*, lo cual concuerda con hallazgos obtenidos por Weathers y col. (2005) en *Artemisia annua*.

Actualmente, algunas industrias agropecuarias realizan aplicaciones exógenas de sustancias a través del peleteo de semillas, el cual consiste en agregado en capas con diferentes "aditivos". Estos podrían, por un lado disminuir la dificultad de siembra por la diversidad del tamaño de las semillas (Pasturas y Forrajes, 2011) y por otro complementar los progresos genéticos aportando condiciones óptimas para la germinación y desarrollo de las plántulas, asegurando una adecuada inoculación y logrando una mayor eficiencia de implantación.



Los componentes del peleteado en contacto con el suelo forman un halo alrededor de la semilla la cual al germinar absorbe los productos adicionados, traslocándose los mismos a las distintas partes de las plántulas, protegiéndolas en los primeros estadios de diversos factores biológicos, físicos y químicos, y estimulando su crecimiento (Nitragin, 2011; Polovo y col., 2000).

Hipótesis

- 1.- Los perfiles hormonales son diferentes en plantas de girasol y en su rizósfera, cuando son inoculadas con cepas de *Achromobacter xylosoxidans* (SF2) y de *Bacillus pumilus* (SF3 y SF4).
- 2.- La inoculación con las cepas individuales ó combinadas *Achromobacter xylosoxidans* y *Bacillus pumilus*, como con el agregado de reguladores del crecimiento, beneficiará el establecimiento de plántulas y rendimiento del cultivo de girasol.

Objetivo general

Nuestro grupo realizó el aislamiento de cepas bacterianas de *Bacillus pumilus* (cepas SF3; SF4 y SF5) y *Achromobacter xylosoxidans* (cepa SF2), a partir de raíces de plantas de girasol cultivadas en irrigación y sequía (Forchetti et al., 2007). Las bacterias endofíticas aisladas de plantas cultivadas en sequía, cepas SF2; SF3; SF4 y SF5, inhibieron el crecimiento de hongos específicos de girasol, principalmente de *Verticillium dahliae* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta capacidad biocontroladora mejoraría indirectamente el crecimiento de las plantas en condiciones ambientales normales y de estrés. Dado que las condiciones de estrés no sólo afectan el crecimiento de las plantas sino también el de las bacterias asociadas, las cepas SF2, SF3 y SF4 se expusieron a estrés hídrico severo. Se comprobó que la cepa SF4 presentó mayor velocidad de crecimiento, demostrando así una mejor adaptación a la sequía. Además, las tres cepas mencionadas presentaron actividad ACC-deaminasa, indicando que esta capacidad podría aliviar indirectamente el estrés generado en las plantas (Forchetti y col., 2007). Recientemente informamos la capacidad de estas cepas de incrementar el crecimiento de plántulas de girasol paraíso 24 (comercial) y de las líneas endocriadas B59 y B71, crecidas *in vitro* y sometidas a estrés hídrico (Forchetti y col., 2010). Por otra parte, ensayos "in vitro" de co-inoculación de las cepas en evaluación, han demostrado que la combinación de la cepas SF2-SF3 y SF3-SF4 produjeron la mejor respuesta en condiciones de estrés hídrica (Irigaray, 2010). Ensayos a campo en dos ó tres campañas agrícolas (en evaluación), han dado resultados promisorios aunque sin presentar diferencias estadísticamente significativas hasta el momento. A partir de ello es que se propone "Evaluar la señalización *in vitro* entre cepas SF2, SF3 y SF4 y la planta de girasol y el efecto de la aplicación de reguladores exógenos. Además se propone valorar la estabilidad de las cepas y la acción de estas bacterias nativas en la producción de este cultivo a campo, con y sin adicionar reguladores de crecimiento ó cuando se aplican en forma combinada".



Objetivos específicos

1- Cuantificar los niveles endógenos de giberelinas, auxinas, citocininas, jasmonatos y ácido salicílico en el medio de crecimiento de plántulas de girasol, en raíz y parte aérea de las mismas, provenientes de semillas inoculadas con SF2, SF3 y SF4, crecidas en condiciones control y de estrés hídrico.

2- Determinar el efecto "*in vitro*", que causan promotores del crecimiento e inóculos bacterianos aplicados a semillas de girasol peleteadas, en plántulas crecidas en condiciones control y de estrés hídrico y sobre rizosfera de plántulas crecidas en condiciones control.

