

ACCION DE EXTRACTOS ALGALES ACUOSOS Y ETEREOS DE *NOSTOC MUSCORUM* AG. (N° 79a)

I. EFECTO SOBRE PLANTULAS DE MIJO (*PANICUM MILIACEUM* L.) MEDIANTE TRATAMIENTO DE SUS SEMILLAS ¹

POR GLORIA Z. DE CAIRE ², M. CRISTINA Z. DE MULE ³, SUSANA DOALLO ³,
DELIA R. DE HALPERIN ⁴ Y LEONARDO HALPERIN ⁵

SUMMARY

Growth promoting substances were detected by the effect of algal mass aqueous and ether extracts of an axenic culture of *Nostoc muscorum* Ag. (79a) on seedlings of *Panicum miliaceum* L., by presoaking seed treatment.

At two days all aqueous and ether extracts accelerated significantly seed germination, being the ether extract at the lower concentration the most effective.

The height of millet plants as well as their dry weight were also increased by all the extracts in comparison with the control plants.

Different concentrations of dilute aqueous extracts were significantly efficient in the control of a "damping-off" attack.

INTRODUCCION

Las primeras referencias sobre el efecto fertilizante de las algas y su aplicación en la agricultura, nos han llegado por tradición de los países del norte de Europa y de Asia, donde se incorporaban al suelo los arribazones de diversas algas marinas, observándose una relación directa entre el monto de materia orgánica así agregado y la productividad de dichos suelos (Booth, 1966; Stephenson, 1968).

¹ Contribución Científica n° 137 del Centro de Investigación de Biología Marina (CIBIMA). Libertad 1235, Bs. Aires, Argentina.

Trabajo presentado en las "XV Jornadas Argentinas de Botánica y XI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal", realizadas en Buenos Aires del 25 al 28 de Abril de 1976.

² Licenciadas en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

^{3 y 5} Licenciada en Ciencias Agrarias e Ing. Agrónomo, Centro de Investigaciones de Recursos Naturales, Unidad Edafología Agrícola (INTA).

⁴ Investigador del CIBIMA. Miembro de la Carrera del Investigador, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la R. Argentina.

Respecto a las algas de ambientes continentales, desde los trabajos de Frank (1889) y de otros investigadores de fines del siglo pasado y comienzos del actual, se encaró la posibilidad de que algunas especies fuesen capaces de fijar el nitrógeno atmosférico similarmente a lo que ocurre con determinadas bacterias. Es solo a partir de la obtención de cultivos axénicos que pudo verificarse fehacientemente que de todos los grupos algales, solamente algunas especies de algas azules o *Cyanophyta* poseen esta propiedad (Drewes, 1928; Allison *et al.*, 1930-1937; Fritsch *et De*, 1938; De, 1939; Fogg, 1942; etc.). La comprobación de esta característica fisiológica confirió a dichas especies un papel significativo en la economía del nitrógeno en la naturaleza, ya que la conversión del nitrógeno molecular a la forma orgánica mediante organismos fotolito- trofos, representa la forma más directa de aprovechar la energía solar para incrementar el monto del nitrógeno disponible. Además, desde un punto de vista práctico, cabía la posibilidad de utilizarlas para incrementar la productividad de suelos y ambientes acuáticos (Allen, 1956).

En 1939, De fue el primero en sugerir que la fertilidad de los arrozales, tanto en la India como en otras regiones tropicales y subtropicales de Asia, donde las parcelas destinadas a este cultivo mantienen su rendimiento sin requerir el agregado de fertilizantes, podía explicarse por la presencia de algas azules fijadoras de nitrógeno molecular, a las que consideró responsables de la provisión de nitrógeno bajo la forma de nitratos, por mineralización. Una larga serie de trabajos posteriores confirmaron los resultados de De, entre ellos Watanabe y colaboradores (1951-1973); Singh (1961); Gupta (1966); etc. Actualmente en Japón, se preparan cultivos masivos de una cepa seleccionada por su alta capacidad de fijación, *Tolypothrix tenuis* (Watanabe, 1959 a; 1959 b), que se incorpora a los arrozales como abono verde, comprobándose un incremento de hasta un 20 % de los rendimientos a los 4 años de esta inoculación ambiental (Watanabe, 1956). En la India, los mejores resultados se obtuvieron con *Aulosira fertilissima* (Singh, 1961; Sundara Rao *et al.*, 1963).

