

Metadatos del Trabajo Final de Doctorado

Título completo: *Estudio de la combinación de Azospirillum argentinense Az39 y zinc para incrementar la calidad nutricional y la producción de maíz (Zea mays L.)*

Autor: Martin, Soledad Marianel. Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas- Universidad Nacional de Río Cuarto (INIAB-UNRC)

Palabras clave: *Azospirillum argentinense Az39 / zinc / maíz / biofertilización / calidad nutricional / rendimiento*

Resumen en español: La deficiencia de micronutrientes, particularmente de zinc (Zn), constituye un problema de alcance global que limita el crecimiento de los cultivos y reduce su calidad nutricional, contribuyendo al “hambre oculta” en poblaciones cuya dieta se basa en cereales. En este contexto, la integración de la fertilización con Zn y el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal surge como una alternativa para potenciar la productividad y la sustentabilidad agrícola. El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo clave a nivel mundial y nacional por su aporte a la seguridad alimentaria y a sistemas productivos. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la aplicación combinada de *Azospirillum argentinense* Az39 y fuentes de Zn sobre la germinación, el crecimiento, el rendimiento y la calidad nutricional del grano. La investigación se desarrolló mediante un enfoque multiescala que incluyó ensayos in vitro, en laboratorio, en condiciones controladas y a campo en sistemas de secano con suelos deficientes en Zn. La cepa Az39 mostró compatibilidad en un rango de 0,02 a 0,4 g L⁻¹ Zn, alcanzando recuentos del orden de 10⁷ UFC mL⁻¹ con ZnO y 10⁸ UFC mL⁻¹ con ZnSO₄, con reducciones conforme aumentaron las concentraciones, lo que evidenció un umbral de tolerancia dependiente de la fuente y dosis. La aplicación conjunta de Az39 y Zn aceleró la germinación, destacándose ZnSO₄ + Az39 con valores superiores al 70 % a las 48 h. En el estadio V3 del maíz, esta combinación promovió un incremento del 20-25 % en el peso seco de la parte aérea y aumentos en los distintos pigmentos fotosintéticos, entre 70% a superiores al 100% respecto al control. Además, los tratamientos ZnSO₄ + Az39 y ZnO + Az39 incrementaron el peso seco radical en 40-45 %, y la combinación ZnO + Az39 aumentó la longitud de la raíz primaria en 35-40 %, evidenciando efectos sinérgicos. A campo, las respuestas productivas estuvieron condicionadas por la disponibilidad hídrica. En campañas con restricción hídrica durante el período crítico del cultivo no se observaron diferencias entre los tratamientos. Mientras que, con menor restricción, los tratamientos integrados alcanzaron rendimientos de 11.200 kg ha⁻¹, significativamente superiores al control de 7.700 kg ha⁻¹. El contenido de Zn en grano se mantuvo estable incluso con incrementos de rendimiento superiores al 40-50 %. Así, la co-aplicación de Az39 y Zn se posiciona como una estrategia agronómica promisoría para incrementar la productividad y la calidad nutricional del maíz, contribuyendo al desarrollo de sistemas agrícolas más eficientes y sustentables.



Resumen en inglés: Micronutrient deficiency, particularly zinc (Zn), is a global problem that limits crop growth and reduces their nutritional quality, contributing to “hidden hunger” in populations whose diets are primarily based on cereals. In this context, the integration of Zn fertilization and the use of plant growth-promoting microorganisms emerges as a promising strategy to enhance agricultural productivity and sustainability. Maize (*Zea mays* L.) is a key crop at both global and national levels due to its contribution to food security and production systems. The objective of this thesis was to evaluate the effect of the combined application of *Azospirillum argentinense* Az39 and Zn sources on germination, growth, yield, and grain nutritional quality. The study was conducted using a multiscale approach that included in vitro assays, laboratory experiments, controlled-environment studies, and field trials under rainfed conditions in Zn-deficient soils. The Az39 strain showed compatibility within a range of 0.02 to 0.4 g L⁻¹ Zn, reaching population levels on the order of 10⁷ CFU mL⁻¹ with ZnO and 10⁸ CFU mL⁻¹ with ZnSO₄, with reductions observed as concentrations increased, indicating a tolerance threshold dependent on Zn source and dose. The combined application of Az39 and Zn accelerated germination, with ZnSO₄ + Az39 showing the highest values, exceeding 70% at 48 hours. At the V3 growth stage of maize, this combination promoted a 20-25% increase in shoot dry weight and increases in photosynthetic pigments ranging from 70% to over 100% compared to the control. Additionally, the ZnSO₄ + Az39 and ZnO + Az39 treatments increased root dry weight by 40-45%, while the ZnO + Az39 combination enhanced primary root length by 35-40%, indicating synergistic effects. Under field conditions, yield responses were influenced by water availability. In seasons with water limitation during the critical growth period, no significant differences were observed among treatments. However, under more favorable conditions, integrated treatments achieved yields of 11,200 kg ha⁻¹, significantly higher than the control (7,700 kg ha⁻¹). Grain Zn concentration remained stable even when yield increased by more than 40-50%. Thus, the co-application of Az39 and Zn represents a promising agronomic strategy to increase maize productivity and nutritional quality of corn, contributing to the development of more efficient and sustainable agricultural systems.