3- Determinar el efecto a campo que causan promotores del crecimiento con o sin co-inóculos bacterianos SF2-SF3, SF2-SF4, SF3-SF4 aplicados a semillas de diferentes germoplasmas de girasol tratadas y/o peleteadas, con diferentes niveles de fertilización química.

4.- Determinar la viabilidad de las cepas SF2, SF3 y SF4 en función de la formulación del medio de cultivo y del tiempo de almacenamiento.

Materiales, Técnicas y Métodos

Objetivo específico 1

Ensayos con bacterias rizosféricas de vida libre

El material será generado *in vitro* en Argentina y consistirá en la interfase generada por cultivos hidropónicos inoculados con cepas SF2, SF3 y SF4, con y sin estrés hídrico generado con polietilenglicol 6000 (PEG) al 14,7 %. Se utilizará germoplasma comercial de girasol Paraíso 24. Veinticinco semillas inoculadas con las cepas bacterianas (1 ml de cultivo bacteriano con 10^8 ufc.ml⁻¹ + 160ul de adherente glucosado/ 100g de semillas) se colocarán en bandeja entre papel humedecido con agua destilada. Se llevarán a cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz (28°C) / 8 h oscuridad (20°C). Cumplidas las 72 h, las plántulas se trasplantarán a tubos de policloruro de vinilo (PVC) conteniendo solución Hoagland ½ carga iónica (sistema hidropónico) con o sin PEG. Los tratamientos serán: T (testigo sin inóculo), TP (Testigo sin inóculo y PEG), LB (Testigo de medio LB), inoculadas con SF2, SF3 y SF4, crecidas en Hoagland o PEG. Se realizarán 6 repeticiones. A los 14 días del trasplante se determinará longitud, peso fresco y seco de parte aérea y radical. El material vegetal, el exudado radical y el medio de cultivo bacteriano se liofilizará en un liofilizador LABCONCO FREZONE 45.



Determinación de fitohormonas

Se realizará en plántulas de girasol y en medio de la interfase planta-microorganismo (según lo explicitado en Materiales y Métodos). La extracción y purificación de JA, ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) y JA conjugado con isoleucina, (JA-Ile), ABA y catabolitos (ácido faseico, PA; ácido dihidrofaseico, DPA; ABA conjugado con glucosa, ABA-GE), ácido Indol-Acético (AIA), Giberelinas (GA3) y SA se llevará a cabo según protocolo de Durgbanshi et al. (2005) con modificaciones. Para ello, 200 mg de peso seco de parte aérea y radical de plántulas (controles y estresadas) se triturará en mortero con N₂ líquido y 5 ml de agua deionizada (solvente de extracción). La mezcla obtenida (ó en el caso de los exudados el sobrenadante de la interfase rizósfera de la planta - microorganismo) se transferirá a tubos falcon de 50 ml. Como estándares internos se adicionarán 50 ng de [2H₆]-JA, [2H₆]-ABA y [2H₄]-SA y 100 ng de [2H₅]-OPDA, [2H₃]-JA-Ile, [2H₃]-PA, [2H₃]-DPA y [2H₅]-ABA-GE, [2H₅]-AIA y [2H₂]-GA₃. Cada muestra se pasará brevemente por ultraturrax para completar la homogeneización y facilitar la equilibración de estándares. Luego se centrifugarán 15 min a 5000 rpm. Se recogerá el sobrenadante y se ajustará el pH a 2,8 con ácido acético 15%. Posteriormente se realizará una doble partición con éter etílico (1:1), se descartarán las fases acuosas y se recogerán las fases orgánicas, llevándose a sequedad en evaporador rotativo. Los extractos secos se resuspenderán con 1,5 ml de metanol, se filtrarán a través de un filtro de jeringa (velocidad de flujo menor a 1ml/min.) en cámara de vacío y se secarán a temperatura ambiente en SpeedVac.

Las muestras obtenidas en el paso anterior, serán disueltas en MeOH al 100% e inyectadas al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA.), utilizándose un gradiente de incremento lineal de 40 a 80 % de MeOH/H₂O/AcH (0.2%) en un tiempo de 25 min por corrida; luego de 1 min, el sistema será restituido a las condiciones iniciales de corrida, permitiéndose que se equilibre la columna durante 7 min. El flujo de corrida que se utilizará es de 0.2 ml.min⁻¹, y la columna utilizada, de fase reversa C18 de 100 mm x 2,1 mm x 3µm., de marca RESTEK.