Gupta (1966) al estudiar la flora algal de los arrozales de la India¹, señaló que las algas así como los demás vegetales, contienen sustancias promotoras del crecimiento de indudable efecto beneficioso en el desarrollo de este cultivo, independientemente de la posible capacidad de fijar nitrógeno molecular que puedan tener algunas especies. En ensayos preliminares con extractos algales de especies fijadoras (*Fischerella mucicola*, *Scytonema hofmanni* y *Nostoc* sp.), comprobó que los mismos aceleraban la germinación de las semillas de arroz, concluyendo entonces que el crecimiento algal puede resultar beneficioso no solo por la fijación de nitrógeno sino también por el aporte de sustancias con activi-

¹ Gupta como De (*l.c.*) consideran que las algas azules son las predominantes en los arrozales. Gupta encontró que de 58 especies identificadas, 47 corresponden a las cianofíceas.

dad biológica inductora. También Venkataraman et Neelakantan (1967) consideraron que en el caso de *Cylindrospermum muscicola*, su efecto promotor sobre el crecimiento de las raíces del arroz, se debe no solamente a su capacidad de fijación, sino a otros constituyentes biológicamente activos como vitaminas (B₁₂ en esta cepa), hormonas (auxinas) y diversos aminoácidos.

En esta línea de trabajo, Gupta et Lata (1964), Shukla et Gupta (1967) y Gupta et Shukla (1967; 1969) estudiaron precisamente el efecto de extractos algales acuosos y etéreos de especies no fijadoras abundantemente representadas en los arrozales como *Phormidium foveolarum*, *P. tenue* y otras del mismo género, sobre la germinación de semillas de arroz, crecimiento y desarrollo de las plantas, rendimiento de la cosecha y contenido proteico del grano, observando un efecto beneficioso según los extractos y concentraciones utilizadas.

Respecto a la naturaleza química de las sustancias promotoras involucradas, Gupta et Shukla (1967) las consideran probablemente incluidas en el grupo de las giberelinas. En un trabajo ulterior, Gupta et Agarwal (1973) aislaron de *P. foveolarum* una sustancia semejante a la giberelina, cuyo efecto ensayaron con semillas de arvejas, maíz y pepino, señalando además la presencia de otras sustancias inductoras.

En otros trabajos se estudió el efecto de extractos acuosos y etéreos de esta misma especie sobre otros cultivos, también mediante tratamiento de sus semillas: Gupta et Gupta (1970) en arvejas, Kushwaha et Gupta (1970) en maíz y en diversas variedades de trigo (1970) y Gupta et Kushwaha (1970) en *Triticum aestivum*. Otras especies como *Calothrix anomala* se ensayaron en otros cultivos: la masa algal y/o adicionada de urea se agregó directamente a cultivos de *Capsicum annum* y *Lactuca sativa*, resultando la aplicación combinada más efectiva que los tratamientos individuales (Dadhich, Varma et Venkataraman, 1969). Singh (1961: 127) obtuvo un incremento en el peso total de la caña de azúcar utilizando la masa algal desecada de *Microcystis aeruginosa* como abono verde.

Como único antecedente realizado en el país con extractos de masa algal de cianofíceas, se puede citar el de Mulé, Caire et Accorinti (*Phyton*, en prensa). En *Aphanothece stagnina* (Sprengel) A. Braun (cepa N° 40 e), estos autores encontraron productos activos inductores e inhibidores del crecimiento de una bacteria (*Staphylococcus aureus*).

