

# Efecto de los Productos Extracelulares Cianobacterianos en la Biosíntesis de Porfirinas de Plántulas de Arroz Bajo Condiciones de Estrés Salino

Autor

**Andrés Alberto Rodríguez**

Directora

**Dra. María Cristina Zaccaro**

Profesora Adjunta

Cátedra de Fisiología Vegetal y

Biología de Cyanobacteria

Departamento de Ciencias Biológicas

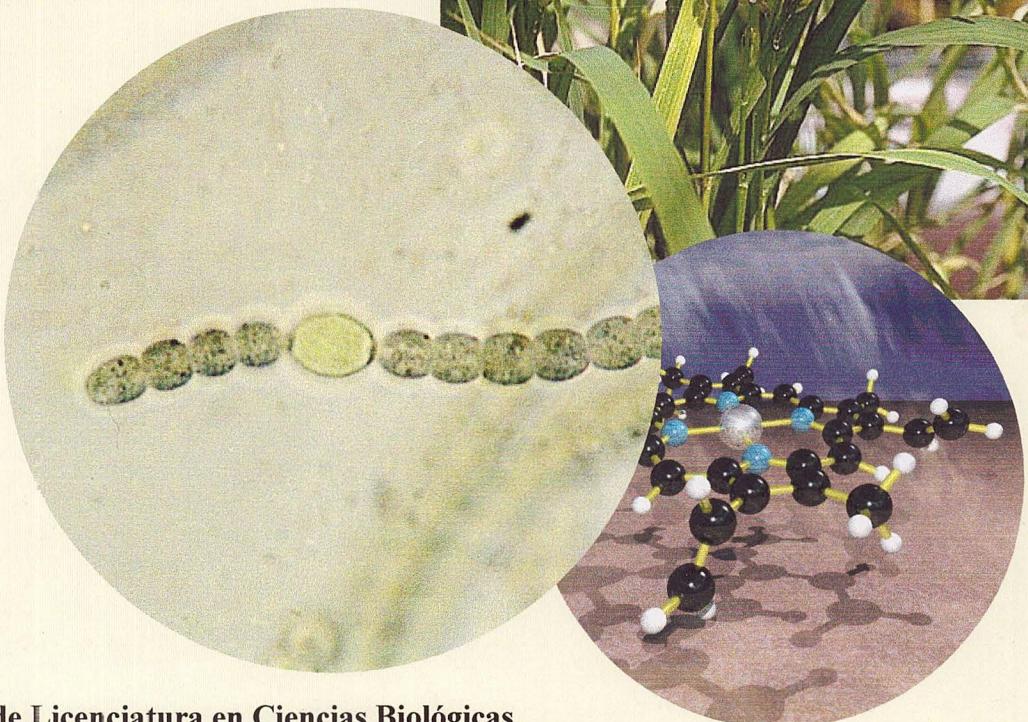
Codirectora

**Dra. Ana María Stella**

Profesora Adjunta

Cátedra de Química Biológica II

Departamento de Química Biológica



Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ciencias Biológicas

- 1999 -



*A mis Padres*

*Por haberme dejado elegir mi propio destino  
y apoyarme siempre durante el largo camino.*

*A Cristina*

*Por proporcionarme un lugar agradable  
para trabajar en libertad, y por brindarme  
su confianza, sus conocimientos, su cariño  
y su entusiasmo contagioso.*

*A Ana*

*Por permitirme utilizar las instalaciones del  
CIPSI y brindarme su ayuda cuando la  
necesite.*

*A Gloria y Nónica*

*No sólo por haberme proporcionado una ayuda  
irreemplazable para realizar este trabajo, sino  
también por todo lo bueno que me dieron tanto en  
lo profesional como en lo personal*



# INDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
Las cianobacterias y el arroz.....	6
Efectos del estrés salino en el arroz.....	6
Las giberelinas y el arroz.....	8
Biosíntesis de porfirinas en vegetales.....	8
<b>Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>12</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>13</b>
<b>Material biológico.....</b>	<b>13</b>
Cepas cianobacterianas.....	13
Cariopses de <i>Oryza sativa L.</i> .....	13
<b>Medios de cultivo.....</b>	<b>13</b>
Medios para cianobacterias.....	13
Medios hidropónicos para plántulas de arroz.....	14
<b>Material de laboratorio.....</b>	<b>14</b>
Cámara de cultivo para cianobacterias.....	14
Cámara para el cultivo hidropónico de plántulas de arroz.....	14
Equipos.....	15
<b>Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>Preparación de los cultivos de cianobacterias.....</b>	<b>16</b>
<b>Obtención de los productos extracelulares.....</b>	<b>16</b>
<b>Esterilización de los cariopses.....</b>	<b>16</b>
<b>Diseño experimental.....</b>	<b>16</b>
Preparación de los cultivos hidropónicos.....	16
Cosecha y conservación de plántulas.....	17
<b>Determinaciones bioquímicas.....</b>	<b>18</b>
Determinación de porfirinas libres totales.....	18
Determinación de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y carotenos.....	18
Actividad ALA-Dehidrasa.....	18
Determinación de proteínas.....	18
<b>Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>19</b>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Efecto de los productos extracelulares de distintas cepas cianobacterianas sobre plántulas de arroz.....</b>	<b>21</b>

Evaluación del crecimiento de las plántulas.....	21
<b>2. Determinación de la concentración de NaCl a la cual las plántulas de arroz var. Yerua son susceptibles.....</b>	<b>23</b>
Evaluación del crecimiento de las plántulas.....	23
<b>3. Efecto del GA<sub>3</sub> en plántulas bajo estrés salino.....</b>	<b>26</b>
3.1 Evaluación de crecimiento de las plántulas.....	26
3.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos.....	28
<b>4. Efecto de los productos extracelulares de <i>Scytonema hofmanni</i> 14a sobre plántulas de arroz bajo estrés salino.....</b>	<b>30</b>
4.1 Evaluación de crecimiento de las plántulas.....	30
4.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos.....	33
<b>5. Efecto de los PE de la cepa 14a en función del tiempo de cultivo de la misma, sobre las plántulas de arroz.....</b>	<b>35</b>
5.1 Evaluación de crecimiento de las plántulas.....	35
5.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos.....	37
<b>Conclusiones.....</b>	<b>40</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>43</b>
Descripción botánica de <i>Oryza sativa</i> L.....	43
Generalidades.....	43
Variedad Yerua P. A.....	44
Otras variedades cultivada en nuestro país.....	44
<b>Anexo II.....</b>	<b>45</b>
Descripción botánica de las cepas cianobacterianas.....	45
Generalidades.....	45
<i>Tolyphothrix tenuis</i> (11a).....	45
<i>Microchaete tenera</i> (14b).....	45
<i>Scytonema hofmanni</i> (14a).....	46
<i>Nostoc muscorum</i> (69b).....	46
<b>Bibliografía.....</b>	<b>47</b>

## RESUMEN

Las cianobacterias son microorganismos que tienen representantes fijadores de nitrógeno. Algunas conviven naturalmente con el cultivo del arroz y cepas seleccionadas han sido utilizadas para fertilizar arrozales. El efecto beneficioso de su inoculación, no está limitado a la fertilidad del suelo, sino que también influye sobre el crecimiento y el desarrollo de la planta por producir sustancias bioactivas.

Dado que la salinidad es uno de los factores más importantes que limitan el crecimiento vegetal, los objetivos del presente trabajo han sido determinar si los productos extracelulares (PE) de cianobacterias diazotrofas aisladas de arrozales de Argentina amortiguan los efectos de NaCl.

Se estudió el crecimiento y parámetros bioquímicos de la biosíntesis de porfirinas de plántulas de arroz de la variedad comercial Yerua cultivada en nuestro país.

Considerando que algunas cianobacterias liberan sustancias de tipo giberélico, comparamos los efectos de los productos extracelulares con el ácido giberélico ( $GA_3$ ) en plántulas bajo estrés salino. Este fitorregulador está relacionado con la tolerancia de las plantas al estrés.

Se obtuvieron productos extracelulares de cultivos masivos de: *Scytonema hofmanni* (14a), *Microchaete tenera* (14b), *Nostoc muscorum* (69b) y *Tolyphothrix tenuis* (11a). Se cultivaron plántulas de arroz en hidroponía con: productos extracelulares, ácido giberélico ( $GA_3$ ), NaCl y tratamientos combinados. Las plántulas fueron cosechadas a los 7 y 14 días y se midió: crecimiento (largo, peso fresco y seco de vástago y largo y peso seco de raíz) y parámetros bioquímicos (porfirinas libres totales, clorofila a, b, carotenos y actividad de  $\delta$ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D)).

Los productos extracelulares varían a nivel de la cepa cianobacteriana usada, así como sus efectos con el tiempo de exposición de las raíces de arroz a dichos productos.

El arroz variedad Yerua resultó susceptible a 5 g/L de sal, dado que dicha concentración inhibe el crecimiento del vástago y la raíz, pero ésta última es más afectada ya que la relación raíz/vástago disminuye en un 50%. La inhibición del crecimiento del vástago se corresponde con la disminución de la actividad de ALA-D (23%), porfirinas (31%) y carotenos (38%) así como de la relación clorofilas a/b (24%).

El  $GA_3$  revirtió el efecto inhibitorio sobre la longitud y sobre la reducción del peso seco del vástago, producidos por el NaCl.

Los PE de *S. hofmanni* (14a) luego de 14 días de tratamiento, tienen efectos opuestos a los observados con  $GA_3$ , dado que inhiben el crecimiento del vástago (22%) y promueven el de la raíz (14%). Además, no afectaron la actividad de ALA-D y revierten parte (16%) de la inhibición del largo del vástago producida por NaCl. Los PE liberados al medio durante toda la fase estacionaria tendrían una naturaleza similar, dado que producen los mismos efectos sobre el crecimiento y la biosíntesis de porfirinas en las plántulas de arroz.

La selección de una cianobacteria para utilizarla como biofertilizante, debe contemplar no sólo la determinación de su capacidad de fijar  $N_2$  sino también el efecto de sus sustancias bioactivas sobre las plantas a cultivar.

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## Las cianobacterias y el arroz

Las cianobacterias o algas azul-verdosas son microorganismos procariotas fotoautótrofos que tienen representantes fijadores de nitrógeno atmosférico. Estos diazótrofos utilizan la luz solar como fuente de energía para la fijación de carbono y de nitrógeno. Por lo tanto tienen un gran potencial como bífertilizantes de bajo costo y son ecológicamente seguros. Su uso podría disminuir la demanda de los combustibles fósiles que se utilizan en la producción de fertilizantes químicos, así como el efecto invernadero y la contaminación ambiental (Roger y Kulasooriya, 1980; Halperin et al., 1992).

Algunas conviven naturalmente con el cultivo del arroz. La inoculación de cepas seleccionadas por su capacidad de fijar dinitrógeno, a fin de incrementar la fertilidad de los arrozales, ha sido aplicada en China, Egipto, Filipinas, India, etc. El efecto beneficioso de estos microorganismos no está limitado a la fertilidad (Roger y Kulasocriya, 1980) y al mejoramiento de la estructura del suelo (Cano et al., 1997; Mulé et al., 1999), también influyen sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas por producir sustancias bioactivas.

Gupta (1966), así como Venkataraman y Neelakantan, (1967), destacan la función benéfica de las algas de los arrozales por producir sustancias promotoras del crecimiento (hormonas, vitamina B<sub>12</sub>, aminoácidos, etc.), independientemente de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. También polipeptidos, aminas, etc., han sido citadas por numerosos autores como productos extracelulares (PE), verificándose solamente para algunos de ellos actividad biológica (Caire et al., 1979). La tabla 1 muestra sustancias bicactivas, aisladas de cianobacterias (Sings y Rinehart, 1996). Algunos investigadores han determinado actividad de tipo giberélico (Shukla y Gupta, 1967; Gupta y Shukla, 1967, 1969; Gupta y Agarwal, 1973) y auxínico (Caire et al., 1979).

## Efectos del estrés salino en el arroz

La alta salinidad es uno de los factores ambientales más importantes entre los que causan estrés osmótico y limitan dramáticamente el crecimiento de las plantas y la productividad de las cosechas (Boyer, 1982). La acumulación de sales solubles en exceso, especialmente sales de sodio en la zona de la raíz, da como resultado la perdida parcial o completa de la productividad del suelo. Por lo tanto, el estudio de los efectos causados por el estrés salino es de gran importancia para la agricultura. De acuerdo con un informe de la FAO, aproximadamente el 7% de las áreas terrestres son suelos afectados por la sal. El 12% de estas tierras están localizadas en el Sud y Sudeste de Asia, donde el arroz es la principal cosecha (Misra et al., 1997).

El arroz se considera un cultivo moderadamente tolerante a la sal. Greenways y Munns (1980) sugieren que la reducción del crecimiento resultante es consecuencia de los efectos de la sal sobre la distribución de materia seca, relaciones ícticas e hídricas o una combinación de tales factores. Los efectos del estrés salino sobre el arroz dependen principalmente de la fenología de la planta: plántulas y plantas con flor parecen ser más sensibles que las plantas con macollos (Lutts et al., 1995). También la germinación es afectada negativamente. En el estado de plántula, la salinidad frecuentemente induce senescencia prematura de las hojas, inhibición del crecimiento del vástago, aumento de la relación raíz/vástago en cuanto al largo, peso fresco y seco en especies de arroz susceptibles a la sal. Dicha relación disminuye en variedades resistentes (Misra et al., 1997). Las plantas acumulan sustancias osmoprotectoras en respuesta al NaCl. En arroz, la trealosa o los

**Tabla 1.** Sustancias bioactivas de origen cianobacteriano (Sings et al., 1996).

Componente	Descripción
Aeruginopeptinas	Péptidos
Aeruginosina 298-A	Inhibidor de tripsina y trombina
Ambigols A & B	Aromático clorinado aislado de <i>Fischerelia ambigua</i>
Anabaenopeptinas	Péptidos aislados de <i>Anabaena flos-aquae</i>
Anatoxina-A	Neurotoxina
Aulosirazola	Citotoxina con selectividad tumoral aislada de <i>Aulosira fertilissima</i>
Boroficjna	Complejo ácido bórico boeseken aislado de <i>Nostoc lincchia</i>
β-Carbolinas	Aisladas de <i>Dichothrix baueriana</i>
Curacin-A	Antimitótico y antiproliferativo aislado de <i>Lynghya majuscula</i>
Cianopeptolinás	Péptidos aislados de <i>Microcystis</i> Sp. PCC 7806
Criptoficinas	Péptidos con actividad antitumoral aislados de <i>Nostoc</i> Sp
Cilindrospermopsina	Toxina <i>Umezakia natans</i>
(-)Didehidromirabazol-A	Un alcaloide citotóxico
Hapalosina	Un péptido que se muestra como una droga sinérgica para mas acción efectiva
Malingamida-G	Una amida conteniendo colina
Microcistina	Una hepatotoxina peptídica aislada de <i>Oscillatoria agardhi</i>
Microginina	Un péptido con actividad angiotensin, aislada de <i>Microcystis aeruginosa</i>
Micropeptina a & b	Inhibidores de tripsina y plasmina de <i>Microcystis aeruginosa</i>
Mirabimida E	N-Acilpirrolinona <i>Scytonema mirabile</i>
Nakienonas A-C	Metabolito tóxico C-11 de <i>Synechocystis</i> Sp.
Nakitriol	Metabolito tóxico C-11 de <i>Synechocystis</i> Sp.
Nodularina	péptido
Nonamethoxy-1-	Aislado de <i>Scytonema ocellatum</i>
Pentacosena	Anti-tumoral
Nostociclofanesa A-D	Antimitótico aislado de <i>Nostoc commune</i>
Nostodiona A	Aislado de <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
Pterinas	
Pukeleimida-A <sup>86</sup>	péptido con acción antimicrobrial
Schizotrina A	Droga sinérgica que reduce la resistencia a droga
Toliporphina	Alcaloides aislados de <i>Hapalosiphon welwitschii</i> , <i>Westiella intricata</i>
Welwitindolinonas	Antitumoral aislado de <i>Phormidium tenue</i>
Unidentified	Algicida
Unidentified	Algicida aislado de <i>Scytonema hofmanni</i>

carbohidratos podrían ser de importancia frente al estrés osmótico (García et al., 1997). La trealosa no impide la toma de NaCl pero reduce la acumulación de sodio en la lámina lo que le permitiría a la planta seguir creciendo sin pérdida de clorofila.(García et al, 1997). También hay trabajos que informan la acumulación de prolina. Numerosos genes responden a la salinidad: *salT* (García et al., 1998), ORS 40 (Moons et al., 1997), *rab 21*, *em*, *rMipI*, *rTip I*, *sod cc2*, etc. La mayoría de los nuevos productos génicos, sintetizados en respuesta a la presencia de sal, serían probablemente producidos para compensar las proteínas desnaturalizadas o para reparar los daños en el organismo (García et al., 1997). Por ejemplo, la proteína *salT* se cree que está involucrada en secuestrar el exceso de Na<sup>+</sup> en vainas foliares de arroz (Ramani y Apte, 1997), *sod cc2* codifica para una superoxidasa dismutasa en arroz, lo cual esta generalmente asociado con detoxificación de radicales, el producto del gen *Em*, es una proteína embrionaria tardía (Bostock y Quatrano, 1992), mientras que el producto *Rab21* es una proteína rica en glicina. Por lo tanto la halotolerancia es un rasgo poligénico. La salinidad afecta la actividad de enzimas importantes en el metabolismo celular y en la transducción de señales, tales como la L-mio-inositol 1-fosfato sintetasa cloroplástica (Raychaudhuri y Majumder, 1996).