La identificación y cuantificación de estos compuestos se realizará con un espectrómetro de masas con un triple cuadrupolo (Quattro Ultima, Micromass, Manchester, Reino Unido), acoplado al HPLC citado en el párrafo anterior. La fuente de ionización será electrospray negativo (ESI-) con un voltaje de capilar (kVol) 3.25, energía de cono 35 (Volt), temperatura de la fuente 120 °C y temperatura de solvatación 350 °C, flujo de gas (N₂) de cono 102 (Lts/h). Para la detección de iones se empleará el modo MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple), siendo las transiciones para ABA 263>153, SA 137>197, JA 209>259, JA-Ile 322>130, OPDA 291>169, AIA 175>130, GA₃ 345>221, y sus respectivos estándares deuterados: (2H₆)ABA 269>159, (2H₄)SA 141>197, (2H₆)JA 215>59, (2H₃)JA-Ile 325>130, (2H₅)OPDA 296>170, (2H₅)AIA 180>135 y (2H₂)GA₃ 347>223. Los valores de concentración se obtendrán mediante la relación de área del compuesto endógeno y el estándar interno deuterado, los cuales permitirán obtener los valores en pmol de hormona por gr. PS-1. El software a utilizar será MassLynx TM v.4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).



Objetivo específico 2

Determinación de la concentración hormonal rizosférica.

En los ensayos se utilizarán semillas de girasol Paraíso 24, las que se colocarán en macetas conteniendo arena estéril, y se llevarán a cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (28°C) / 8 h oscuridad (20°C). Las macetas se regaran por capilaridad con agua destilada y se cubrirán con bolsas transparentes. Al 4º día de iniciado el cultivo se quitarán las bolsa y se comenzara el tratamiento de riego con solución Hoagland con ½ fuerza iónica y con las soluciones de fitohormonas: ácido Salicílico (SA), ácido Jasmónico (JA), ácido giberelico (GA3), ácido indol acético (IAA) y Ácido Abscísico (ABA). Los tratamientos serán: **T**; plántulas testigo regadas con HOA; **HOA-SA** 1 ppm; plántulas regadas con -7M SA; **HOA-SA** 0.1 ppm; plántulas regadas con -8M SA; **HOA-JA** 0.1 ppm; plántulas regadas con -8M JA; **HOA-JA** 0.001 ppm; plántulas regadas con -10M JA; **HOA-GA3** 300 ppm; plántulas regadas con -4M GA3; **HOA-GA3** 30 ppm; plántulas regadas con -5M GA3; **HOA-IAA** 17 ppm; plántulas regadas con -5M IAA; **HOA-IAA** 0,17 ppm; plántulas regadas con -7M IAA; **HOA-ABA** 0,026 ppm; plántulas regadas con -7M ABA; **HOA-ABA** 0,0026 ppm; plántulas regadas con -8M ABA. La evaluación se realizará a los 18 días de iniciado el cultivo, siendo los parámetros a medir: diámetro de tallo de las plantulas, longitud aérea y radical, peso fresco y seco de raíces y parte aérea.

Del ensayo anterior se seleccionará la mejor concentración de cada hormona, y se las combinará para ser aplicada en semillas pre-inoculadas con las cepas de SF2, SF3 y SF4. Los tratamientos a evaluar serán: **T**; plántulas testigo regadas con HOA y sin inocular; **HOA-MH**; plántulas regadas con combinación hormonal óptima; **HOA-SF2**; plántulas inoculadas con SF2; **HOA-SF3**; plántulas inoculadas con SF3; **HOA-SF4**; plántulas inoculadas con SF4; **HOA-MH-SF2**; plántulas regadas con combinación hormonal e inoculadas con SF2; **HOA-MH-SF3**; plántulas regadas con combinación hormonal e inoculadas con SF3; **HOA-MH-SF4**; plántulas regadas con combinación hormonal e inoculadas con SF. El crecimiento se realizará en iguales condiciones a las mencionadas con anterioridad. La cosecha se realizará a los 18 días de iniciado el cultivo y se medirán: diámetro de tallo de las plántulas, longitud aérea y radical, peso fresco y seco de raíces y parte aérea.

Los experimentos se realizarán con 5 ensayos independientes totalmente aleatorios y los resultados serán analizados con el programa estadístico Statgraphics Plus, versión 3 (Manugistics, Rockville, Maryland, USA).