En el presente trabajo se observó el efecto de extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* (N° 79'a), sobre plántulas de mijo mediante tratamiento de sus semillas. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: velocidad de germinación, altura de las plantas y peso seco de la parte aérea a los 39 días de la siembra. Como circunstancialmente sobreviniera un ataque de "damping-off", se observó el efecto inhibitorio de dichos extractos sobre la citada enfermedad.

Nuestro agradecimiento a la Srta. Delia Garrone Presedo por la confección del gráfico.

MATERIAL Y METODOS

A. *Cepa estudiada*: se utilizó una cepa de *Nostoc muscorum* Ag.¹ (Nº 79 a) aislada de arrozales de la Argentina (Entre Ríos, Concepción del Uruguay; leg. D. R. Halperin y R. Diéguez, 20-XII-1966; barro entre plantas, pH 6,7); obtenida en condición de cultivo uni-algal y posteriormente axénica mediante U. V. (Halperin, Mendoza y Caire, 1973). Se mantiene en el medio de Watanabe (1959) algo modificado según Halperin *et al.* (l. c.), en tubos de ensayo de 16 × 160 mm, a la temperatura del laboratorio y expuestos a la luz de tubos fluorescentes de 40 W durante unas 8 h diarias aproximadamente.

B. *Obtención del cultivo masivo*: 18 Erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 200 ml de medio nutritivo carente de nitrógeno (Watanabe, 1959-Halperin *et al.*, 1973) se inocularon al 10 % con un cultivo desarrollado en el mismo medio. Se mantuvieron durante 7 meses con 8 h diarias de agitación, expuestos a una intensidad luminosa de 3.802 lux.

El pH inicial del medio de cultivo utilizado fue de 6,5-6,7 siendo de 5,5 al finalizar el ensayo.

C. *Obtención de los extractos a partir de la masa algal*: la masa algal se separó del medio de cultivo por filtración con Buchner, obteniéndose 16,85 g de peso fresco.

1. *Extracto etéreo*: la masa algal obtenida se molió en un mortero con arena, previamente lavada con agua estéril y secada, con sucesivos agregados de éter libre de peróxidos (Werner, 1933). Se utilizaron 700 ml de éter que se redujeron finalmente a 225 ml. El extracto etéreo así obtenido se transfirió a agua destilada estéril en las siguientes proporciones:

X = original	$\frac{1}{2}$ X	$\frac{1}{4}$ X
60 ml extr. etéreo	30 ml extr. etéreo	15 ml extr. etéreo
80 ml H ₂ O dest. est.	80 ml H ₂ O dest. est.	80 ml H ₂ O dest. est.

Una vez evaporado el éter, quedaron 80 ml de cada fracción.

2. *Extracto acuoso*: con la masa algal restante después de la extracción etérea, se hicieron sucesivas extracciones con agua destilada estéril siguiendo la metodología indicada en 1. Se obtuvieron 64 ml, con los cuales se prepararon las siguientes diluciones:

X = original	$\frac{1}{2}$ X	$\frac{1}{10}$ X
40 ml extr. acuoso	20 ml extr. acuoso	4 ml extr. acuoso
	20 ml H ₂ O dest. est.	36 ml H ₂ O dest. est.

¹Identificada por D. R. Halperin el 21-VI-1976. Especie cosmopolita. Para su distribución en la Argentina ver Halperin (1976).

Quedaron finalmente 40 ml de cada fracción².

D. *Semillas*: se usaron semillas de *Panicum miliaceum* L. (mijo) obtenidas en el comercio. Se las seleccionó a fin de hacer un lote lo más sano y parejo posible en cuanto a tamaño y color, siendo del 100 % su poder germinativo.

E. *Suelo*: se utilizó suelo Brunizen proveniente de Castelar (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA), de pH 5,5-6,0; se secó al aire y luego se tamizó.