## Las giberelinas y el arroz

Las giberelinas (GAs) tienen numerosos roles fisiológicos en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas que incluyen germinación de semillas, metabolismo del almidón, elongación celular y retraso de la senescencia foliar (Vettakkorumakankav et al., 1999).

Aunque muchas GAs diferentes ( $>100$ ) han sido aisladas y caracterizadas, sus roles precisos en la fisiología de plantas aun no han sido determinados. Se ha sugerido que las GAs responsables de la elongación celular son diferentes de las GAs responsables de la inducción de la síntesis de enzimas en centeno. Esto conduce a la posibilidad de que muchas de las GAs activas tengan funciones específicas en la regulación del crecimiento de plantas. En arroz de aguas profundas, las GA inducen el crecimiento del vástago porque aumentan el alargamiento y la división celular en los meristemas intercalares de la base de los entrenudos (Sauter y Kende, 1992; Sauter et al., 1993; Kende y Zeevaart, 1997).

Con respecto a la relación de las GAs con los estrés medio ambientales, cabe destacar que el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) tiene un efecto sinérgico sobre la inducción del gen *salT* de plantas de arroz cuando se combina con NaCl (García et al., 1998). Otros estudios han comprobado que las GAs tienen un rol en la protección contra otros tipos de estrés (Vettakkorumakankav, et al., 1999). Es posible que se produzca una reducción del nivel de GA ante situaciones de estrés, la cual conduce a una alteración en el delicado balance entre GA y ácido abscísico (ABA). Este balance es extremadamente importante ya que el ABA se considera una "hormona de estrés" y también han sido observados incrementos en su concentración durante la aclimatación a todo tipo de estrés abióticos.

## Biosíntesis de porfirinas en vegetales

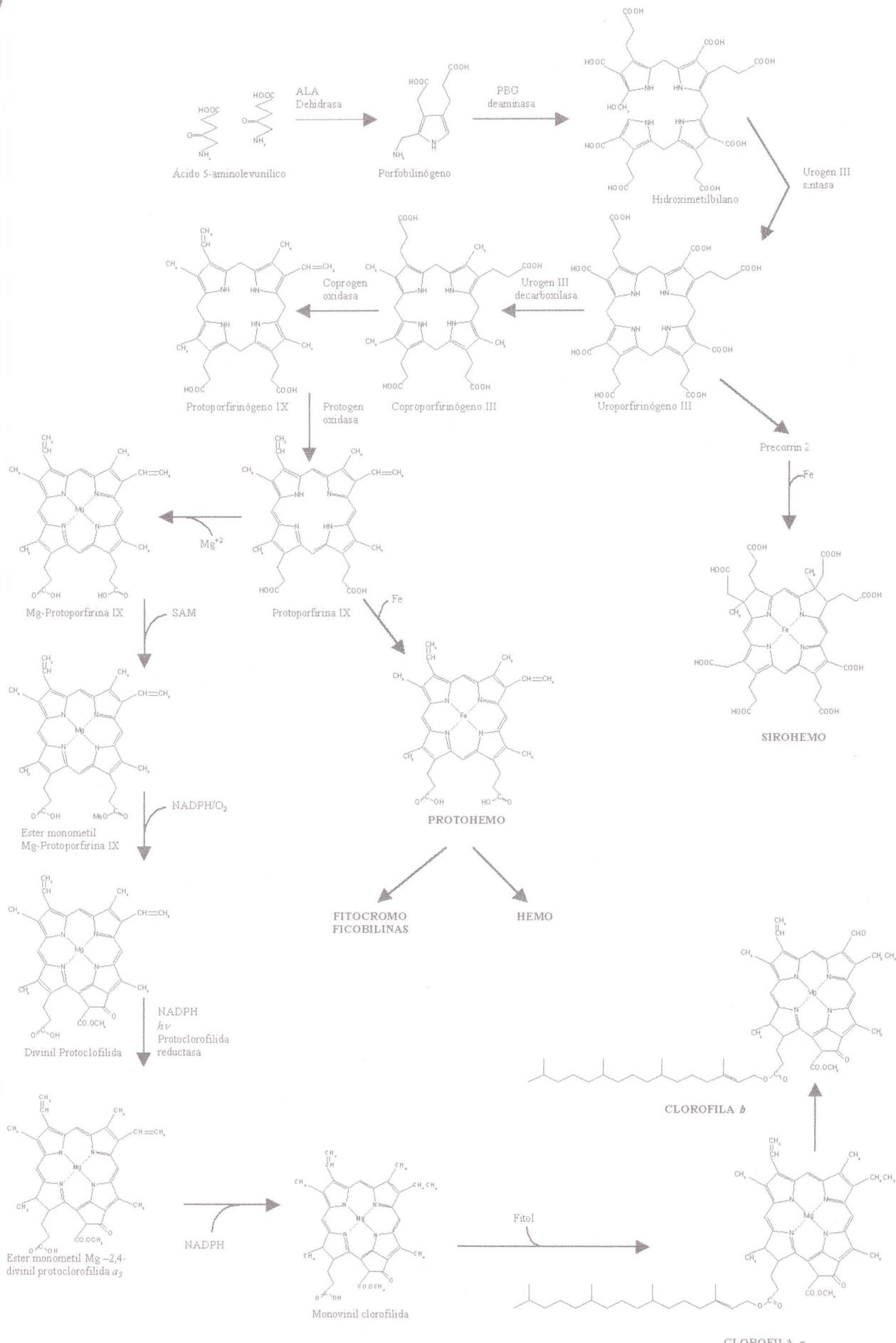
Entre las enzimas responsables de la vía biosintética de las porfirinas (Figura 1) se destaca la ácido δ-amino levúlico dehidrasa (ALA-D), segunda enzima de la vía, que podría ser un punto regulatorio de la misma (Paveto et al., 1989). Esta vía tiene como productos finales en plantas superiores importantes biomoléculas tales como clorofilas, fitocromos, hemoenzimas (catalasas, peroxidases), citocromos, etc. Como otras enzimas de la biosíntesis de porfirinas, el ALA-D, es sintetizada en citoplasma y se localiza en los plástidos. Se ha purificado en espinaca (Liedgens et al., 1983) y en arveja (Boese et al., 1991). Es una metalo-proteína, las de origen animal requieren Zn<sup>+2</sup> para su actividad y las vegetales son Mg<sup>+2</sup>-dependientes. Si bien la enzima de origen animal ha sido extensamente estudiada, es escasa la información disponible sobre dicha enzima en tejidos vegetales.

Entre los factores que influyen sobre esta enzima, se ha determinado una estimulación de su síntesis por luz rojo lejano en cotiledones de rábano (Huault et al., 1984). El fosfato de piridoxal inhibe la ALA-D de hojas de maíz (Maralihalli y Bhagwat, 1985). Cationes monovalentes como el K<sup>+</sup>, pueden alterar la actividad catalítica y los estados de agregación de la enzima en mamíferos (Stafforini et al., 198C). Cabe destacar que no hay información sobre efectos del Na<sup>+</sup>.

También es escasa la información sobre la influencia de productos extracelulares cianobacterianos en la biosíntesis de porfirinas así como sobre la interacción cianobacteria-arroz en condiciones de estrés salino.

Figura 1

# BIOSÍNTESIS DE CLOROFILA Y HEMO



# OBJETIVOS

## **OBJETIVOS**

1. Determinar si los PE de cianobacterias diazótrofas aisladas de arrozales de Argentina, amortiguan los efectos del NaCl sobre el crecimiento de plántulas de una variedad comercial de arroz, cultivada en nuestro país.
2. Comparar los efectos de los PE y del GA<sub>3</sub> en el crecimiento de plántulas en condiciones de estrés salino.
3. Estudiar la influencia de dicho estrés sobre enzimas y productos de la biosíntesis de porfirinas en las plántulas, en presencia de PE cianobacterianos o GA<sub>3</sub>.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

### Material biológico

#### Cepas cianobacterianas

Las cepas cianobacterianas cultivadas fueron: *Tolyphothrix temuis* (11a), *Scytonema hofmanni* (14a), *Microchaete tenera* (14b) y *Nostoc muscorum* (69b), pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Cyanobacteria, FCEN, UBA. Dichas cepas fueron aisladas de arrozales de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Las cepas se obtuvieron en condición axérica mediante irradiación con luz UV. Observaciones microscópicas de las mismas, indicaron que el tratamiento no alteró su morfología. Tampoco se detectaron cambios en sus propiedades fisiológicas.

#### Cariopses de *Oryza sativa* L.

Se utilizaron cariopses de *Oryza sativa* L. variedad *Yerua*, gentilmente provistos por la Arrocera Argentina S.A.

### Medios de cultivo

Se prepararon con drogas marca Merck o equivalente.

#### Medio para cianobacterias

Se utilizó el medio *Watanabe modificado* (Wm) (Halperin et al., 1979):

##### Macronutrientes

$K_2HPO_4$  (0,3g/L)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2g/L)

$CaCl_2$  (0,05g/L)

Tartrato Férreo 2-3 gotas/L (5g de ácido tartárico + 5g  $FeCl_3$  en un litro de agua).

##### 1ml de solución de micronutrientes Arnon 6

##### Arnon 6

$H_3BO_3$  (2,86g/L)

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (1,81g/L)

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,222g/L)

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,391g/L)

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,079g/L)

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,0419g/L)

## Medios hidropónicos para plántulas de arroz

Medio Wm

Medio Hoagland (Durn y Arditti, 1968)

Soluciones madre:

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (115,04g/L)

$\text{KNO}_3$  (101,1g/L)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (64,1g/L)

$\text{MgSO}_4$  (120,39g/L)

## Drogas adicionadas a los medios hidropónicos

Ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ )

NaCl

Medios de cultivo hidropónicos preparados para plántulas de arroz:

1\_Wm solo para el control

2\_Wm + NaCl 1,25g/L

3\_Wm + NaCl 2,5g/L

4\_Wm + NaCl 5,0g/L

5\_Wm + NaCl 5,0g/L +  $\text{GA}_3$  0,5 mg/L

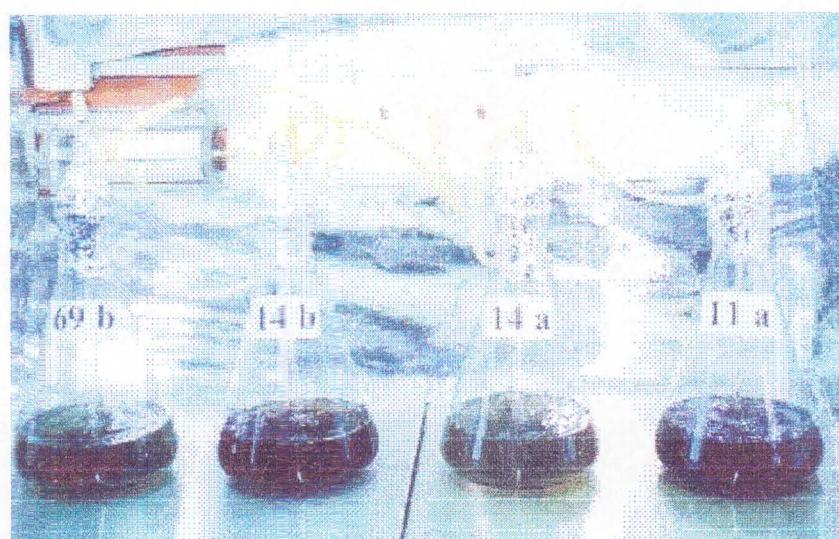
6\_Wm + NaCl 5,0g/L + PE

7\_Wm +  $\text{GA}_3$  0,5mg/L

8\_Wm + PE\*

\* Los PE varían según el tratamiento (ver diseño experimental)

## Material de laboratorio



Cámaras de cultivo para cianobacterias

Cámara de cultivo para cianobacterias.

Con una intensidad luminosa de  $45 \mu\text{mol}$  de fotones. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , con burbujeo de aire esterilizado por pasaje a través de filtro Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$  de diámetro de poro, fotoperíodo 12:12 y a la temperatura del laboratorio.



Cámara para el cultivo hidropónico de plántulas de arroz

*Cámara para el cultivo hidropónico de plántulas de arroz.* Con luz de  $45\mu\text{mol}$  de fotones. $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con fotoperíodo 12:12 a  $31\pm1^\circ\text{C}$  de temperatura, humedad relativa 80%, provistas de bandejas plásticas de 600ml de capacidad, con planchas de poliuretano expandido inerte, de  $15\times10\times1\text{cm}$ , perforadas (orificios de 0,5 cm de diámetro) y con una malla plástica adherida en la cara inferior, para soportar las semillas en los orificios.

## Equipos:

*Cámara de flujo laminar HL CASIBA  
Destilador de vidrio  
Columna de intercambio iónico  
Autoclave  
Balanza electrónica  
Centrífugas clínica  
Centrífuga de alta velocidad  
Cámara de frío a  $-70^\circ\text{C}$   
Estufa  
Microscopio óptico WILD Heerbrugg  
Cámara fotográfica Olympus DX Trip XB3*

*Computadora PC con:*

*procesador Pentium de 200MHz*

*RAM de 48Mb*

*Escáner INFO 3C0*

*Impresora HP 492C*

*Programas incorporados:*

*Corel 7.0 (Procesador de imágenes)*

*GraphPad Prism 2.01 y Estatística 4.2 (Tabla de cálculos para estadística)*

*Word 7.0 (Editor de textos)*

*Explorer 5.0 (Navegador de Internet para búsqueda bibliografía en bases de datos)*

*WinSPIRS 2.1 (explorador de la base de datos Biological Abstract)*

*Espectrofotómetro* Hewlett Packard 8452A de amplio espectro acoplado a PC HP vectra 286 con programa HP852 para medir absorbancia en un rango continuo de longitudes de onda.

*Espectrofluorómetro* Shimadzu RF-510 de amplio espectro de emisión de luz y con capacidad para detectar fluorescencia en un rango continuo de longitudes de onda tanto de excitación como de emisión.

## MÉTODOS

### Preparación de los cultivos de cianobacterias

#### *Preparación de los cultivos de las cepas 14a, 14b, 11a y 69b*

Se toman alícuotas de cultivos de las cepas cianobacterianas en estado estacionario y se inoculan al 10% en 4 Erlenmeyers de 2L que contienen cada uno 1L de medio Wm. Se cierra el Erlenmeyer con un tapón de algodón atravesado por una pipeta estéril que luego se conectará al sistema de aireación de la cámara de cultivo para burbujejar aire estéril. A los 14 días (fase pre-estacionaria) se obtienen los PE.

#### *Preparación del cultivo de 14a (fase pre-estacionaria) para los ensayos con plántulas de arroz bajo estrés salino*

Se procede igual que en el punto anterior usando un Erlenmeyer de 3L con 2L de Wm.

#### *Preparación del cultivo de 14a para los ensayos de los PE de distintos días sobre plántulas de arroz*

Se inocula al 10% un Erlenmeyer de 9L con 6L de Wm. El cultivo se mantiene en la cámara. Los días 14 (fase pre-estacionaria), 21, 28, 35 y 42 (fase estacionaria) y 62 (fase post-estacionaria) se retiró 1L de cultivo previa homogeneización del mismo, para luego obtener los PE.

### Obtención de los productos extracelulares (PE)

El cultivo se centrifuga a 8.000xg por 20min en condiciones de esterilidad. Se determina el peso fresco de la masa algal precipitada y se mide el volumen de sobrenadante. El sobrenadante que contiene los PE, se filtra por membranas esterilizantes de 0,22 µm de diámetro y se conserva hasta su utilización en los cultivos hidropónicos.