Peleteo de semilla con promotores de crecimiento y cepas bacterianas

Se utilizará germoplasma comercial de girasol Paraíso 24. Veinticinco semillas peleteadas con diferentes tratamientos se colocarán en bandeja entre papel humedecido con agua destilada, en cámara de crecimiento durante 72 h con un fotoperiodo de 16 h de luz (28°C) / 8 h oscuridad (20°C). Cumplidas las 72 h, las plántulas se trasplantarán a tubos de PVC conteniendo solución Hoagland ½ carga iónica, con y sin agregado de PEG 6000 a distintas concentraciones. Los tratamientos serán: **T** (Testigo, semilla sin peleteado);



T peleteado (semillas peleteadas con carbonato de calcio); **SF2** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF2); **SF3** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF3); **SF4** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF4); **Ptr** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y promotores de crecimiento.); **Ptr-SF2** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF2.); **Ptr-SF3** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF3); **Ptr-SF4** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF4.); Se realizarán 6 repeticiones. A los 14 días del trasplante se determinará longitud, peso fresco y seco de parte aérea y radical, y se identificarán y cuantificarán giberelinas, auxinas, citocininas, ácidos jasmónico y salicílico, en parte aérea y parte radical, mediante protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005).

Peleteo de semilla con promotores de crecimiento y cepas bacterianas en suelo

En los ensayos se utilizarán semillas de girasol Paraíso 24 peleteadas con promotores de crecimiento e inóculos bacterianos según el tratamiento. Las semillas se colocarán en macetas conteniendo suelo, al cual se le realizarán previamente determinaciones de composición, y se llevarán a cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (28°C) / 8 h oscuridad (20°C). Las macetas se regarán por capilaridad con agua destilada y se cubrirán con bolsas transparentes. Al 4º día las bolsas serán retiradas y se comenzará el tratamiento de riego con solución Hoagland con ½ fuerza iónica. Los tratamientos serán: **T** (Testigo, semilla sin peleteado); **T peleteado** (semillas peleteadas con carbonato de calcio); **SF2** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF2); **SF3** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF3); **SF4** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y SF4); **Ptr** (semillas peleteadas con carbonato de calcio y promotores de crecimiento.); **Ptr-SF2** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF2.); **Ptr-SF3** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF3); **Ptr-SF4** (semillas peleteadas con carbonato de calcio, promotores de crecimiento y SF4.); Se realizarán 6 repeticiones. A los 14 días del trasplante se determinará longitud, peso fresco y seco de parte aérea y radical, y se identificarán y cuantificarán giberelinas, auxinas, citocininas, ácidos jasmónico y salicílico, en rizosfera y material vegetal, en mediante protocolo modificado de Durgbanshi y col. (2005).

Determinación de fitohormonas

La extracción y purificación de fitohormonas de medios de crecimiento líquido y extractos vegetales, se realizara mediante particiones con dietiléter (Durgbanshi y col. 2005). Se utilizaran como estándares internos: (²H₅)AIA, (²H_x)GAs, (²H₄)SA, (²H₆)JA (OIChemIm Ltd, Olomouc, Czech Republic). La identificación y cuantificación se realizará según los descrito en el objetivo 1. En el caso de suelo, se determinará en rizoplano (suelo adherido a la raíz) y ectorrizosfera (suelo circundante a la raíz). Para el primer caso las raíces se lavaran en 20 ml de agua destilada-desionizada, para el segundo caso se diluirá 3 g de suelo en 20 ml agua destilada-deionizada, se agitará en shaker durante 30 minutos y se centrifugará 10 min 3000 rpm. Se purificará el sobrenadante, y se identificarán y cuantificarán fitohormonas por Durgbanshi y col., (2005).

Análisis estadístico



Los datos de laboratorio se analizarán con una ANOVA, en caso de ser paramétricos y en su defecto se utilizará el test de Kruskal-Wallis para ensayos no paramétricos, utilizando a posteriori un Test de Rangos Múltiples. El software a utilizar es Statgraphics Plus, v.3 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

Objetivo específico 3

Determinación del efecto de co-inoculación y reguladores de crecimiento a campo.

Ensayos de Co-inoculación en diferentes germoplasmas.

Se evaluará en híbridos comerciales de uso actual provenientes del sector privado como público (INTA), lo cual permitirá una evaluación pre-comercial de estas cepas. Tales ensayos serán coordinados y/o ejecutados por el INTA EEA Manfredi en diferentes localidades del país, ello según los instrumentos formales que considere pertinente el INTA, siendo las cepas para estos ensayos provistos por nuestra Universidad.