En 64 macetas de 200 cc de capacidad se colocaron 170 g de dicho suelo. Al comienzo de la experiencia se lo mantuvo a capacidad de campo (24 % de agua); luego, como se produjera un ataque de "damping-off" se disminuyó la humedad a un 17 %.

F. *Metodología*: se utilizaron 2 testigos, un seco y otro húmedo. En el primer caso se empleó la semilla tal cual; en el segundo se la remojó previamente en agua destilada estéril durante 27 horas. Para los demás tratamientos las semillas se sumergieron 27 h en 3 ml de los extractos etéreos y acuosos correspondientes. Luego, se sembraron 10 semillas por maceta; a los 14 días se dejaron solamente las 2 plantas más representativas.

Se realizaron 8 tratamientos con 8 repeticiones en cada caso, formándose al azar 8 bloques de 8 tratamientos cada uno, a fin de aplicar el método estadístico de bloques al azar.

Las macetas se colocaron bajo una pantalla (a 40-50 cm de altura) provista de 30 tubos fluorescentes de 40 W (14.000 lux), que permanecieron encendidos 12 h diarias, a una temperatura de 30° C aproximadamente.

Como a los 9 días de la siembra se produjo un ataque de "damping-off", se pulverizó con caldo bordelés.

La duración de la experiencia fue de 39 días, desde la siembra hasta que se segó (20-XI al 29-XII-1973).

RESULTADOS

Los datos correspondientes al efecto de los extractos algales sobre la germinación de las semillas y al número de plantas sanas a los 14 días se analizaron estadísticamente, no así los referentes a la altura de las plantas y al peso seco de la parte aérea, debido a las plantas eliminadas por el ataque ya mencionado y además, porque hacia el final de la experiencia, la constancia en la humedad del suelo no pudo mantenerse tan estricta como al comienzo. Con respecto a los dos primeros parámetros se trabajó con los recuentos directos, pues por ser casi todos

² Parte de los extractos acuosos y etéreos así obtenidos se utilizaron en un ensayo con *Cunninghamella blakesleana* (-), cuyos resultados se consignan en otro trabajo.

ellos superiores a 50, no se consideró necesario hacer transformación alguna de los datos.

A. *Efecto de los extractos algales sobre la germinación de las semillas.*

El tiempo de inmersión empleado (27 horas) prácticamente concuerda con el utilizado por Gupta y colaboradores (24 h), ya que según Gupta et Lata (1964) una inmersión prolongada (48 h) reduce el porcentaje de germinación. En el cuadro que sigue se indica el número de semillas germinadas a los 2, 3 y 5 días, sobre 80 sembradas por cada tratamiento:

Tratamiento:	N° de semillas germinadas sobre 80 sembradas		
	2 días	3 días	5 días
Ax	54	55	57
A $\frac{1}{2}$ x	54	68	71
A $\frac{1}{10}$ x	66	69	73
Ex	61	64	70
E $\frac{1}{2}$ x	63	66	71
E $\frac{1}{4}$ x	70	69	70
T seco	46	52	53
T húmedo	11	66	67

A los 2 días, todos los extractos utilizados y el testigo seco dieron resultados significativos con respecto al testigo húmedo según el test de Tuckey $\Delta_{0,05} = 25,7$; no así a los 3 y 5 días ($\Delta_{0,05} = 22,1$ y $\Delta_{0,05} = 22,0$ respectivamente).

Análisis de la variancia correspondiente a los 2 días:

<u>Fuentes de variación</u>	<u>Suma de cuadrados.</u>	<u>Grados de libertad.</u>	<u>Cuadrados medios.</u>	<u>F</u>
Repeticiones	54,35	7	7,76	1,42
Tratamientos	304,61	7	43,52	7,97
Error	267,77	49	5,46	
Sub-total	626,73	63		
Corrección	2822,27	1		
Total	3449,00	64		

Promedios: 6,64

Desviación standard: 2,34

Coefficiente de variabilidad(%): 35,24

El gráfico representa el efecto de los tratamientos con extractos algales acuosos y etéreos de *Nostoc muscorum* sobre la germinación de las semillas de mijo, en función del tiempo.