### Esterilización de los cariopses

Se trabaja en el flujo laminar. Los granos se sumergen en etanol 96% durante 2min. Se descarta el etanol y se agrega HgCl<sub>2</sub> al 0,1% agitando 8min. Se descarta el HgCl<sub>2</sub> y se lava a intervalos de 10min con agua destilada estéril, dejando las semillas en germinador dentro de la cámara de cultivo a la luz, hasta que germinen (48hs).

## Diseño experimental

### Preparación de los cultivos hidropónicos

#### *Cultivos hidropónicos para ensayar los PE de los distintas cepas sobre las plántulas de arroz*

600mL de sobrenadante de cultivos de 14 días de las 4 cepas se colocan en las cajas de hidroponia como medio de cultivo para cariopses germinados que se introducen en los orificios del soporte. Las bandejas se llevan a la cámara de cultivo bajo condiciones controladas. Como medio control se utiliza Wm solo (medio de cultivo hidropónico 1) y a partir del 5º día desde la siembra de los granos, se agrega diariamente 2mL de medio Hoagland a todas las bandejas de cultivos hidropónicos.

#### *Cultivos hidropónicos para ensayar las distintas concentraciones de NaCl*

Se preparan los medios de cultivo hidropónicos 2, 3 y 4 disolviendo NaCl en Wm, para lograr las siguientes concentraciones: 1,25g/L, 2,5g/L y 5g/L, respectivamente. Las soluciones se esterilizan

por filtración ( $0,22\mu\text{m}$ ) y se colocan en las bandejas de hidroponia, con los granos germinados. Se llevan a la cámara de cultivo. Como medio control se utiliza Wm y a partir del 5º día desde la siembra de los granos, se agrega diariamente 2mL de medio Hoagland a todas las bandejas.

#### *Cultivos hidropónicos para los ensayos con $\text{GA}_3$ , $\text{NaCl}$ y $\text{GA}_3 + \text{NaCl}$*

Se preparan los medios de cultivo hidropónicos 5 y 7 en las concentraciones indicadas y se esterilizan por filtración ( $0,22\mu\text{m}$ ) y se colocan en las cajas de hidroponia como medio de cultivo para los cariopses germinados que se introducen en los orificios del soporte. Las bandejas se llevan a la cámara de cultivo bajo condiciones controladas. Como medio control se utiliza Wm y a partir del 5º día desde la siembra de los granos, se agrega diariamente 2mL de medio Hoagland en las bandejas de cultivos hidropónicos.

#### *Cultivos hidropónicos para los ensayos con PE de 14a y PE de 14a con $\text{NaCl}$*

600 mL del sobrenadante extraído del cultivo de 14 días de la cepa 14a se coloca en una caja, bajo cámara de flujo (medio de cultivo hidropónico 8). El medio de cultivo hidropónico 6 se prepara agregando 5g/L de NaCl de PE. Ambos medios se colocan en sendas bandejas y se siembran los granos germinados en los soportes. Ambas bandejas se llevan a la cámara de cultivo bajo condiciones



Plántulas de arroz de 7 días, antes de ser cosechadas



Bandejas inertes con cariopses sembrados

controladas y como medio control se utiliza el medio Wm. A partir del 5º día desde la siembra de los granos, se agrega 2mL diariamente de medio Hoagland a las bandejas de cultivos hidropónicos.

#### *Cultivos hidropónicos para los ensayos con PE extraídos a distintos días de un cultivo de 14a*

Al cabo de 14, 21, 28, 35, 42 y 62 días de cultivo se toman 600 mL del sobrenadante obtenido y se procede igual que con los PE del punto anterior.

#### **Cosecha y conservación de las plántulas**

La cosecha de las plántulas se realiza a los 7 y 14 días. Se mide longitud y peso fresco de vástago y raíz. Una fracción de las plántulas se utiliza para el ensayo de actividad de  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) y el resto se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



Plántulas de 14 días recién cosechadas

## Determinaciones bioquímicas

### Determinación de porfirinas libres totales

Las porfirinas libres totales fueron evaluadas por análisis de fluorescencia. Se toman 2ml del sobrenadante obtenido para la medición de actividad ALA-D. Se colocaron en una cubeta de cuarzo para medir en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-150, ajustándolo para que excite a una longitud de onda de 400nm y detecte la luz emitida por las porfirinas en un rango de 390 a 700nm con una sensibilidad adecuada para la muestra medida. La cantidad de porfirina libre se obtiene en  $\mu\text{g/mL}$  por comparación del pico de fluorescencia del patrón de uroporfirina (URO) a 396nm con el pico de fluorescencia de las distintas muestras a la misma longitud de onda. También se debe observar un pico de fluorescencia a 618nm que es un pico característico de la uroporfirina (URO) en estas condiciones, debido a que el patrón es URO libre. La dilución de dicho patrón se realiza haciendo con buffer fosfato de sodio pH 7,5 hasta que se obtuvo una fluorescencia mensurable en la sensibilidad usada para las muestras (Divo de Sesar et al., 1999).

### Determinación de clorofila *a*, clorofila *b* y de carotenos

Vástagos individuales se trituran usando un mortero con arena y 2,5ml de una solución de acetona 80%. Se deja en reposo durante 1h en oscuridad. El homogenato resultante se pasa por un filtro Watmann nº3. El contenido de clorofila *a*, *b* y carotenos totales fueron calculados tomando los valores de absorbancia a 470, 646 y 663nm de los homogenatos. Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro Hewlett Packard con programa de PC incorporado que midió a 470, 646 y a 663nm en forma simultanea y se calcularon según Lichtenthaler et al., (1983), para obtener las concentraciones de clorofila *a*, *b* y carotenos totales.

### Actividad del ALA-Dehidrasa

Se realiza un homogenato con 6 vástagos agregando 5ml de buffer fosfato 50mM empleando un mortero de 10cm de diámetro a temperatura ambiente. El homogenato se centrifuga a 7000xg 20min guardando el sobrenadante a -20°C tomando antes 1,5ml repartiendo 500 $\lambda$  en 3 tubos Eppendorff que se centrifugan a 10000xg 10min. Las condiciones standard para la mezcla de incubación se prepara con 445 $\lambda$  de sobrenadante en tres tubos de hemólisis diferentes (para dos replicas y para un blanco del tratamiento correspondiente). En cada tubo de hemólisis con 445 $\lambda$  de muestra se hace la mezcla de incubación con 25 $\lambda$  de buffer fosfato de sodio 1M pH 7,5, 25 $\lambda$  de ácido δ-aminolevulínico 50mM pH 7,5 (excepto el control al cual se le agregan 25 $\lambda$  de agua) y 5 $\lambda$  de β-mercaptocetanol 10mM para obtener un volumen final de 0,5ml. Se incuba en condiciones aeróbicas en oscuridad, durante 1hora en el baño a 37°C en agitación (90-100 r.p.m.). Al concluir la incubación se les agrega a cada tubo 25 $\lambda$  de solución saturada de sulfato de cobre para precipitar las proteínas y detener la reacción (Stella, 1977).

Se centrifugan los tubos a 7000rpm 10min y se toma un volumen de sobrenadante y se agrega reactivo de Erlich volumen a volumen para medir porfobilinógeno por un método colorimétrico (Moore y Labbe, 1964) usando un coeficiente de extinción:  $E_{\text{cm}}^{1\%} = 1136$  a 555nm.

### Determinación de proteínas

Para medir las proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), usando como estándar suero fetal bovino, expresando el valor de proteínas como mg de proteínas/ mg de sobrenadante.

### **Unidad enzimática**

La unidad enzimática (U) de actividad de ALA-D se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1nmol de PBG hora bajo las condiciones estándar de incubación utilizadas. Actividad específica como U/mg de proteínas.

### **Análisis estadístico de los datos**

El análisis de los datos se llevó a cabo con distintos programas estadísticos. Con el programa GraphPad Prism (versión 2.01), se confeccionaron tablas de datos para analizar los resultados del punto 2 y 5 (de Resultados y discusión). Además se realiza con ellos un ANOVA de una vía. Con los resultados del punto 1 y 3 (de Resultados y discusión) se confeccionan tablas de datos con el programa: Estatistica (versión 4.2) y se realizó un ANOVA de dos vías. Para todas las mediciones morfológicas de las plántulas se utilizó un  $n$  de 20 mientras que, dentro de las mediciones químicas para los ensayos de actividad de ALA-D y concentración de porfirinas totales libres y proteínas, el  $n$  fue de 6 (cada medición para estos ensayos, se realizó de un conjunto de 6 vástagos). Para las mediciones de concentración de clorofilas  $a$  y  $b$  y carotenos totales el  $n$  para estos casos fue de 12.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. EFECTO DE LOS PRODUCTOS EXTRACELULARES DE DISTINTAS CEPAS CIANOBACTERIANAS SOBRE PLÁNTULAS DE ARROZ

### Evaluación del crecimiento de las plántulas

#### Longitud del vástago (LV)

Las plántulas cosechadas a los 7 días tuvieron un incremento de la LV con PE de 11a, 14a y 69b del 14%, 17% y 14% respectivamente. Los PE de 14b no produjeron diferencias.

Sin embargo al medir este parámetro al día 14 algunos de los PE que al día 7 estimulaban, produjeron inhibición del LV. A las dos semanas los PE de 11a, 14a y 14b produjeron una inhibición de la LV del 32%, 18% y 22% respectivamente. En cambio en el caso de los PE de 69b, no hay diferencias a los 14 días (Figura 1.1).

#### Peso fresco del vástago (PFV)

Los PE de las cepas 11a y 14a aumentaron el PFV en el día 7 de cultivo en un 42% y 41% respectivamente (Figura 1.2). Los PE de 14b y 69b no determinaron diferencias. Sin embargo, a los 14 días las plántulas mostraron un comportamiento diferente con los distintos PE. Los PE de 11a y 14b no produjeron diferencias, mientras que los PE de 14a disminuyeron un 11% el PFV y los de 69b aumentaron el peso fresco un 11%.

#### Peso seco del vástago (PSV)

Cuando se midió PSV, se vieron diferentes efectos de los PE de las distintas cepas en el día 7 y en el día 14. Para el día 7, los PE de las cepas 11a y 69b afectaron positivamente el PSV en un 22% y 24% respectivamente, mientras que los PE de la cepa 14a tuvieron un efecto negativo del 22%. Los PE de 14b no produjeron diferencias respecto del control. En el día 14, los PE de 11a redujeron el peso seco un 16%. Los PE de 14a y de 69b, no determinaron diferencias significativas. Los PE de la cepa 14b que en el día 7 no producían diferencias, disminuyeron el peso un 18% (Figura 1.3).

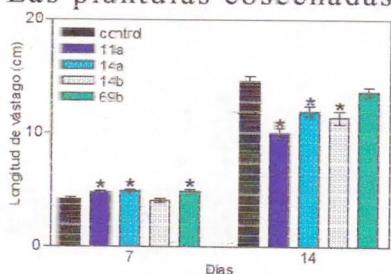


Figura 1.1. Longitud de vástago de plántulas tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

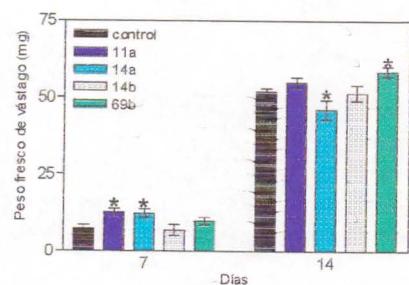


Figura 1.2. Peso fresco de vástago de plántulas tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

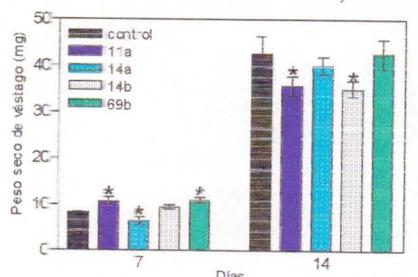


Figura 1.3. Peso seco de vástago de plántulas tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

### Longitud de la raíz (LR)

La Figura 1.4 muestra que solo los PE de la cepa 14a aumentaron la LR tanto al día 7 como al día 14: 28% y 17% respectivamente.

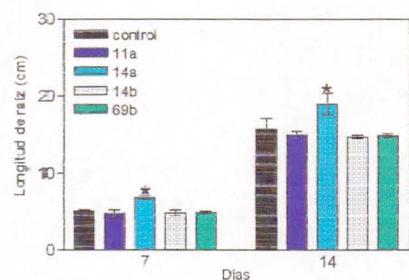


Figura 1.4. Longitud de raíz de plántulas tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

### Peso seco de raíz (PSR)

A los 7 días solo los PE de 14b mostraron efecto, una reducción del PSR del 15%. En el día 14, todos los PE, excepto los de la cepa 14a que no produjeron ningún efecto, tuvieron una acción negativa en el peso seco de la raíz. Los porcentajes de disminución del peso seco fueron: 25%, 29% y 17% para 11a, 14b y 69b respectivamente (Figura 1.5).

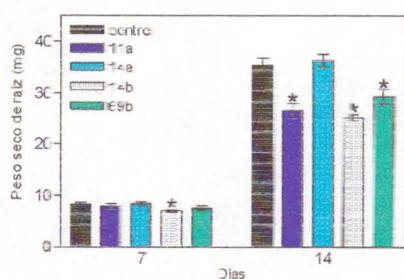


Figura 1.5. Peso seco de raíz de plántulas tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

### Relación longitud raíz/vástago (LR/LV)

Al 7º día de tratamiento, solo los PE de la cepa 14a aumentaron la relación LR/LV: 18%. Los PE de 11a y 69b produjeron una disminución del 26% y 30% respectivamente y los PE de la cepa 14b no afectaron la relación. En el día 14, los PE que antes mostraron disminución de la relación LR/LV (11a y 69b) no tuvieron efecto sobre la misma. Los PE de la cepa 14a mantuvieron el efecto positivo pero este se incrementó llegando a ser del 21%. Los PE de la cepa 14b que en el día 7 no tuvieron efecto, sí los tuvieron en el día 14 observándose un aumento del 38% (Figura 1.6).

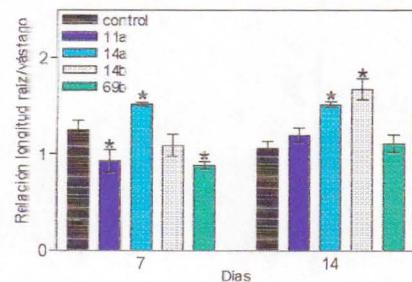


Figura 1.6. Relación longitud raíz/vástago de plántulas de arroz tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

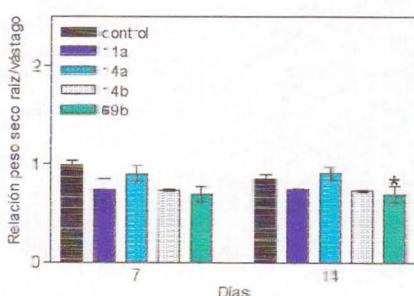


Figura 1.7. Relación peso seco raíz/vástago de plántulas de arroz tratadas con PE de distintas cepas cianobacterianas medida a distintos días.

### Relación peso seco raíz/vástago (PSR/PSV)

Esta relación se mantuvo invariable tanto en el día 7 como en el día 14 en todos los tratamientos excepto en el tratamiento con PE de 69b, los cuales en el día 14 disminuyeron la relación en un 19% (Figura 1.7).

Los resultados obtenidos indican que los productos extracelulares varían a nivel de la cepa cianobacteriana usada, así como sus efectos con el tiempo de exposición de las raíces de arroz a dichos productos. Ninguna cepa tuvo efectos inhibitorios o promotores de todos los parámetros de crecimiento medidos. Estas diferencias se deberían a las numerosas sustancias presentes en los productos extracelulares utilizados en los ensayos y a la cantidad limitada de cada una de ellas.

Las diferencias en función del tiempo también podrían deberse a que la plántula va agotando sus reservas provenientes del cariopse y dependiendo más del medio de cultivo en el que crece.

Se seleccionó la cepa *Scytonema hofmanni* N°14a para continuar con los ensayos, dado que la misma produjo exometabolitos que indujeron un incremento de la longitud y del peso fresco del vástago del 17 y 42% respectivamente, luego de 7 días de tratamiento vía raíz, efectos característicos del ácido giberélico o GA<sub>3</sub>. Estos resultados coinciden en parte con Gupta y Lata (1964) y Shukla y Gupta (1967), quienes determinaron un aumento en la longitud del vástago en plantas de arroz tratadas con extractos de *Phormidium foveolarum* y encontraron en ellos sustancias de naturaleza giberélica (Gupta y Shukla, 1969). Por otra parte, los productos extracelulares de la cepa 14a no afectaron el peso seco de la raíz ni el del vástago, ni la relación peso seco de la raíz/peso seco del vástago a los 7 y 14 días de tratamiento. La inhibición de la longitud del vástago a los 14 días podría deberse a un cambio en el balance de fitorreguladores presentes en medio de cultivo.