Los co-inoculos a utilizar son SF2-SF3, SF2-SF3, SF3-SF4 utilizándose un diseño experimental Alpha Lattice con 4 repeticiones al azar, colocadas en 3 hileras de 5.10 metros. Los tratamientos serán: **T**, plantas sin inocular y sin fertilizante; **TN**, plantas sin inocular y con fertilización nitrogenada (135 kg. de Nitrogeno /ha.); **SF2-SF3** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF3 sin fertilización nitrogenada; **SF2-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF4 sin fertilización nitrogenada; **SF3-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF3 y SF4 sin fertilización nitrogenada.

La inoculación se efectuará mediante el agregado de 1 ml de cultivo bacteriano (en total) en medio LB, crecido a 28°C/100 RPM (hasta alcanzar una densidad óptica de 0.75-1 y 10^8 ufc/ml), disuelto en 0.16 ml de adherente cada 100 g de semillas de girasol; o sea, 500 ml de inoculante + 80 ml de adherente protector concentrado soluble (derivado celulósico) / 50 kg de semillas. Se prevé la aplicación de herbicidas según la historia del lote e insecticidas según plagas existentes.

Ensayos de Co-inoculación y reguladores de crecimiento a campo.

Se utilizará germoplasma comercial de girasol Paraíso 24. Los ensayos se realizarán en 2 localidades (Bulnes y Manfredi). Los co-inoculos a utilizar son SF2-SF3, SF2-SF3, SF3-SF4 y se utilizarán con y sin reguladores de crecimiento utilizándose un diseño experimental Alpha Lattice con 4 repeticiones al azar, colocadas en 3 hileras de 5.10 metros. Los tratamientos serán: **T**, plantas sin inocular y sin fertilizante; **TN**, plantas sin inocular y con fertilización nitrogenada (135 kg. de Nitrogeno /ha.); **SF2-SF3** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF3 sin fertilización nitrogenada; **SF2-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF4 sin fertilización nitrogenada; **SF3-SF4** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF3 y SF4 sin fertilización nitrogenada; **TRC**, plantas con reguladores de crecimiento, sin inocular y sin fertilizante; **SF2-SF3 RC** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF3, con reguladores de crecimiento y sin fertilización nitrogenada; **SF2-SF4 RC** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF2 y SF4, con reguladores de crecimiento y



sin fertilización nitrogenada; **SF3-SF4 RC** plantas co-inoculadas de las cepas bacterianas SF3 y SF4 con reguladores de crecimiento y sin fertilización nitrogenada.

La inoculación se efectuará mediante el agregado de 1 ml de cultivo bacteriano (en total) en medio LB, crecido a 28°C/100 RPM (hasta alcanzar una densidad óptica de 0.75-1 y 10^8 ufc/ml), disuelto en 0.16 ml de adherente cada 100 g de semillas de girasol; o sea, 500 ml de inoculante + 80 ml de adherente protector concentrado soluble (derivado celulósico) / 50 kg de semillas. Además se adherirá los reguladores de crecimiento a ensayar.

Se prevé la aplicación de herbicidas según la historia del lote e insecticidas según plagas existentes.

La evaluación de los ensayos experimentales explicitado en este objetivo, se realizará midiendo entre 3 a 5 plantas por repetición y tratamiento y serán medidas las siguientes variables:

CAP	Capítulos cosechados / parcela (n°).	R9
RENSH	Rendimiento grano / ha (ajustado 11% humedad) (kg/ha.).	R9
MG	Contenido de aceite (%)	R9
PS	Peso de 1000 semillas (g.).	R9
RENMGH	Rendimiento materia grasa / ha (S.M.SECA) (kg/ha.) *	R9
RENSA	Rendimiento grano / ha (ajustado base 42% MG) (kg/ha.).	R9
PLH	Plantas / ha (n°).	R7
HUM	Humedad (%)	R9
NSC	Numero de semillas / capitulo (n°).	R9

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

Análisis estadístico

Los datos serán analizados mediante una test ANNOVA, utilizando para ello el programa estadístico SAS (Statistical Analysis Software), versión 8.