B. Número de plantas sanas a los 14 días de iniciado el ensayo:

Tratamiento:	Plantas sanas:	Diferencia respecto a T húmedo en %
Ax	53	+23
$A\frac{1}{2}x$	63	+46
$A\frac{1}{10}x$	62	+44
Ex	55	+28
$E\frac{1}{2}x$	54	+26
$E\frac{1}{4}x$	51	+19
T seco	41	-5
T húmedo	43	-

Se obtuvieron resultados significativos según el test de Tuckey $\Delta_{0,05} = 19,2$ con el extracto acuoso $A\frac{1}{2}x$ con respecto al T húmedo y con el mismo extracto y el $A\frac{1}{10}x$ con respecto al T seco.

Análisis de la variancia:

Fuentes de variación	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F.
Repeticiones	17,44	7	2,49	
Tratamientos	54,19	7	7,74	2,53
Error	149,81	49	3,06	
Sub-total	221,44	63		
Corrección	2782,56	1		
Total	3004,00	64		

Promedios: 6,59

Desviación standard: 1,75

Coefficiente de variabilidad(%): 26,55

C. *Altura de las plantas a los 28 y 39 días:*

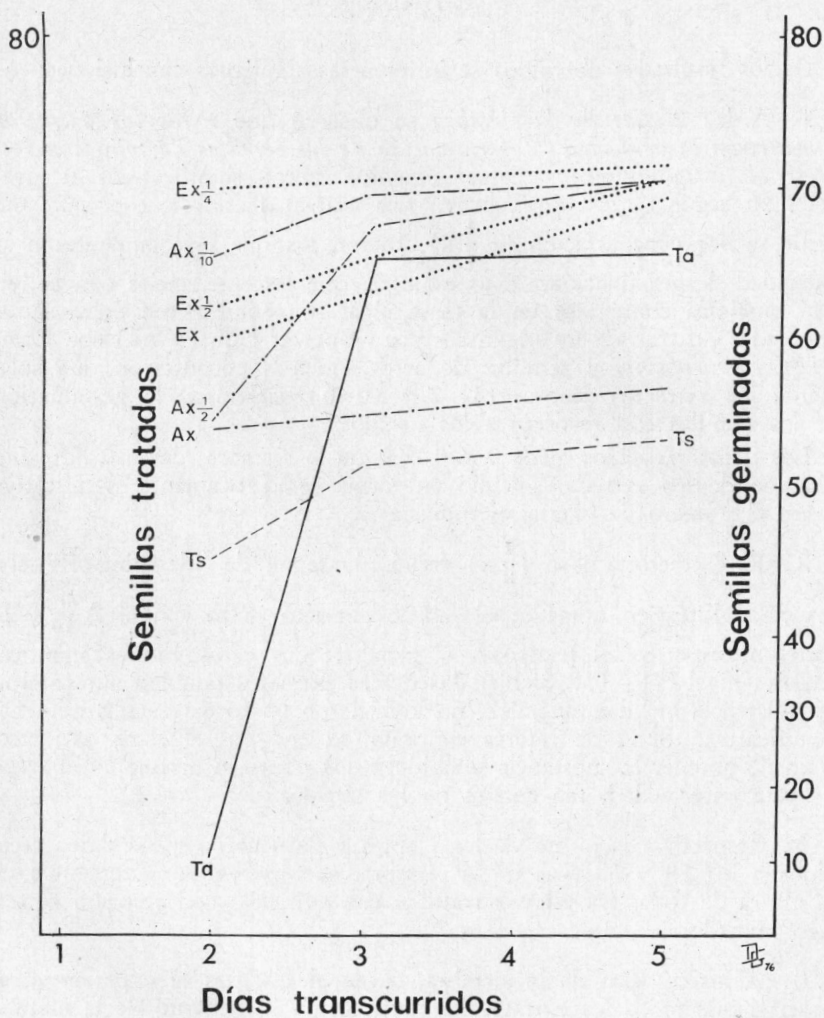
Tratamiento	Altura en cm		Diferencia respecto al T húmedo en %		Cv % de las repeticiones	
	28 días	39 días	28 días	39 días	28 días	39 días
Ax	13,8	23,5	+16,9	+ 8,8	7,6	4,4
A $\frac{1}{2}$ x	12,9	23,6	+ 9,5	+ 9,3	16,1	10,9
A $\frac{1}{10}$ x	12,2	24,4	+ 3,4	+13,0	7,0	4,9
Ex	11,8	22,4	0,0	+ 3,7	12,5	12,5
E $\frac{1}{2}$ x	13,7	24,5	+16,1	+13,4	14,2	6,5
E $\frac{1}{4}$ x	12,6	22,9	+ 6,8	+ 6,0	9,2	4,0
T seco	13,4	23,8	+13,6	+10,2	17,8	8,5
T húm.	11,8	21,6	-	-	3,1	10,3