Cabe señalar que los productos extracelulares de la cepa 14a, aumentaron la longitud radical a los 7 y 14 días de exposición a los mismos, efecto que podría atribuirse a otros metabolitos tales como compuestos de naturaleza auxínica ya detectados en otras cepas de cianobacterias (Caire et al., 1979). La promoción del crecimiento radical tendría la ventaja para la planta en condiciones de campo de poder explorar mayor volumen de suelo para la toma de nutrientes y de agua.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NaCl A LA CUAL LAS PLÁNTULAS DE ARROZ VAR. YERUA SON SUSCEPTIBLES.

### Evaluación del crecimiento de las plántulas

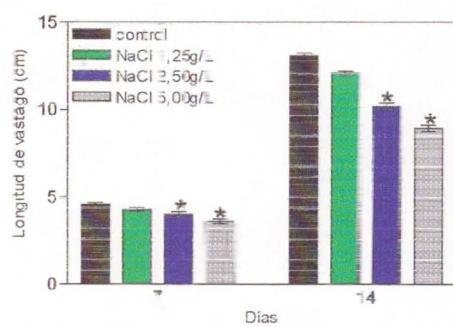


Figura 2.1. Longitud de vástago de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medida a distintos días.

#### Longitud de vástago

La LV disminuye a medida que se incrementa la concentración de NaCl. A los 7 días se acorta un 12% con 2,5g/L y un 21% con 5g/L de NaCl. La reducción del crecimiento se acentúa a los 14 días en un 22% y un 32% para 2,5 y 5g/L de NaCl respectivamente. La concentración 1,25g/L de NaCl no mostró diferencias ni a los 7 ni a los 14 días (Figura 2.1).

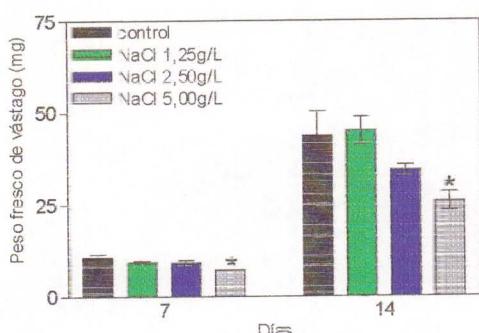


Figura 2.2. Peso fresco de vástago de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medido a distintos días.

### Peso fresco del vástago

A los 7 días de cultivo, las plántulas tratadas con 5g/L de NaCl muestran una disminución del PFV del 33%. Este efecto se incrementa a los 14 días de cultivo a un 41%. El tratamiento con 1,25 y 2,5g/L de NaCl no afectan el PFV ni a los 7 ni a los 14 días (Figura 2.2).

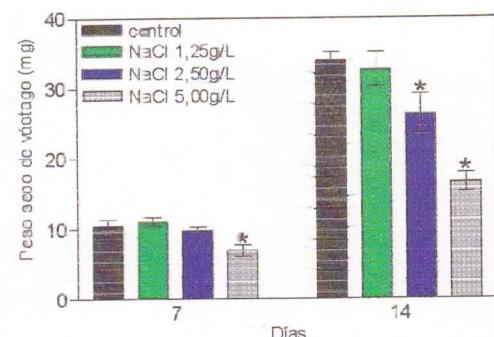


Figura 2.3. Peso seco de vástago de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medido a distintos días.

### Peso seco del vástago

Las plántulas al día 7 muestran una disminución del PSV del 21% con el tratamiento de 5g/L de NaCl y no mostraron diferencias con los otros tratamientos. Al día 14 se vio una disminución del 50% en el PSV de las plántulas sometidas a 5g/L de NaCl. También se observó disminución aunque menor, un 21%, con 2,5g/L. No se vieron diferencias a los 14 días con el tratamiento 1,25g/L (Figura 2.3).

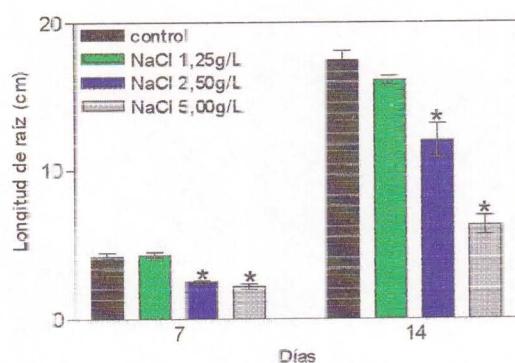


Figura 2.4. Longitud de raíz de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medida en distintos días.

### Longitud de la raíz

La LR también muestra una disminución a medida que aumenta la concentración de NaCl y el tiempo de tratamiento. Al día 7, las plántulas de arroz tratadas con 2,5 y 5g/L de NaCl, tuvieron una inhibición de la LR del 41% y 48% respectivamente. Una disminución del 31% y del 64% se observa a los 14 días, con 2,5 y con 5g/L de NaCl respectivamente. No se vieron diferencias con el tratamiento de 1,25g/L de NaCl tanto a los 7 como a los 14 días (Figura 2.4).

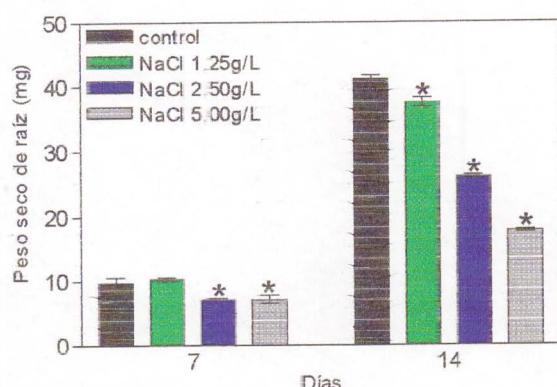


Figura 2.5. Peso seco de raíz de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medido a distintos días.

### Peso seco de raíz

Cuando se cosecharon las plántulas de 7 días, se vio que el PSR, disminuía un 26% tanto con 2,5 como con 5g/L de NaCl. A los 14 días, las plántulas mostraban disminución del peso seco con todas las concentraciones de NaCl probadas. La disminución a los 14 días, del PSR con 1,25g/L de NaCl fue del 9%, con 2,5g/L y 5g/L de NaCl mostraron disminuciones del 36% y del 57% respectivamente (Figura 2.5).

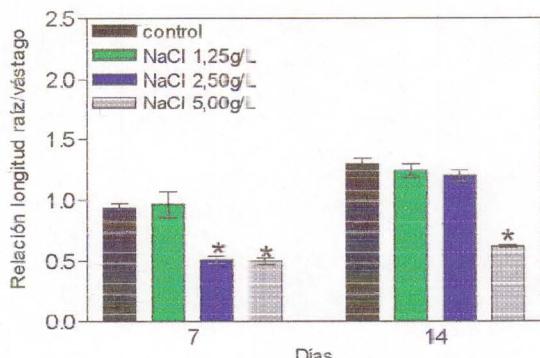


Figura 2.6. Relación longitud raíz/vástago de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medida a distintos días.

### Relación de longitud raíz/vástago

Se observa una disminución del 47% en esta relación para el día 7, tanto para 2,5 como para 5g/L de NaCl. El día 14, la relación disminuye en un 52% con 5g/L de NaCl (Figura 2.6). No hubo diferencias en los otros tratamientos.

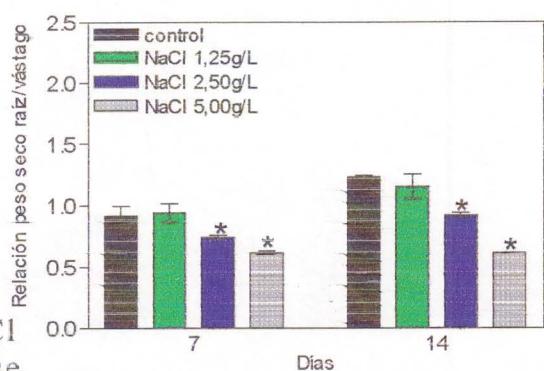


Figura 2.7. Relación peso seco raíz/vástago de plántulas tratadas con distintas concentraciones de NaCl medida a distintos días.

### Relación de peso seco raíz/vástago

La relación PSR/PSV para el día 7, disminuye en las plántulas sometidas a 2,5 y 5g/L de NaCl en un 19% y 33% respectivamente. También se puede observar disminución de dicha relación para el día 14, del 25% con 2,5g/L de NaCl y del 50% con 5g/L de NaCl (Figura 2.7).

*Si bien 1,25 g/L de NaCl, no afectó los parámetros estudiados, la variedad Yerua resultó susceptible a 2,5 y muy susceptible a 5 g/L de sal ya que esta última concentración redujo el crecimiento entre un 32 y un 64% según los parámetros. Cabe destacar que 2,5 y 5 g/L de NaCl, inhibieron la longitud y el peso seco de vástago y raíz, pero esta última fue más afectada ya que la relación raíz/vástago disminuyó en un 50%. Misra et al. (1997), observaron una disminución de la relación raíz/vástago con igual concentración de NaCl (5g/L) en plántulas de edad similar (15 d), pero en una variedad resistente al NaCl. En cambio una variedad de arroz susceptible no modificó la relación con 5g/L pero la aumentó con concentraciones mayores de sal: 10-30 g/L, lo cual indica que el balance raíz/vástago en condiciones de salinidad varía con la resistencia de la planta a la sal.*

*Se sabe que los cereales toleran altas concentraciones de Na<sup>+</sup> externas por restringir el transporte de sodio hacia los vástagos. En nuestros ensayos con 5g/L de NaCl externo, el Na<sup>+</sup> intracelular en la raíz afectó su crecimiento, a pesar de los mecanismos de eflujo comprobados por White (1999). Por esta misma razón no se verificó un aumento de peso fresco del vástago, esperable si se produjera un estrés osmótico por el transporte de Na<sup>+</sup> al vástago, más aún, el peso fresco fue inhibido en un 41%.*

*En los ensayos de salinidad siguientes, se usó 5g/L de NaCl ya que esta concentración inhibió todos los parámetros estudiados y se midieron plántulas de 14 días dado que en ellas, los efectos de la sal fueron mayores.*

### 3. EFECTO DEL GA<sub>3</sub> EN PLÁNTULAS BAJO ESTRÉS SALINO

#### 3.1 Evaluación del crecimiento de las plántulas

##### Longitud del vástago

Dado que el tratamiento con sal produce un a-cortamiento del vástago y se sabe que el GA<sub>3</sub> produce el efecto opuesto, se decidió corroborar estos efectos sobre la variedad Yerua y además estudiar el tratamiento combinado a

Foto 3.1. Longitud de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L

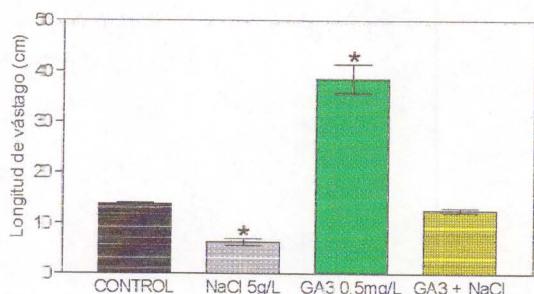
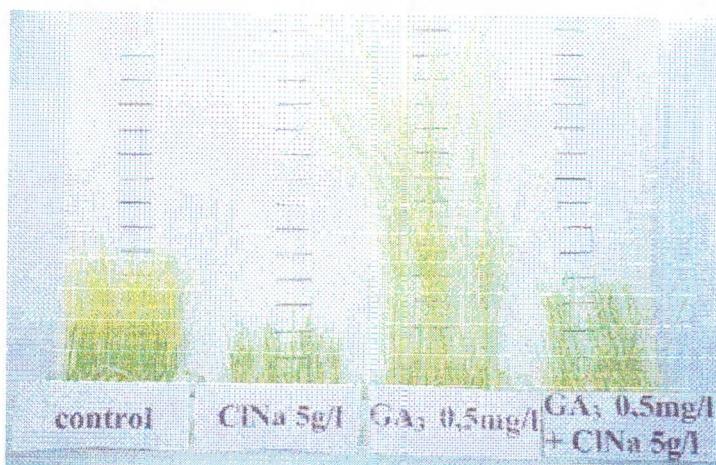


Figura 3.1.1. Longitud de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

los 14 días. Como se esperaba, el tratamiento con GA<sub>3</sub> hizo que el vástago aumentara su longitud un 64%. La promoción del alargamiento del vástago se anuló cuando junto con GA<sub>3</sub> se agregó NaCl. Por otra parte el NaCl produjo una disminución de la longitud del vástago de 54% (Foto 3.1 y Figura 3.1.1).

##### Peso fresco del vástago

Todos los tratamientos producen una disminución del peso fresco del vástago excepto el tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L que produce un aumento del mismo del 39%.

El tratamiento con NaCl 5g/L produjo una disminución del 49% y el tratamiento combinado (GA<sub>3</sub> 0,5mg/L + NaCl 5g/L), una disminución del 32% (Figura 3.1.2).

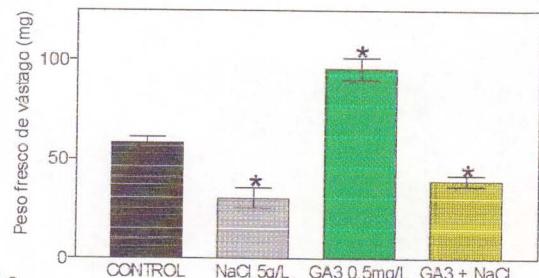


Figura 3.1.2. Peso fresco de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

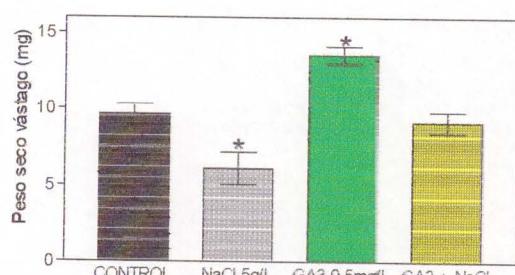


Figura 3.1.3. Peso seco de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

##### Peso seco del vástago

Solo dos tratamientos tuvieron efectos sobre este parámetro y fueron el tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L que produjo un aumento significativo del 29% y el tratamiento con NaCl 5g/L que disminuyó el PSV en un 37%. El tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L + NaCl 5g/L, no mostró diferencias con el control (Figura 3.1.3).

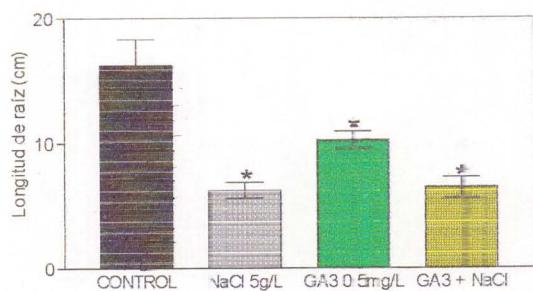


Figura 3.1.4. Longitud de raíz de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

### Longitud de la raíz

Todos los tratamientos produjeron una disminución de la LR (Figura 3.1.4). Los porcentajes de disminución fueron 37%, 61% y 62% para los tratamientos GA<sub>3</sub> 0,5mg/L, GA<sub>3</sub> 0,5mg/L + NaCl 5g/L y NaCl 5g/L respectivamente.

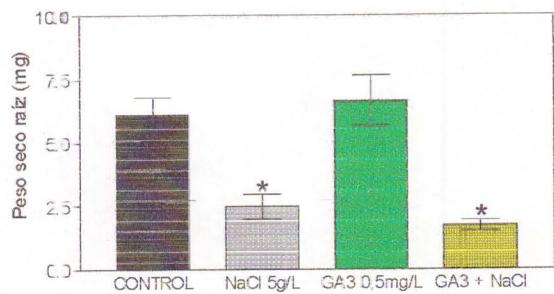


Figura 3.1.5. Peso seco de raíz de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

### Peso seco de raíz

El PSR no se vio modificado por el tratamiento con GA pero si se modificó notoriamente con los tratamientos que contenían NaCl 5g/L. El tratamiento con NaCl mostró un descenso del 59%, mientras que el tratamiento combinado mostró una disminución aun mayor del peso seco de la raíz del 72% (Figura 3.1.5).