Objetivo específico 4

Cultivos puros de las cepas bacterianas SF2, SF3 y SF4 se inocularán a 50 ml de medio Luria Bertani (LB), Glucose-Yeast (GY) y Ommafubve (Om), por separado. Se almacenarán a 25°C, y se realizarán recuentos en medio LB agarizado, de unidades formadoras de colonias a las 24 h, 30, 60, 90, 180 y 365 días, con la finalidad de determinar viabilidad de las bacterias para fijar la fecha de vencimiento de la formulación comercial



Análisis estadístico

Los datos de laboratorio se analizarán con una ANOVA, en caso de ser paramétricos y en su defecto se utilizará el test de Kruskal-Wallis para ensayos no paramétricos, utilizando a posteriori un Test de Rangos Múltiples. El software a utilizar es Statgraphics Plus, v.3 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

Bibliografía

- Arbona V., Argamasilla R., Gómez-Cadenas A.** 2010 Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *J. Plant Physiol* 167: 1342-1350.
- Bashan Y, Holguin G** (1997a). Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol* 43: 103-121.
- Bashan Y, Holguin G** (1997b). Short- and medium- term avenues for *Azospirillum* inoculation. In Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects. eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino, Published Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp. 130-149.
- Bashan Y** (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* 16:729-770
- Bashan Y, Puente M, Bashan L, Hernández P** (2008). Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. Plant-Microbe Interactions. Ed. Ait Barka E. and Clément C. Chapter 4:69-93.
- Bewley JD, Black M** (1994). Seeds. Physiology of development and germination. *Plenum Press, NY*
- Carsten K., Tautenhahn R., Neumann S.** 2009 LC-MS Peak Annotation and Identification with CAMERA. Consultado 16.02.2001. watson.nci.nih.gov/bioc_mirror/packages/2.4/bioc/html/CAMERA.html.
- Dashti N, Zhang F, Hynes R, Smith DL** (1997). Application of plant growth promoting rhizobacteria to soybean *Glycine max* (L) Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. *Plant Soil* 88:33-41
- 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
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemanno 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, Alemanno 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
- Garate A, Bonilla I** (2000). Nutrición mineral y producción vegetal. Azcón-Bieto J, Talón E. eds. Fundamentos de fisiología vegetal pp. 113-130. McGraw-Hill Interam. Madrid, España
- Gutiérrez-Mañero FJ, Acero N, Lucas J, Probanza A** (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder (*Agnus glutinosa* L. Gaertn.) growth II. Characterization and biological assays of metabolites from growth inhibiting bacteria. *Plant Soil* 182:67-74



- 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
- Irigaray J.** (2010). Evaluación de co-inoculación en girasol con bacterias nativas de vida libre, en condiciones control y estrés hídrico. Tesis para optar al grado de Microbióloga. pp. 32.
- Koch BL, Oya J** (1974). Non-symbiotic nitrogen fixation in some Hawaiian Pasture. *Soils Soil Biol Biochem* **6**:363-367
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* **5**:33-36
- Liu Z, Sinclair J** (1993). Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. *Soil Biol Biochem* **25**:849-855
- 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
<http://www.nitrugin.com.ar/intranet/argentina/archivos/CTS/Nitrugin-CTS.pdf>
- Povolo F, Hermida EB, Miyazaki S, Quaglianoc I** (2000). TRACCIÓN EN PELÍCULAS DE POLÍMERO BIODEGRADABLE. Jornadas SAM 2000 - IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga, Agosto de 2000, 1107-1112
- Pasturas y Forrajes, 2010.** Pasturas base alfalfa. Inoculación y peleteo. <http://www.pasturasyforrajes.com/pasturas-base-alfalfa/inoculacion-y-peleteo-2> (leído 05.09.2011).
- Rong-Min YU, Na MA, Chun-Yan YAN, Yu ZHAO** (2006). Effects of Exogenous Phytohormones on Hairy Root Growth of *Polygonum multiflorum* and Biosynthesis of Anthraquinones in Its Hairy Root Cultures. *Chin J of Biotechnol* **22**(4):619-623
- Schrauf G,** (2010) INTEGRACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES AL MEJORAMIENTO DE FORRAJERAS. "Jornadas de Mejoramiento Genético de Forrajas"
- Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G.** 2006 XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* **78**: 779-87.
- Vendan RT, Thangaraju M** (2006). Development and standardization of liquid formulation for *Azospirillum* bioinoculant. *Indian J of Microbio* **46**:379-387
- Weathers PJ., Bunk G., McCoy MC.** 2006. The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In vitro Cellular & Develop Biol - Plant.* **41**: 47-53

=====


Mgtr. Marcela Elena DAMELE
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.


Dra. Jose Nere CATTANA
Depto. Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.