Como se observa en el cuadro anterior, todos los extractos determinaron incrementos en la altura de las plantas con respecto al T húmedo.

D. *Materia seca de la parte aérea a los 39 días:*

Tratamiento	Peso en g.	Diferencia respecto T húm. %
Ax	0,038	+22,6
A $\frac{1}{2}$ x	0,037	+19,4
A $\frac{1}{10}$ x	0,036	+16,1
Ex	0,035	+12,9
E $\frac{1}{2}$ x	0,034	+ 9,7
E $\frac{1}{4}$ x	0,036	+16,1
T seco	0,037	+19,4
T húmedo	0,031	-

Como puede observarse, todos los extractos determinaron un incremento de la materia seca con respecto al T húmedo, correspondiendo el más elevado al extracto acuoso sin diluir (Ax: 22,6 %).



Efecto de los extractos algales acuosos y etéreos sobre la germinación de las semillas de mijo. *Referencias:* Ta, testigo semillas sumergidas en agua; Ts, testigo semillas sin sumergir; Ax, Ax $\frac{1}{2}$ y Ax $\frac{1}{10}$: extractos acuosos; Ex, Ex $\frac{1}{2}$ y Ex $\frac{1}{4}$: extractos etéreos.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se infieren las siguientes conclusiones:

1. A los 2 días de la siembra se observó que *todos los extractos aumentaron la velocidad de germinación de las semillas de mijo con respecto al testigo húmedo*. Estos aumentos fueron significativos al nivel del 5 % según el test de Tuckey. Los extractos etéreos, especialmente el de menor concentración ($E \frac{1}{4} x$), fueron los que más aumentaron la velocidad de germinación. Esto indicaría que las substancias con actividad biológica contenidas en la masa algal son solubles en éter. Estos resultados difieren de los obtenidos por Gupta et Lata (1964) con *Phormidium foveolarum* y semillas de arroz, quienes encontraron que solamente los extractos acuosos (1; 2 y 10 %) aceleraron la germinación de las semillas con respecto a los testigos.

Los datos recogidos a los 3 y 5 días de la siembra, demostraron que ninguno de los extractos incidió en forma estadísticamente significativa sobre el número de plantas germinadas.

2. El extracto acuoso ($\frac{1}{2} x$) frenó el ataque de "damping-off" con respecto al testigo húmedo; el mismo extracto junto con el $A \frac{1}{10} x$ lo hicieron respecto del testigo seco, siendo todos estos valores significativos al nivel del 5 %. Si bien los demás extractos también aumentaron la resistencia al "damping-off", no lo hicieron en forma estadísticamente significativa. Sería de interés continuar el estudio de estos extractos, a fin de obtener la substancia inhibidora que podría utilizarse en el freno de esta enfermedad, tan común en los almácigos.