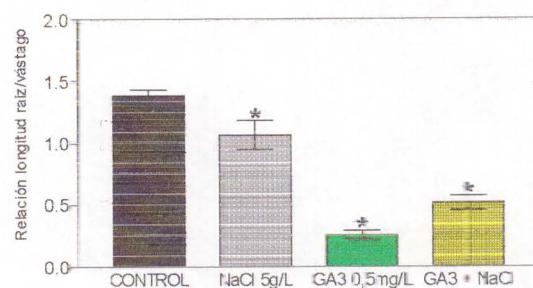


Figura 3.1.6. Relación longitud raíz/vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

GA<sub>3</sub>. El NaCl solo inhibe esta relación en un 23%, es decir que la raíz más afectada (Figura 3.1.6).

### Relación longitud raíz/vástago

El tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L mostró una notable disminución de esta relación (82%) debido a un doble efecto: inhibición de la LR y promoción de la LV. El tratamiento combinado produjo una disminución del 63%, porque el NaCl contrarresta en parte la inducción del crecimiento del vástago por parte del

### Relación peso seco raíz/vástago

En cuanto a la relación PSR/PSV dos tratamientos muestran disminución de dicha relación: el tratamiento con NaCl 5g/L, del 52% y el tratamiento combinado con una disminución del 74%. El tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L no modificó dicha relación (Figura 3.1.7).

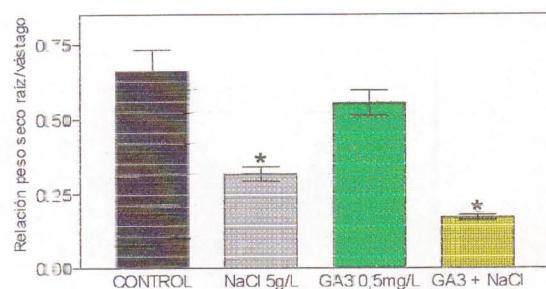


Figura 3.1.7. Relación peso seco raíz/vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

El  $GA_3$  promovió el alargamiento del vástago. Las gibereínas primero promueven la elongación celular en el meristema intercalar ubicado en la base de los entrenudos del tallo de arroz y luego la división celular es estimulada como resultado del crecimiento celular (Sauter y Kende, 1992).

El  $GA_3$  inhibió el largo de raíz, este efecto podría deberse a que la promoción del crecimiento del vástago determina un mejor aprovechamiento de los fotosintatos por el mismo. Esto se puede corroborar por el aumento de su peso seco.

En el tratamiento combinado, el  $GA_3$  revirtió el efecto inhibitorio sobre la longitud del vástago y la reducción del peso seco del vástago, producidos por el NaCl.

En general se considera que las giberelinas aumentan el peso fresco pero no el peso seco. Los resultados con esta variedad de arroz no coinciden con los conceptos generales, dado que en ella el  $GA_3$  aumentó el peso seco del vástago.

El  $GA_3$  inhibió la raíz y promovió el crecimiento del vástago, mientras que el NaCl inhibió ambos parámetros. El NaCl es más perjudicial para la raíz que para el vástago en cuanto a la longitud y al peso seco de ambos órganos, de acuerdo al efecto de la sal sobre las relaciones de dichas medidas. Misra et al. (1997), encontraron que en una variedad de arroz resistente al NaCl, el crecimiento del vástago fue menos afectado que el de la raíz, lo cual coincide con nuestras observaciones ya que en la variedad Yerua, 5g/L de NaCl inhibe en un 54% el largo del vástago y en un 52% el de la raíz. La diferencia radica en que la variedad Yerua es susceptible, dado que reduce su crecimiento en un 50% con dicha concentración, en cambio las variedades resistentes crecen en concentraciones muy superiores, 10, 20 y 30 g/L de NaCl.

### 3.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos

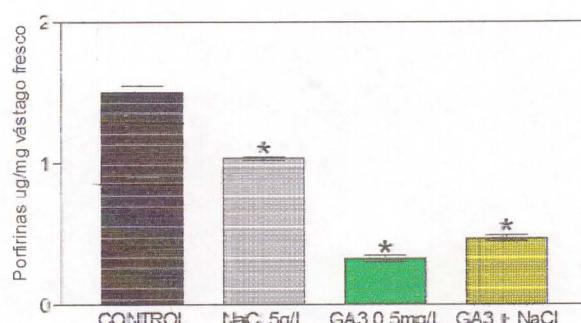


Figura 3.2.1. Concentración de porfirinas libres totales en vástagos de plántulas sométicas a NaCl 5g/L y a  $GA_3$  0.5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

#### Efecto en los niveles de clorofillas a, clorofila b y carotenos

Se puede observar en la figura 3.2.2, que los niveles de clorofila a, aumentaron respecto del control en todos los

#### Efecto en los niveles de porfirinas libres totales

Todos los tratamientos disminuyeron los niveles de porfirinas libres totales del vástago, en un 78% con  $GA_3$  0,5mg/L, un 69% con  $GA_3$  0,5mg/L + NaCl 5g/L y un 31% con NaCl 5g/L (Figura 3.2.1).

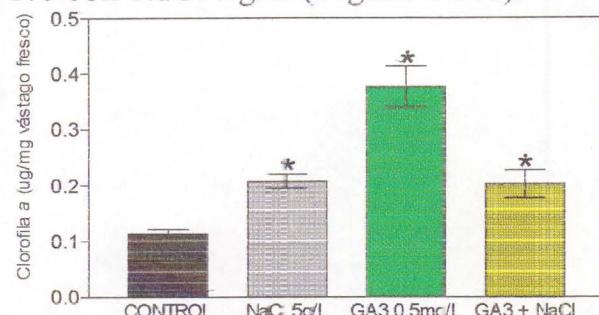


Figura 3.2.2. Concentración de clorofila a en vástagos de plántulas sométidas a NaCl 5g/L y a  $GA_3$  0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

tratamientos. El tratamiento que tuvo mayor efecto fue el de GA<sub>3</sub> 0,5mg/l con un aumento del 70%. Le siguen los efectos del tratamiento combinado, 44% y del NaCl 5g/L, 45%.

Con respecto a la clorofila b, los efectos fueron similares a los de la clorofila a. La figura 3.2.3, muestra que el tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L aumentó el nivel de clorofila b un 71%. El NaCl 5g/L aumentó un 49% y el tratamiento combinado, no mostró diferencias con el control.

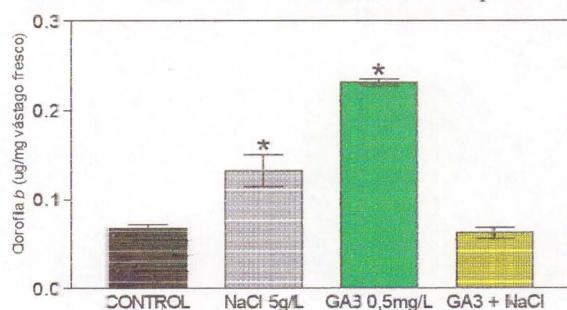


Figura 3.2.3. Concentración de clorofila b en vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

En cuanto a los niveles de carotenos totales, solo el NaCl 5g/L redujo estos pigmentos un 38% (Figura 3.2.4).

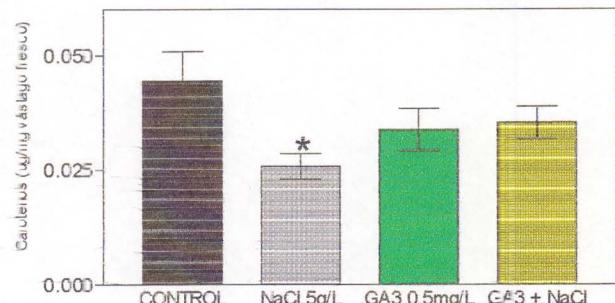


Figura 3.2.4. Concentración de carotenos totales en vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L

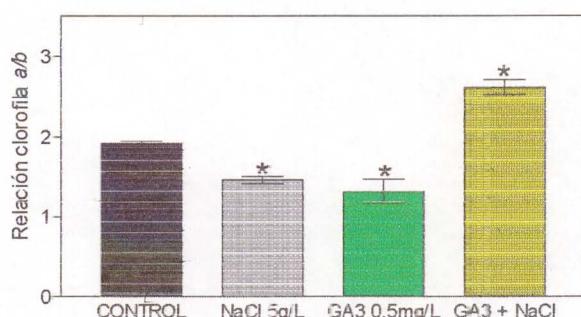


Figura 3.2.5. Relación clorofila a/b de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L.

### Relación de clorofila a/b

Los tratamientos produjeron una disminución de la relación salvo el tratamiento combinado que muestra un aumento de la misma del 26%. El GA<sub>3</sub> 0,5mg/L y el NaCl 5g/L, redujeron la relación en un 31% y un 24% respectivamente (Figura 3.2.5).

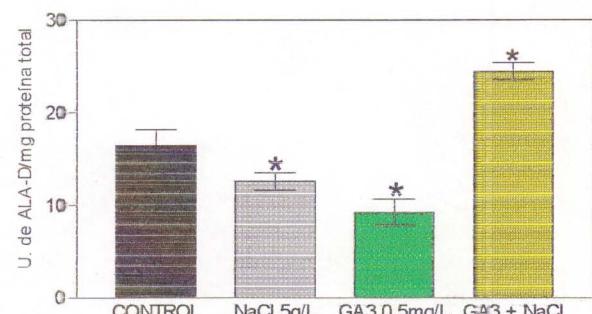


Figura 3.2.6. Actividad ALA-D en vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a GA<sub>3</sub> 0,5mg/L con y sin NaCl 5g/L

**Efecto en la actividad de ALA-Dehidrasa**  
El tratamiento con GA<sub>3</sub> 0,5mg/L disminuyó la actividad un 44% y el tratamiento con NaCl 5g/L un 23%. El tratamiento combinado mostró un efecto contrario, la actividad de ALA-D aumentó un 33% (Figura 3.2.6).

Si bien las porfirinas libres totales así como la actividad de ALA-D disminuyeron con GA<sub>3</sub>, las clorofilas a y b aumentaron con este tratamiento, lo cual estaría relacionado con el aumento de peso seco observado. La relación clorofilas a/b disminuyó, indicando una predominancia de clorofila b, posiblemente debido a un aumento de los procesos de oxidación.

El efecto perjudicial del NaCl sobre los parámetros de crecimiento, también visto en el punto 1, se correspondió con la disminución de la actividad de ALA-D, porfirinas y carotenos así como de la relación clorofillas a/b. La disminución en los carotenos podría estar relacionada con la biosíntesis de ácido abscísico (ABA) a partir de productos de degradación de carotenoides (Quantrano et al., 1997). En hojas etioladas y raíces, las cuales tienen niveles bajos de carotenoides, se encontró una estequiometría 1:1 entre la desaparición de violaxantina y neoxantina y la aparición de ABA y sus catabólicos (Kende y Zeevaart, 1997). Este fito-regulador es sintetizado en respuesta a señales de desarrollo y de estrés y podría ser responsable de la inhibición del crecimiento observada. El ABA acelera la velocidad de adaptación al NaCl en células de tabaco y está involucrado en la síntesis de una proteína asociada con dicha adaptación (Singh et al., 1987).

El efecto tóxico del catión Na<sup>+</sup> (White, 1999) se manifestó en todos los parámetros bioquímicos estudiados salvo en el contenido de clorofila a y de clorofila b, los cuales aumentaron posiblemente como adaptación al estrés, reteniendo la capacidad fotosintética.

El tratamiento combinado (GA<sub>3</sub> + NaCl) aumentó la actividad de ALA-D, lo cual concuerda con la reversión de la inhibición de la altura del vástago debida al NaCl. Este tratamiento disminuyó las porfirinas libres totales. Sin embargo la concentración de clorofila a aumentó y la b no fue afectada, con lo cual la relación de ambas aumentó, indicando que de alguna manera el efecto del estrés por NaCl sobre los pigmentos fotosintéticos se encontraba amortiguado. Esto podría deberse a un detrimiento de las vías que conducen a la síntesis de otros productos de la biosíntesis de porfirinas.

Vettakkorukankav et al. (1999), observaron que plantas de cebada tratadas con GA<sub>3</sub> y luego con calor, contenían menos pigmentos fotosintéticos y presentaban pérdida de la integridad de las membranas. En estas plantas, el agregado de GA<sub>3</sub> aumentó la susceptibilidad al estrés por calor. De acuerdo con nuestros resultados, el agregado de GA<sub>3</sub> no aumentaría la susceptibilidad de las plántulas de arroz var. Yerua al estrés salino.

## 4. EFECTO DE LOS PRODUCTOS EXTRACELULARES DE *Scytonema hofmanni* 14a SOBRE PLÁNTULAS DE ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO

### 4.1 Evaluación del crecimiento de las plántulas

Foto 4.1. Longitud de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.



#### Longitud del vástago

Los PE inhibieron el LV de plántulas de 14 días en un 22%. La inhibición del LV coinciden con otros autores que observaron los mismos efectos pero con PE de otra cepa de cianobacterias y otra variedad de arroz (Caire et al., 1979; Mulé et al., 1999).

El tratamiento con PE + NaCl 5g/L, disminuyó la LV en un 38%, siendo este porcentaje de disminución menor que el observado cuando solo se agregaba NaCl (54%) (Foto 4.1 y Fig. 4.1.1).

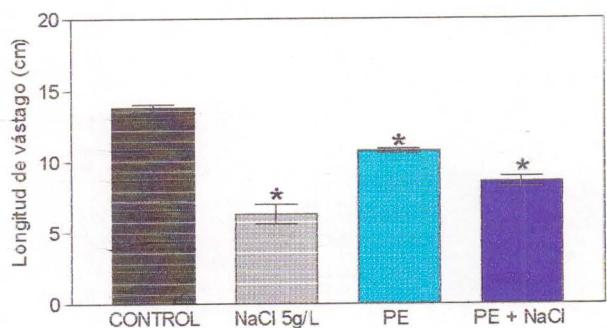


Figura 4.1.1. Longitud de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

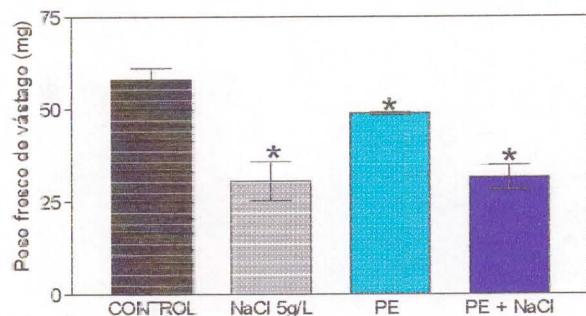


Figura 4.1.2. Peso fresco de vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

### Peso seco del vástago

Los tratamientos con PE y con PE + NaCl 5g/L, no mostraron diferencias con el control. El NaCl disminuyó el PSV en un 37% (Fig. 4.1.3).

### Peso fresco del vástago

Los tratamientos que producen mayor porcentaje de reducción del PFV son: NaCl 5g/L (49%) y PE + NaCl 5g/L (46%). La reducción menos drástica fue la producida por los PE (16%) (Fig. 4.1.2).

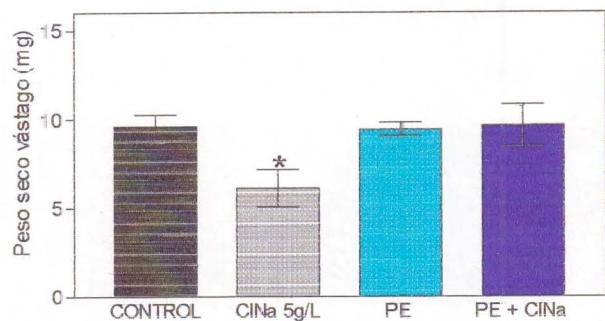


Figura 4.1.3. Peso seco de vástago de plántulas sometidas a CINa 5g/L y a PE con y sin CINa 5g/L.

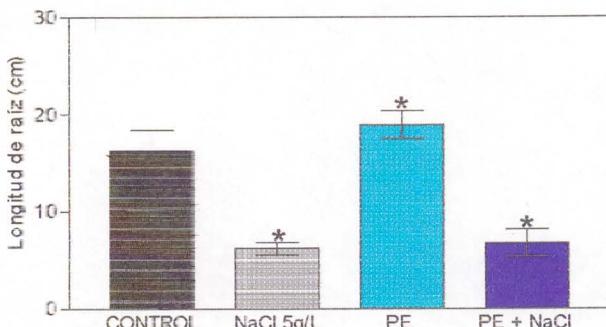


Figura 4.1.4. Longitud de raíz de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

### Longitud de la raíz

El tratamiento con PE aumentó la LR en un 14%. Para el NaCl 5g/L y los PE + NaCl 5g/L, hubo una disminución del 62 y 59% respectivamente (Fig. 4.1.4).

### Peso seco de raíz

El peso seco de la raíz no se vio modificado por el tratamiento con PE. El NaCl lo disminuyó en un 59% y el combinado en un 41% (Fig. 4.1.5).

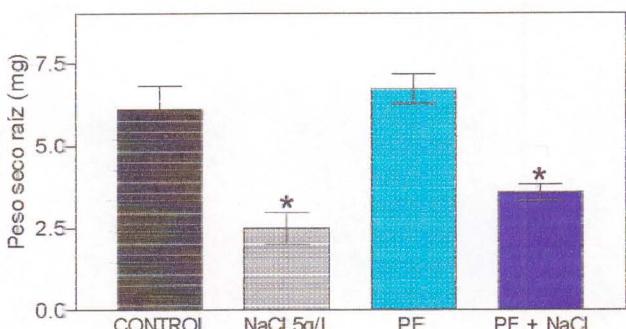


Figura 4.1.5. Peso seco de raíz de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

### Relación longitud raíz/vástago

Todos los tratamientos produjeron una disminución de la relación LR/LV excepto el tratamiento con PE que aumentó la relación un 26%, debido a un doble efecto: inhibición del vástago y promoción de la raíz.

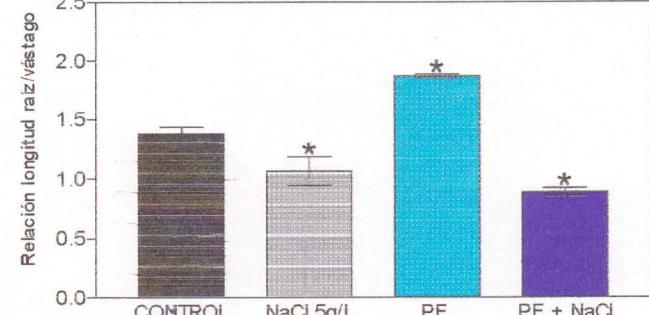


Figura 4.1.6. Relación longitud raíz/vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

### Relación peso seco raíz/vástago

En cuanto a la relación PSR/PSV, el tratamiento con la sal y el tratamiento combinado muestran disminuciones similares: del 52% y 48% respectivamente. Los PE no modificaron dicha relación (Fig.4.1.7).

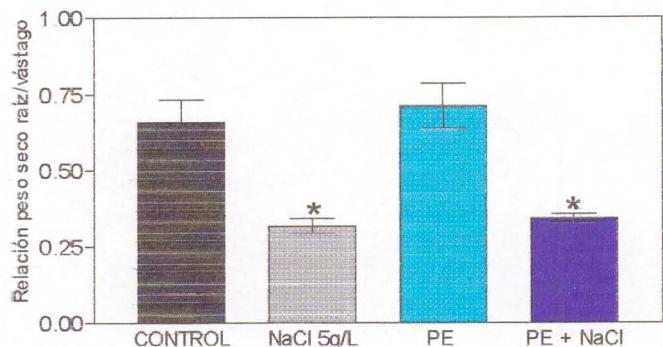


Figura 4.1.7. Relación peso seco raíz/vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

Cabe destacar que los productos extracelulares de la cepa 14a, luego de 14 días de tratamiento, tuvieron efectos opuestos a los observados con GA<sub>3</sub>, dado que inhibieron el crecimiento del vástago (22%) y promovieron el de la raíz (14%). Estos resultados coinciden con los de Gupta y Lata (1964) quienes vieron una inhibición en el largo del vástago de plántulas de arroz, producida por exometabolitos de *Phormidium autumnale* y *P. corium*. Caire et al.(1979), también observaron inhibición del crecimiento del vástago e inducción del crecimiento radical en plántulas de arroz var. Fortuna por productos extracelulares de una cepa de *Nostoc muscorum*. Cano et al. (1979), también coinciden con los resultados obtenidos ya que determinaron un aumento en el largo de las raíces producido por sustancias extracelulares de una cianobacteria unicelular, *Aphanthece stagnina*, sobre plántulas de la misma variedad de arroz. En cambio, un incremento en la longitud del vástago, fue observado al tratar plántulas de arroz de dicha variedad con productos extracelulares de *N. muscorum* (79a) y *Tolyphothrix tenuis* (40d) (Mulé et al., 1999). El incremento en el crecimiento de las raíces tendría un valor adaptativo para las plántulas bajo este tipo de estrés.

*Los productos extracelulares de la cepa 14a, no afectaron el peso seco del vástago ni el de la raíz y por lo tanto tampoco afectaron la relación entre ambos. El NaCl solo o en combinación con los productos extracelulares disminuyó el peso seco de la raíz y la relación peso seco radical/peso seco del vástago. De acuerdo a los resultados obtenidos con el tratamiento combinado (PE + NaCl), los productos liberados al medio por la cepa 14a no revirtieron el efecto de inhibición del largo de la raíz que produjo la sal, así como tampoco la reducción de la relación de los pesos secos. Los PE solo revirtieron parte (16%) de la inhibición del largo del vástago producida por NaCl.*

## 4.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos

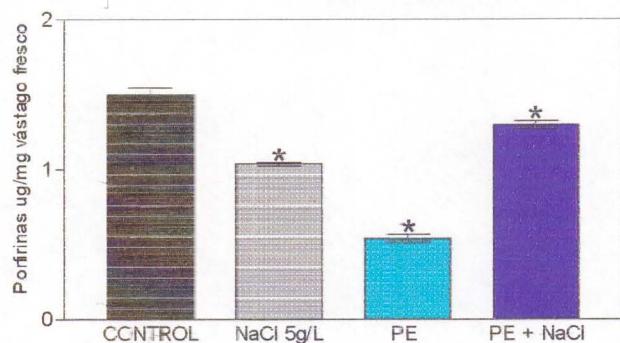


Figura 4.2.1. Concentración de porfirinas libres totales en vástagos de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

### Efecto en los niveles de porfirinas libres totales

Los niveles de porfirinas libres totales del vástago disminuyeron en todos los tratamientos. Con los PE se observó una inhibición del 64%, en el caso del NaCl 5g/L del 31%, siendo menor para el tratamiento combinado (Fig.4.2.1).

### Efecto en los niveles de clorofilas a, clorofila b y carotenos

Al realizar las mediciones de clorofila a, clorofila b y carotenos, se observaron efectos dispares para cada sustancia o combinación de ellas. Se puede observar en la figura 4.2.2, que los niveles de clorofila a, varían respecto

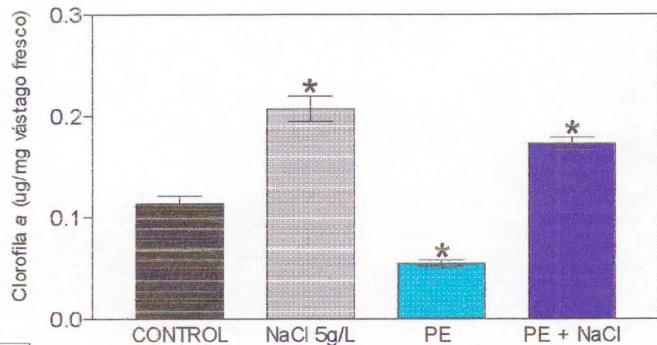


Figura 4.2.2. Concentración de clorofila a en vástagos de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

del control para todos los tratamientos.

El tratamiento con PE fue el único que mostró inhibición y el resto de los tratamientos aumentaron los niveles de clorofila a en el vástago en distintos porcentajes. El tratamiento con PE + NaCl 5g/L produjo un aumento del 35%. El único tratamiento que mostró disminución fue el tratamiento con PE que redujo el nivel un 51%.

Con respecto a los niveles de clorofila b, los efectos fueron similares a los de la clorofila a. Se observa en la figura 4.2.3, un aumento con NaCl 5g/L y PE + NaCl 5g/L (49% y 43% respectivamente).

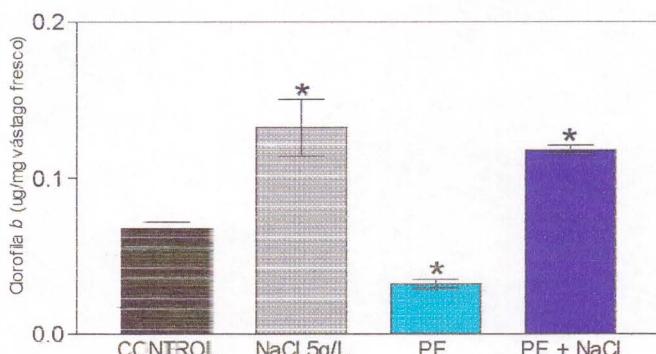


Figura 4.2.3. Concentración de clorofila b en vástagos de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

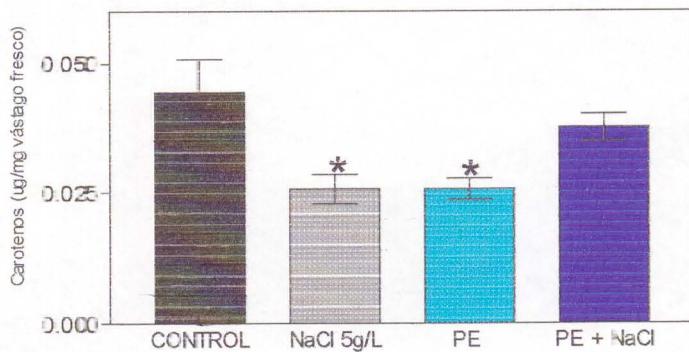


Figura 4.2.4. Concentración de carotenos totales en vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

En cuanto a los niveles de carotenos totales, el NaCl 5g/L y los PE redujeron los niveles en 38% y 41% respectivamente (Figura 4.2.4).

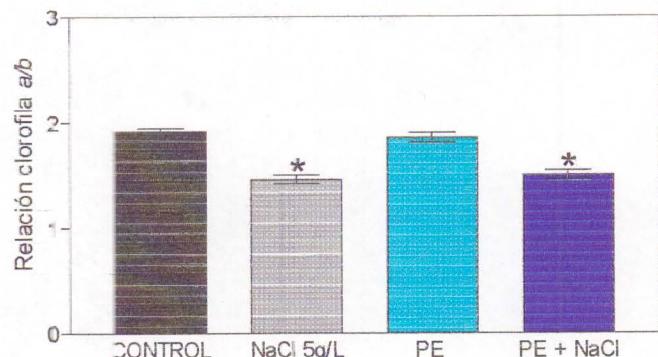


Figura 4.2.5. Relación clorofila a/b de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

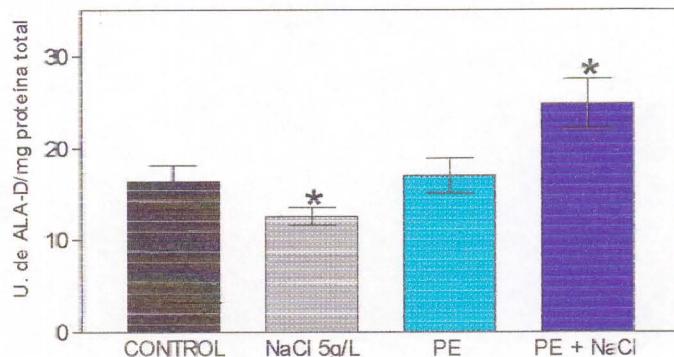


Figura 4.2.6. Actividad ALA-D en vástago de plántulas sometidas a NaCl 5g/L y a PE con y sin NaCl 5g/L.

#### Efecto en la actividad de ALA-Dehidrasa

El tratamiento con PE no afectó la actividad de ALA-D. El tratamiento con NaCl 5g/L hizo que la actividad enzimática decayera un 23%. El tratamiento combinado produjo un aumento del 34% (Figura 4.2.6).

*Los productos extracelulares cianobacterianos no afectaron la actividad de ALA-D pero disminuyeron la cantidad de porfirinas libres totales, clorofila a y b y carotenos de las plántulas de arroz. La relación clorofila a/b no fue afectada porque la disminución de ambas tuvo igual magnitud. El descenso de las clorofilas a y b estaría relacionado con la inhibición del largo de vástago producida por los productos extracelulares de la cepa 14a, así como con un "pool" menor de porfirinas libres. La disminución en el nivel de carotenos podría explicar también la inhibición de la longitud del vástago por una mayor síntesis de ABA, como señalamos en el punto 3 (Kende y Zeevaart, 1997). Estos resultados indican que al*

seleccionar una cepa a fin de utilizarla como biofertilizante, es importante determinar no sólo su capacidad de fijar  $N_2$  sino también el efecto de sus sustancias bioactivas sobre las plantas a cultivar.

El tratamiento combinado (PE + NaCl) aumentó la actividad de ALA-D y las clorofillas a y b. También amortiguó la inhibición del largo del vástago inducida por el NaCl. Las porfirinas libres totales disminuyeron, posiblemente por el aumento en los niveles de clorofila y otros productos finales.

## 5. EFECTOS DE LOS PE DE LA CEPHA 14a EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DEL CULTIVO DE LA MISMA, SOBRE LAS PLÁNTULAS DE ARROZ

### 5.1 Evaluación del crecimiento de las plántulas

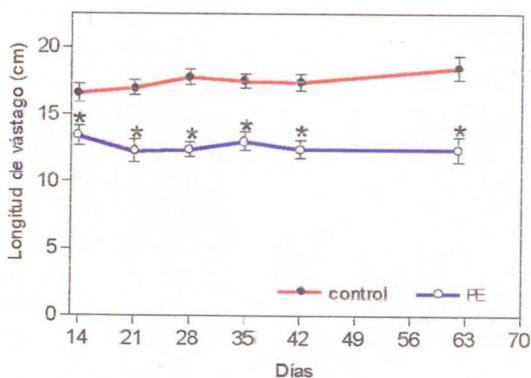


Figura 5.1.1. Longitud de vástago de plántulas tratadas con PE de cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

#### Longitud de vástago

Los PE de la cepa 14, obtenidos en distintos días de la fase estacional y post-estacional del cultivo, inhibieron la longitud del vástago (Figura 5.1.1). La inhibición producida por los PE correspondientes al día 14 fue del 19%. Los PE de los días 21, 28, 35, 42 y 62, produjeron una disminución muy similar de  $29 \pm 4\%$ .

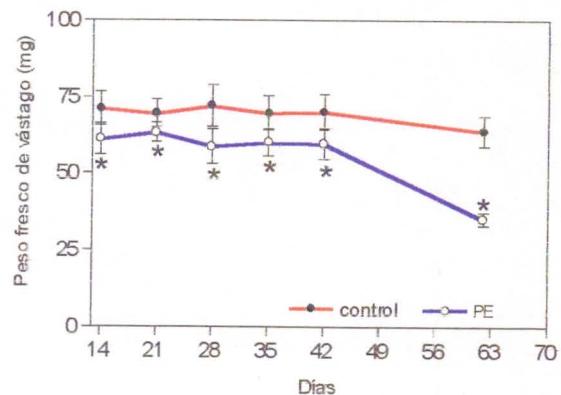


Figura 5.1.2. Peso fresco de vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídas en distintos días.

#### Peso fresco del vástago

Los PE extraídos del cultivo en los días 14, 21, 28, 35 y 42, disminuyeron el peso fresco del vástago en un  $14 \pm 5\%$ . Los PE extraídos del cultivo el día 62, mostraron un efecto de disminución del peso fresco del vástago del 45% (Figura 5.1.2).

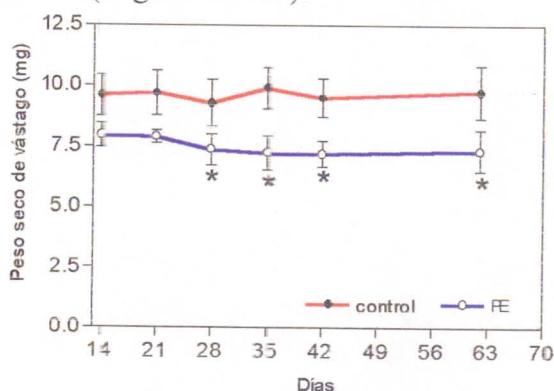


Figura 5.1.3. Peso seco de vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídas en distintos días.

#### Peso seco del vástago

El peso seco del vástago, tuvo una disminución aproximadamente uniforme cuando se hacían crecer las plántulas de arroz con los PE cianobacterianos obtenidos a distintas edades del cultivo. Los PE obtenidos en los días 14 y 21 no mostraron diferencias con el control, sin embargo a partir del día 28 y en

los días 35, 42 y 62 se vio un efecto de disminución bastante homogéneo del peso seco del  $24 \pm 4\%$  (Figura 5.1.3).