3. Respecto a la altura de las plantas y de acuerdo a los datos recogidos a los 28 y 39 días de la siembra, se observaron incrementos en la altura de todas las plantas tratadas con extractos con respecto al testigo húmedo.

4. A los 39 días de la siembra, o sea al finalizar la experiencia, se observó que todos los extractos produjeron un incremento de la materia seca con respecto al testigo húmedo. El mayor aumento (22,6 %) correspondió al extracto acuoso sin diluir (Ax). Estos resultados concuerdan con los de Shukla et Gupta (1967), quienes con *P. foveolarum* y en arroz obtuvieron el mayor incremento con el extracto acuoso más concentrado (5 %).

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, M. B., 1956. Photosynthetic nitrogen fixation by blue-green algae. *Sci. Month.* 83 (2): 100-106.
- ALLISON, F. E. and MORRIS, H. J., 1930. Nitrogen fixation by blue-green algae. *Science* 71 (1834): 221-223.
- 1932. Nitrogen fixation by soil algae. *Proc. 2nd. Int. Congr. Soil Sci.* 3: 24-28.
- ALLISON, F. E. and HOOVER, S. R., 1935. Conditions which favour nitrogen fixation by a blue-green alga. *Trans. 3rd. Int. Congr. Soil Sci.* 1: 145-147.
- ALLISON, F. E., HOOVER, S. R. and MORRIS, H. J., 1937. Physiological studies with the nitrogen fixing alga *Nostoc muscorum*. *Bot. Gaz.* 98: 433-463.
- BOOTH, E., 1966. Some properties of seaweed manures. *Int. Seaw. Symp. Proc.* 5: 349-357.
- DADHICH, K. S.; VARMA, A. K. and VENKATARAMÁN, G. S., 1969. The effect of *Calothrix* inoculation on vegetable crops. *Plant & Soil* 31 (2): 377-379.
- DE, P. K., 1939. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 127 (846): 121-139.
- DREWES, K., 1928. Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch Blau-algen. *Zentralbl. Bakt. Parasit., Abt. 2* 75: 88-101.
- FOGG, G. E., 1942. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I-Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *J. Exp. Biol.* 19 (1): 79-87.
- FRANK, B., 1889. Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoff durch erdbodenbewohnende Algen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 7: 34-42.
- FRITSCH, F. E. and DE, P. K., 1938. Nitrogen fixation by blue-green algae. *Nature* 142 (3602): 878.
- GUPTA, A. B., 1966. Alga flora and its importance in the economy of rice fields. *Hydrobiologia* 28 (2): 213-222.
- GUPTA, A. B. and AGARWAL, P. R., 1973. Extraction, isolation and bioassay of a gibberellin-like substance from *Phormidium foveolarum*. *Ann. Bot.* 37: 737-741.
- GUPTA, A. B. and GUPTA, K. K., 1970. The effect of *Phormidium foveolarum* extract on growth and development of pea seedlings. *Labdev J. Sci. and Technol., Kanpur (India)* 8B (3): 151-154.
- GUPTA, A. B. and KUSHWAHA, A. S., 1970. Studies on the effect of *Phormidium foveolarum* extract on the growth and yield of *Triticum aestivum*. I-The effect of presoaking seeds in ether and water extracts of *P. foveolarum* in pot cultures. *Labdev J. Sci. and Technol., Kanpur (India)* 8B (2): 105-107.
- GUPTA, A. B. and LATA, K., 1964. Effect of algal growth hormones on the germination of paddy seeds. *Hydrobiologia* 24 (1-3): 430-434.
- GUPTA, A. B. and 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. and Technol, Kanpur (India)* 5 (2): 162-163.
- 1969. Effect of algal extracts of *Phormidium* species on growth and development of rice seedlings. *Hydrobiologia* 34 (1): 77-84.
- HALPERIN, D. R. de, 1976. Cianofíceas de biódermas algales provenientes de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). *Physis Ser. C* 35 (90): 1-16/Contrib. Cient. CIBIMA, Bs. Aires (124).
- HALPERIN, D. R. de; MENDOZA, M. L. y CAIRE, G. Z. de, 1973. Obtención de cultivos axénicos de algas azules (*Cyanophyta*). *Physis Sec. B* 32 (84): 67-84/Contrib. Cient. CIBIMA, Bs. Aires (65).
- KUSHWAHA, A. S. and GUPTA, A. B., 1970. Effect of pretreating the seeds with extracts of *Phormidium foveolarum* on growth and development of maize seedlings. *Hydrobiologia* 35 (2): 203-208.

- 1970. Effect of algal growth promoting substances of *Phormidium foveolarum* on seedlings of some varieties of wheat. *Hydrobiologia* 35 (2): 324-332.
- MULÉ, M. C. Z. de; CAIRE, G. Z. de and ACCORINTI, J. Inductores e inhibidores intra y extracelulares en cultivos axénicos de *Aphanothece stagnina* (*Cyanophyta*). *Phyton* (en prensa).
- SHUKLA, A. C. and GUPTA, A. B., 1967. Influence of algal growth promoting substances on growth, yield and protein content of rice plants. *Nature* 213: 744.
- SINGH, R. N., 1961. Role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian agriculture. *Ind. Counc. Agric. Res. New Delhi* 175 p.
- STEPHENSON, W. A., 1968. Seaweed in agriculture and horticulture. London. Faber & Faber. 231 p.
- SUNDARA RAO, W. V. B.; GOYAL, S. K. and VENKATARAMÁN, G. S., 1963. Effect of inoculation of *Aulosira fertilissima* on rice plants. *Curr. Sci.* 32: 366-367.
- VENKATARAMAN, G. S. and NEELAKANTÁN, S., 1967. Effect of the cellular constituents of the nitrogen fixing blue-green alga *Cylindrospermum muscicola* on the root growth of rice plants. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 53-61.
- WATANABE, A., 1951. Production in cultural solution of some amino-acids by the atmospheric nitrogen fixing blue-green algae. *Arch. Biochem. Biophys.* 34 (1): 50-55.
- 1956. On the effect of the atmospheric nitrogen fixing blue-green algae on the yield of rice. *Bot. Mag. (Tokyo)* 69 (820/821): 530-536.
- 1959. Distribution of nitrogen fixing blue-green algae in various areas of south and east Asia. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5 (1-2): 21-29.
- 1959a. On the mass-culturing of a nitrogen fixing blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5 (1/2): 85-91.
- 1959b. Some devices for preserving blue-green algae in viable state. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5 (3): 153-157.
- 1960. Collection and cultivation of nitrogen fixing blue-green algae and their effect on the growth and crop yield of rice plants. *Proc. Symp. Algol. Ind. Counc. Agric. Res. and Unesco (New Delhi)*, 1959. p. 162-166.
- 1962. Effect of nitrogen fixing blue-green alga *Tolypothrix tenuis* on the nitrogenous fertility of paddy soil and on the crop yield of rice plants. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 8 (2): 85-91.
- 1973. On the inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen fixing blue-green algae. *Soil Biol. Biochem.* 5: 161-162.
- WATANABE, A.; HATTORI, A.; FUJITA, Y. and KIYOHARÁ, T., 1959. Large scale culture of a blue-green alga *Tolypothrix tenuis*, utilizing hot spring and natural gas as a heat and carbon dioxide sources. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5 (1/2): 51-57.
- WATANABE, A.; NISHIGAKI, S. and KONISHI, C., 1951. Effect of nitrogen fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature* 168 (4278): 748-749.
- WERNER, E. A., 1933. A simple and rapid procedure for the purification of ether and acetone. *Analyst* 58: 335-337.