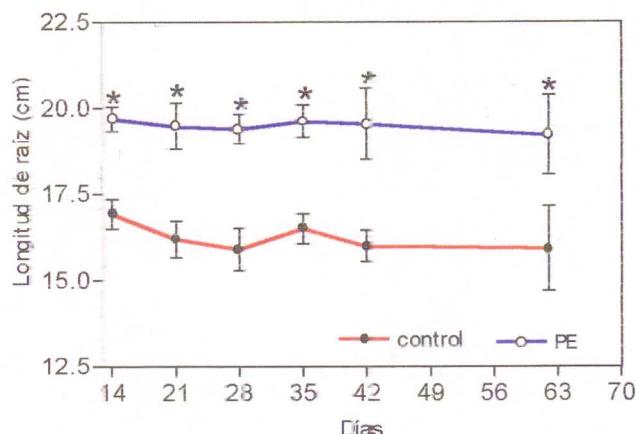


Figura 5.1.4. Longitud de raíz de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

#### Peso seco de raíz

Este parámetro no mostró ninguna diferencia con ninguno de los PE probados obtenidos en los distintos días de edad del cultivo cianobacteriano (Figura 5.1.5).

#### Longitud de raíz

Los PE produjeron una estimulación que osciló en un valor del  $17 \pm 3\%$  (Figura 5.1.4).

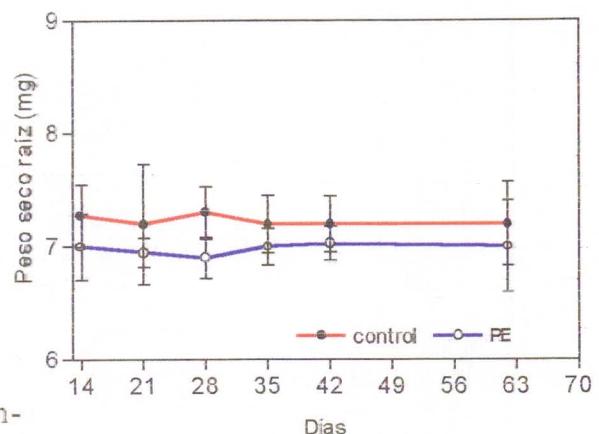


Figura 5.1.5. Peso seco de raíz de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos a distintos días.

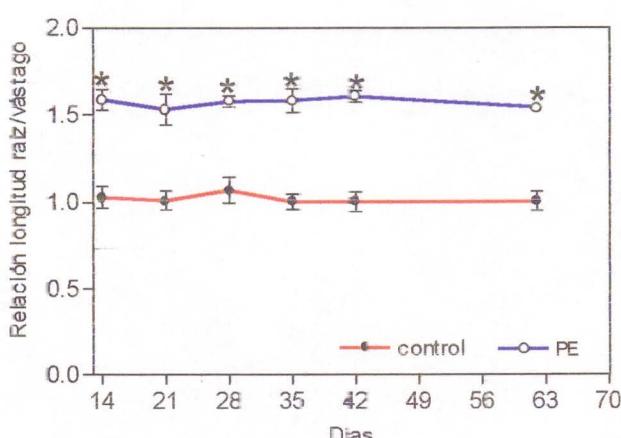


Figura 5.1.6. Relación longitud raíz/vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

#### Relación de longitud raíz/vástago

Esta relación se mantuvo constante a lo largo de esta etapa experimental, siendo un  $35 \pm 3\%$  mayor que el control, dado que hubo estimulación del largo radical e inhibición de la longitud del vástago (Figura 5.1.6).

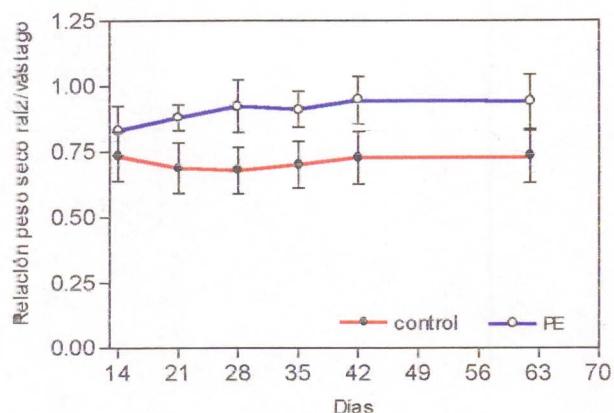


Figura 5.1.7. Relación peso seco raíz/vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

#### Relación de peso seco raíz/vástago

Esta relación se mantuvo sin mostrar diferencias con el control para todos los PE de distintos tiempo de cultivo (Figura 5.1.7).

*La disminución del peso fresco y seco del vástago producida por los productos extracelulares liberados por la cepa 14a durante toda la fase estacionaria se correspondió con la menor longitud alcanzada por el vástago de las plántulas de arroz por efecto de dichos productos.*

*Los productos extracelulares aumentaron la longitud de la raíz, pero no afectaron el peso seco de la misma, es decir que tuvieron con respecto a la longitud de raíz un efecto contrario al vástago. Esto podría deberse a la presencia de sustancias de naturaleza auxinica liberadas por las cianobacterias al medio de cultivo durante toda la fase estacionaria, lo cual concuerda con resultados de distintos autores como señalamos en el punto 4.1.*

*Los resultados obtenidos con los productos liberados al medio durante la fase estacionaria mostraron valores de crecimiento prácticamente constantes, lo cual sugiere que dichos productos tendrían una naturaleza similar, dado que produjeron los mismos efectos.*

## 5.2 Parámetros bioquímicos en los vástagos

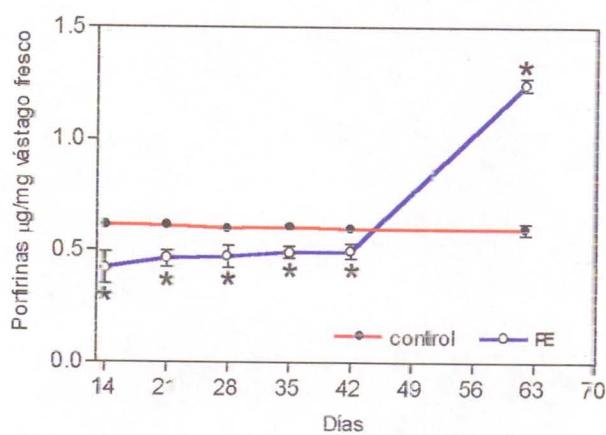


Figura 5.2.1. Concentración de porfirinas libres totales de vástagos de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos a distintos días.

### Efecto en los niveles de porfirinas libres totales

Los PE extraídos los días 14, 21, 28, 35 y 42 disminuyen la concentración de porfirinas en montos similares. Con los PE extraídos el día 14 la disminución fue de un 31% y en los días siguientes el porcentaje de disminución fue de un  $20 \pm 4\%$ . Los PE extraídos el día 62 producen un aumento del 52% (Fig. 5.2.1).

### Efecto en los niveles de clorofila a, clorofila b y carotenos

La clorofila a disminuyó  $42 \pm 7\%$  para todos los tratamientos. Para el día 62 la concentración de clorofila a mostró un porcentaje de inhibición menor (27%) (Figura 5.2.2). La clorofila b disminuyó en un  $53 \pm 3\%$  con los PE extraídos en los días 14 al 42. En el día 62 del cultivo, los PE no mostraron diferencias con el control (Figura 5.2.3).

Los PE extraídos a los 14, 21, 28, 35 y 42, también provocaron una disminución simi-

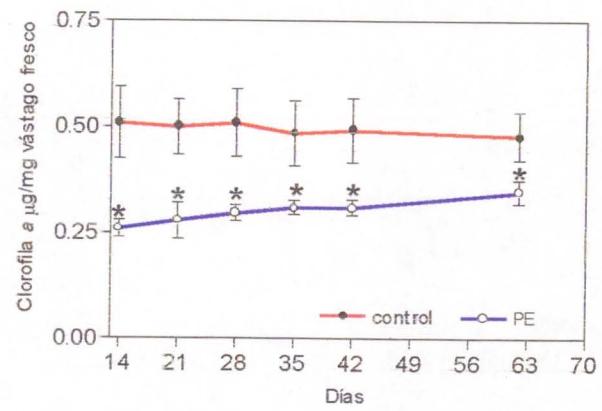


Figura 5.2.2. Concentración de clorofila a de vástagos de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

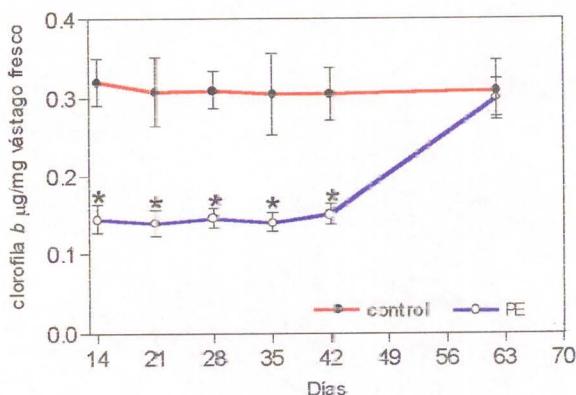


Figura 5.2.3. Concentración de clorofila b de vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

La concentración de carotenos totales de las plántulas sometidas a PE de 14 días disminuyó un 56%; a partir del día 21 y en los días 28, 35, 42 la disminución de la concentración de carotenos se mantuvo en un valor del 43 = 2%, pero en el día 62 el efecto fue el inverso, observándose un aumento de la concentración del 23% (Figura 5.2.4).

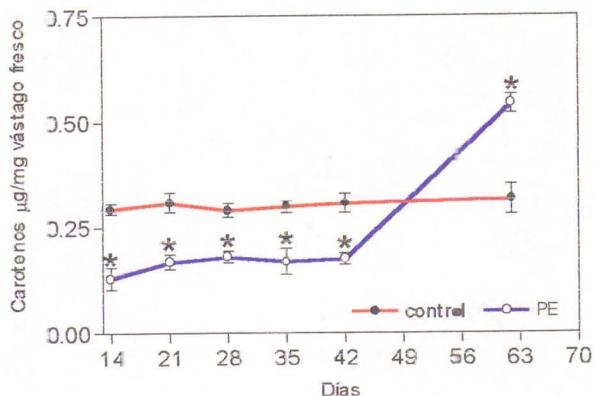


Figura 5.2.4. Concentración de carotenos totales de vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

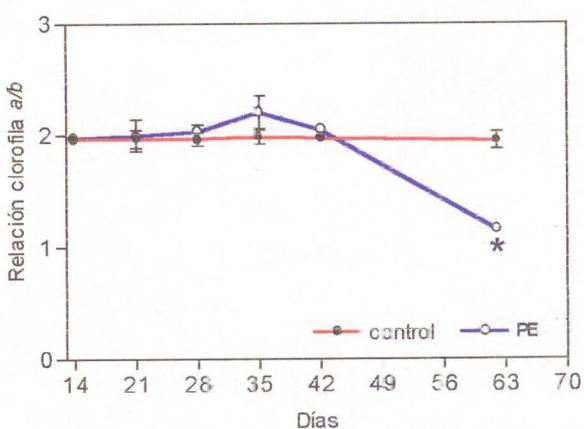


Figura 5.2.5. Relación de clorofila a/b de vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

### Efecto en la actividad de ALA-Dehidrasa

Cuando se midió la actividad de la enzima ALA-D en las plántulas crecidas con los PE extraídos los días 14, 21, 28, 35 y 42 no se observaron diferencias con el control. Sin embargo los PE del día 62 del cultivo, produjeron una disminución notoria de la actividad del 30% (5.2.6).

lar en la concentración de carotenos totales, no así los PE del día 62, que mostraron un efecto de aumento muy notorio de dicha concentración.

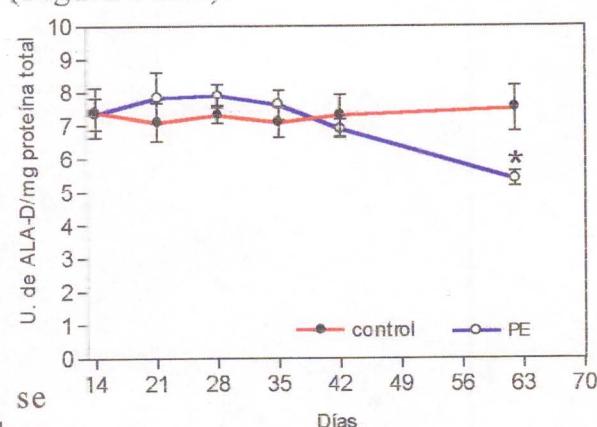


Figura 5.2.6. Actividad de ALA-D en vástago de plántulas tratadas con PE de un cultivo de la cepa 14a, extraídos en distintos días.

Dado que los parámetros bioquímicos estudiados en las plántulas fueron afectados de igual forma por los productos extracelulares de los días 14 al 42, podemos suponer que los productos liberados por la cepa cianobacteriana al medio de cultivo durante ese lapso, son los mismos. Sólo con los productos extracelulares del día 62 (fase post-estacionaria), cuando el cultivo cianobacteriano comienza a degradarse lo cual implica una gran liberación al medio de sustancias intracelulares, se observaron cambios importantes en las plántulas de arroz que crecieron en un medio hidropónico con dichos productos extracelulares. Los cambios fueron: disminución de la actividad de ALA-D, aumento relativo de clorofila b y aumento de carotenos. Estos resultados reflejan un estado de estrés o comienzo de la senescencia de las plántulas de arroz. Un aumento de clorofila b con respecto a la fase estacionaria podría ocurrir, dado que es una forma oxidada, por un incremento en los procesos de oxidación. El mayor contenido de carotenos al día 62, estaría relacionada con el descenso de clorofila a puesto que podría estar sujeta a fotoinhibición o destrucción por especies de oxígeno reactivas y en esta situación los carotenos podrían cumplir una función protectora.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- Los productos extracelulares varían a nivel de la cepa cianobacteriana usada, así como sus efectos con el tiempo de exposición de las raíces de arroz a dichos productos.
- Ninguna cepa tuvo efectos inhibitorios o promotores de todos los parámetros de crecimiento medidos en las plántulas de arroz.
- Los productos extracelulares de *Scytonema hofmanni* (14a) produjeron en plántulas con 7 días de tratamiento, efectos similares al GA<sub>3</sub>.
- El arroz variedad Yerua resultó susceptible a 2,5 y muy susceptible a 5 g/L de sal.
- El NaCl inhibe la longitud y el peso seco de vástago y raíz, siendo esta última más afectada.
- El efecto perjudicial del NaCl sobre el crecimiento se corresponde con la disminución de la actividad de ALA-D, porfirinas y carotenos así como de la relación clorofilas a/b.
- El GA<sub>3</sub> promovió el alargamiento del vástago e inhibió el largo de raíz.
- El GA<sub>3</sub> revirtió el efecto inhibitorio sobre la longitud del vástago y la reducción del peso seco del vástago, producidos por el NaCl.
- Los productos extracelulares de *S. hofmanni* (14a), en plántulas con 14 días de tratamiento, tienen efectos opuestos a los observados con GA<sub>3</sub>, dado que inhiben el crecimiento del vástago y promueven el de la raíz, indicando esto último una posible actividad auxínica.
- La actividad de ALA-D no fue afectada por los productos extracelulares de *S. hofmanni* (14a), solo fue disminuida por productos extracelulares de 62 días (fase post-estacionaria).
- Dichos productos revierten sólo parte de la inhibición del largo del vástago producida por NaCl.
- Los productos liberados al medio durante toda la fase estacionaria tendrían una naturaleza similar, dado que producen los mismos efectos sobre el crecimiento y la biosíntesis de porfirinas en las plántulas de arroz.
- La selección de una cianobacteria a fin de utilizarla como biofertilizante, debe contemplar no sólo la determinación de su capacidad de fijar N<sub>2</sub> sino también el efecto de sus sustancias bioactivas sobre las plantas a cultivar.

# ANEXOS

## **ANEXO I**

### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Oryza sativa* L.**

#### **Generalidades**

Se realiza la descripción botánica de las variedades utilizadas sobre la base de la información por el Instituto Nacional de Semillas – INASE – de la Argentina que se encuentra contenida en una clave de registro de variedades que debe ser cumplimentada por las personas que las inscriben.

*Oryza sativa* L. es una gramínea que pertenece a la Tribu Oryceae que se caracteriza por ser una planta anual, erecta, glabra, con hojas lineales largas con una ligula membranosa y una panícula angosta de 20-30cm. Tiene espiguillas lateralmente comprimidas con flores hermafroditas, escamas basales o lemma estériles presentes, la cual, es a menudo aristada y en general coriácea y rígida (Burkart, 1969).

La variedad Yerua pertenece a la subespecie japónica o “arroz común” que se caracteriza por tener cariopses medianos, anchos y gruesos, 1,5 a 5 veces más largos que anchos. Lemma mütica o aristada, pubescente o casi glabra (Dimitri, 1987).

En nuestro país se cultivan plantas de arroz en las provincias del litoral, principalmente en Corrientes y Entre Ríos por su valor económico y alimenticio.

## **VARIEDAD YERUA P. A.**

La descripción corresponde a cultivares observados en la localidad de Los Hornos – La Plata – de la Provincia de Buenos Aires.

Plántula de 19cm con vaina de la hoja basal verde oscuro. Planta de porte vegetativo erecto de 119cm de alto, muy vigorosa, macollaje regular, senescencia foliar tardía y lenta. Tallo de porte intermedio con 4 entrenudos de 71mm de diámetro externo, verde en su superficie interna y externa; pulvino de la vaina y tabique verdes; la resistencia al vuelco es intermedia. La vaina de la hoja inferior a la hoja bandera es verde clara en su superficie interna y externa; ligula corta, incolora y hendida; collar y aurícula incoloros. Lámina de la hoja inferior a la hoja de bandera es de porte erecto, de 51cm de largo, 13mm de ancho, 698cm<sup>2</sup>, verde claro, y pubescente. Hoja bandera horizontal. Panoja intermedia, pendiente con pocas ramificaciones secundarias, de 252cm de longitud, moderadamente exerta, desgrane moderado y trillabilidad intermedia. Espiguilla con estigmas púrpura; Lemmas estériles amarillo pajizo; medianas, lemma y pálea verde a la artesis y amarillo pajizo cuando las espiguillas terminales están maduras, pelos cortos en la posición superior; aristas cortas y parcialmente aristadas de 7mm de largo, púrpura; Apículo blanco en antesis y pardo a la madurez, fértil. Cariopse con pericarpo blanco, poco letargo, peso con cáscara 368grs y 202% de cáscara; endosperma normal, claro o transparente, 20% de granos con "Panza blanca" tipo ventral con poca intensidad.

La siembra se realiza a mediados de octubre. El panojamiento se produce a los 94días y la madurez de cosecha a los 138días de producirse la emergencia. La respuesta al fotoperíodo es indiferente. Tiene poco rebrote.

La variedad es susceptible a *Pyricularia oryzae* y resistente a *Sclerotium oryzae*, careciéndose de información para las demás enfermedades y plagas. Es resistente a las bajas temperaturas en el estadio de plántula, en macollaje y en estado reproductivo. Su rendimiento es de 7500Kg/ha.

En cuanto a la calidad industrial los cariopses carecen de aroma, tienen un contenido de amilosa intermedio, la consistencia del gel es mediana y el rendimiento del grano entero es del 64% y del quebrado es del 40%.

(Referencias descriptivas., Ver el punto: Descripción botánica de las variedades de arroz mas arriba).

### **Otras variedades cultivadas en nuestro país**

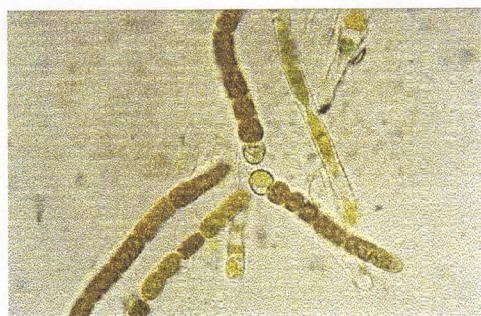
Embrapa 7, Fortuna INTA, BR/Irga 409, Irga 410-B, El Paso 144, CT 6919 INTA, San Miguel INTA (FECOAR), EMBRA 6 – Chui.

## ANEXO II

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS CEPAS CIANOBACTERIANAS (GEITLER, 1932).

#### *Tolypothrix tenuis* (11a)

Cojín coposo arbustivo, pocas veces en forma de acolchado color azul verdoso a pardo, al principio es fija y luego de vida libre. Los filamentos (4) son de 2cm de



largo y 5 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, con abundantes ramificaciones falsas. Las paredes transversales son levemente constreñidas. Las células en su mayoría son de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de ancho y son tan largas como anchas o quizás un poco más largas que anchas. Los colores van desde el verde azulado hasta el verde oliva y la vaina es angosta, fina e incolora o amarilla. Los heterocistos (4-5) son redondeados. Viven en aguas salobres. El tipo es denominado por la mayoría de los autores como *Tolypothrix lanata*. De hecho, existen formas intermedias entre ambos tipos de manera tal que su delimitación es a menudo difícil de establecer. Sin embargo, se justifica mantener los tipos extremos debido a sus diferentes tamaños. *Tolypothrix inflata* descripta por Ghose pertenece seguramente aquí; el engrosamiento de la vaina en la base de las ramificaciones, el cual Ghose ve como característico, aparece a menudo en *Tolypothrix tenuis* y en *Tolypothrix lanata*.

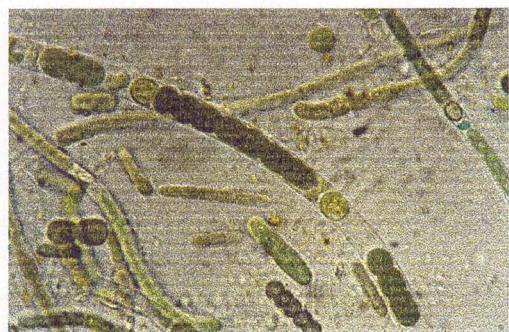
#### *Microchaete tenera* (14b)

Filamentos de 6 a 7  $\mu\text{m}$  de ancho, solitarios, levemente curvados. Vainas finas, angostas, incoloras sin estratificación. Las células de 5  $\mu\text{m}$  de ancho verde azuladas, son en la base del filamento hasta 2 veces más largas que anchas. En el extremo apical tan largas como anchas. Los heterocistos basales e intercalares, son casi esféricos o cilíndricos. Las acinetas se agrupan en hileras basales o intercalares y son cilíndricas con paredes pardas de 5 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho y 13 a 17  $\mu\text{m}$  de largo. Viven en aguas estancadas, mas bien cosmopolitas. La delimitación de los tipos no es del todo clara.



### *Scytonema hofmanni* (14a)

Cojín con forma acolchada de 1 a 2mm de altura de color verde azulado negruzco. Los filamentos a menudo, están reunidos en haces de 7 a 8 $\mu\text{m}$  de ancho, a veces más anchos, con escasas ramificaciones falsas. Las vainas angostas, son finas e incoloras o amarillas hasta amarillo pardo, y no están estratificadas. Las células de 5 a 6 $\mu\text{m}$  de ancho, en la parte mas vieja del tricoma a menudo mas largas que anchas. En los meristemas, las células son mas cortas y de color verde azuladas. Los heterocistos son solitarios o de a pares, con formas redondeadas y cilíndricas. Se encuentran en paredes y tierra húmedas en invernáculos y son cosmopolitas. Todos los tipos se unifican generalmente bajo *Scytonema julianum*, con el cual muestran de hecho un gran parecido. Geitler considera que *Scytonema hofmanni* por tener vainas más delgadas y no calcificadas no pertenecen a este tipo (de acuerdo con Hemmemann).



### *Nostoc muscorum* (69b)

Cojín gelatinoso o en forma de película. Al principio son esféricas y luego chatas, ensanchándose y presentando aspecto rugoso. El diámetro es de 2 a 5 $\mu\text{m}$  y el color es verde oliva sucio hasta amarillo pardo. Los filamentos están estrechamente entrelazados y las vainas se ven solamente en forma clara en la periferia del cojín y son amarillas pardas. Las células tienen forma de toneles cortos o cilíndricos de 3,5 a 4 $\mu\text{m}$  de ancho y unas pocas veces de 5 $\mu\text{m}$ . A veces casi el doble de largo que ancho. Los heterocistos son casi esféricos de 6 a 7 $\mu\text{m}$  de ancho. Las acinetas son oblongas, de 4 a 8 $\mu\text{m}$  de ancho y 8 a 12 $\mu\text{m}$  de largo, con envoltura amarilla lisa. Viven en tierra húmeda, entre musgo, rocas termales y son cosmopolitas.



## Bibliografía

- Bostock, R. M; Quatrano, R. S., 1992. Regulation of *Em* expression in rice. *Plant Physiol.* 98: 1356-1363.
- Boyer, J. S., 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Boese, Q. T.; Spano, A. J.; Li, J.; Timko, M., 1991. Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). *J. Biol. Chem.* (26): 17060-17086.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Burkart, A. 1969. Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina), parte II, Gramíneas. Colección científica Tomo VI, parte II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, pp. 37-39.
- Cano, M. S. de; Mulé, M. C. Z. de; Caire, G. Z. de, 1979. Efectos de los productos extracelulares de *Aphanethece stagnina* (Sprengel) A. Braun sobre el crecimiento de plántulas de arroz. *Int. J. Exp. Bot. (Φyton)* 37 (1): 15-20.
- Cano, M. S. de; Mulé, M. C. Z. de; Caire, G. Z. de; Palma, R. M.; Colombo, K., 1997. Aggregation of soil particles by *Nostoc muscorum* Ag. (Cyanobacteria). *Int. J. Exp. Bot. (Φyton)* 60 (1y2): 33-38.
- Caire, G. Z. de; Mulé, M. C. Z. de; Cano, M. S. de, 1979. Productos extracelulares de *Nostoc muscorum* Ag. (cepa 79a) obtenidos en medios con y sin nitrogeno combinado. I: sus efectos sobre plántulas de arroz. *Int. J. Exp. Bot. (Φyton)* 37 (1): 1-13.
- Dimitri, M.J., 1987. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Ed. Acme SACI. Bs. As. pp. 117.
- Divo de Sesar, M; Vilella, F.; Melito, V.; Kato, A.; Stella., A. M., 1999. Changes in porphyrins and chlorophylls during the development of hiperhydricity in micropaginated shoots of *Lupinus polyphyllus*. *Int. J. Exp. Bot. (Φyton)* 64: 111-117.
- Dunn, A; Arditti, J., 1968. Experimental Physiology. Holt, Rinehart and Winston, INC. Eds. pp. 265.
- García, A. B.; Engler, J. de A.; Iyer, S.; Gerats, T.; Montagu, M. V.; Caplan, A. B., 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl Stress in Rice. *Plant Physiol.* 115: 159-169.

- García, A. B.; Engler J. de A., Claes B.; Villarroel R.; Montagu, M. V.; Gerats, T.; Caplar, A., 1998. The expression of the salt-responsive gene *salT* from rice is regulated by hormonal and developmental cues. *Planta* 207: 172-180.
- Geitler, L., 1932. Cyanophyceae. Ed. Akademische Verlagsgesellschaft m.b. H. Leipzig. Alemania. pp.1-1196.
- Greenway, H.; Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
- Gupta, A. B.; Lata, K., 1964. Effect of algal growth hormones on the germination of paddy seeds. *Hydrobiologia* 24 (1-3): 430-434.
- Gupta, A. B., 1966. Algal flora its importance in the economy of rice fields. *Hydrobiologia* 28 (2) 213-222.
- Gupta, A. B.; Shukla, A. C., 1967. Studies on the nature of algal growth promoting substances and their influence on growth, yield and protein contents of rice plants. *Labdev J. Sci. Tech.* 5(2): 162-163.
- Gupta, A. B.; Shukla, A. C., 1969. Effect of algal extracts of *Phormidium* species on growth and development c rice seedlings. *Hydrobiologia* 34 (1): 77-84.
- Gupta, A. B.; Agarwal, P. R., 1973. Extraction, isolation and bioassay of a gibberellin – like substance from *Phormidium foveolarum*. *Ann. Bot.* 37 (152): 737-741.
- Halperin, D. R.; de Caire, G. Z.; de Mulé, M. C. Z.; De Cano M. S., 1979. Influencia de diferentes concentraciones de ClNa sobre la morfología y el contenido de nitrógeno de *Anabaena sphaerica* Bornet et Flahault aislada de las salinas grandes de Jujuy (Argentina). *Physis B* 38 (95): 21-28.
- Halperin, D. R.; De Cano M. S.; de Mulé, M. C. Z.; de Caire, G. Z., 1992. Diazotrophic cyanobacteria from Argentine paddy fields. *Int. J. Exp. Bot. (Phyton)* 53(2): 135-142.
- Huault, C.; Bruyant, P.; Balangé, P. A., 1984. Stimulation par la lumière rouge lointain de la synthèse de la δ-aminolévulinate deshydratase des cotylédons de radis. *Physiol. Plant* 61: 469-473.
- INASE. Instituto Nacional de Semillas. 1999. Ministerio de Economía y Obras y Servicios Públicos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Rep. Argentina. Claves para la inscripción de variedades de arroz. Variedades inscriptas. pp. 1-11.

- Kende, H.; Zeevaart, J. A. D., 1997. The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Lichtenthaler, H. K.; Wellburn, A. R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans* 11: 591-592.
- Liedgens, W; Lutz, C.; Schneider, H. A. W., 1983. Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*. *Eur. J. Biochem.* 175: 75-79.
- Lutts, S.; Kinet, J. M.; Bouharmont, J., 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* 78: 389-398.
- Maralihalli, G. B.; Bhagwat, A. S., 1985. Interaction of pyridoxal phosphate with the amino groups at the active site of 5-aminolevulinic acid dehydratase in maize. *Eur. J. Biochem.* 135: 75-79.
- Misra, A. N., Sahu, S. M.; Meera, I.; Mohapatra, P.; Das, N.; Misra, M., 1997. Root growth of a salt susceptible and a salt resistant rice (*Oryza sativa* L.) during seedling establishment under NaCl salinity. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 9-14.
- Moons, A.; Prinsen, E.; Bauw, G.; Montagu, M. V., 1997. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* 9: 2243-2259.
- Moore M. R.; Labbe R. F., 1964. A quantitative assay for urinary porphobilinogen. *Clin. Chem.* 10: 1105-1111.
- Mulé, M. C. Z. de; Caire, G. Z. de; Cano, M. S. de; Palma, R. M.; Colombo, K., 1999. Effect of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedlings and postharvest soil structure. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30 (1y2): 97-107.
- Paveto, C.; Passeron, S.; Stella, A. M.; Battle, A. M. del C., 1989. Regulatory role of  $\delta$ -aminolevulic acid dehydratase i the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B (4): 635-639.
- Quatrano, R.S.; Bartels, D.; Ho, T-H. D.; Pagés, M., 1997. New Insights into ABA-Mediated Processes. *Plant Cell* 9: 470-475.
- Ramani, S.; Apte, S. K., 1997. Transient Expression of multiple genes in salinity-stressed young of rice (*Oryza sativa* L.) Bura Rata. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 233: 663-667.
- Raychaudhuri, A.; Majumder, A. L., 1996. Salinity-induced enhancement of L-myo-inositol 1-phosphate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environ.* 19: 1437-1442.

- Roger, P. A.; Kulasooriya, S. A., 1980. Blue-green algae and rice. *Intern. Rice Res. Inst.*, Los Baños, Laguna, Filipinas. 112 pp.
- Sauter, M.; Kende, H., 1992. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368.
- Sauter, M.; Seagull, R. W.; Kende, H., 1993. Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. *Planta* 190: 354-362.
- Shukla, A. C.; Gupta, A. B., 1967. Influence of algal growth promoting substances on growth, yield and protein contents of rice plants. *Nature* (213): 744.
- Sings, H. L.; Rinehart, K. L., 1996. Compounds produced from potential tunicate-blue-green algal symbiosis: a review. *J. Ind. Microbiol.* 17: 385-396.
- Stafforini, D. M., Polo, C. F.; Stella, A. M.; Wider de Xifra, E.; Battle, A. M. del C., 1980. Pig liver aminolevulinate dehydratase II. Studies on different conditions influencing its molecular weight determination. *Int. J. Biochem.* 12: 757-760.
- Stella, A. M., 1977. Tesis. Estudios sobre la enzima  $\delta$ -aminolevúlico dehidrasa. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.*
- Venkataraman, G. S.; Neelakantan, S., 1967. Effects of the cellular constituents of the nitrogen fixing blue-green alga *Cylindrospermum muscicola* on the root of rice plant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 53-61.
- Vettakkorumakankav, N. N.; Falk, D.; Saxena, P.; Fletcher, R. A., 1999. A crucial role for gibberellins in stress protection of plants. *Plant Cell Physiol.* 40 (5): 542-548.
- White P.J., 1999. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends Plant Sci.* 4 (7): 245-246