Evaluable por pares: SI

Fecha: 17/04/2026

Formato: PDF

Idioma: Español

Financiamiento: UNRC, CONICET

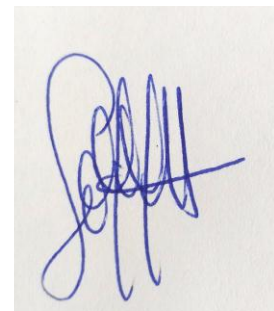
Condiciones de uso: CC BY-NC-SA

Plazo solicitado de embargo (si corresponde):meses (máximo 24 meses)

A modo de recordatorio y según consta en Régimen de Carreras de Posgrado se transcribe la leyenda que debe aparecer **OBLIGATORIAMENTE** en el/la TF/TFI/Tesis:

“Informo que, de acuerdo a lo que prescribe **la Ley N° 26.899(*)** (2013), su Reglamento Operativo (Resolución 753-E/2016) y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Resolución del Consejo Superior No 202/2021), **este documento es resultado del financiamiento total o parcial otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899 y la Política Institucional de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Río Cuarto**”.

() La Ley No 26.899 define por financiamiento total o parcial con fondos públicos, a la inversión que el Estado realiza ya sea de forma directa, (como el pago de salarios, incentivos, subsidios, etc.), o indirecta (el acceso a bibliografía científica adquirida con fondos públicos, la utilización de la infraestructura de las instituciones y organismos, el uso de insumos y equipamientos, el financiamiento total o parcial de viajes, etc.) para el desarrollo de la actividad científica, tecnológica y de innovación.*



Soledad Marianel Martin

Firma y aclaración del autor del TF/TFI/Tesis



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la combinación de
Azospirillum argentinense Az39 y
zinc para incrementar la calidad
nutricional y la producción de maíz
(*Zea mays* L.)**

Mic. Soledad Marianel Martin

Dra. Claudia Noemí Travaglia

Dra. Tania Taurian



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FCO-
QCAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de

Doctora en Ciencias Biológicas

Estudio de la combinación de
Azospirillum argentinense Az39 y zinc para
incrementar la calidad nutricional y la producción
de maíz (*Zea mays* L.)

Mic. Soledad Marianel Martin

DIRECTORA: Dra. Claudia Noemí Travaglia

CODIRECTORA: Dra. Tania Taurian

Río Cuarto- Abril 2026

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dra. Faggioli Valeria Soledad
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
(INTA- Marcos Juárez)

Dra. Gonzalez Paola Solange
Instituto de Biotecnología Ambiental y Salud - Universidad Nacional de Río Cuarto
(INBIAS - UNRC)

Dr. Balboa Guillermo Raúl
Departamento de Agronomía y Horticultura
Universidad de Nebraska-Lincoln

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto, 17 de abril de 2026

*Que todo lo que construyamos encuentre su
sentido en aportar algo bueno a la vida de los demás...*

A mi familia, mi sostén...

Agradecimientos

A Dios, por la vida, por acompañarme en este camino y por haberme permitido llegar hasta acá.

A mi mamá y mis hermanos, por ser mi motor, por impulsarme siempre, por estar en cada momento y por enseñarme a no bajar los brazos. Y a mis sobrinos, que llegaron para llenarnos de alegría y ternura.

A mis directoras, por su dedicación, por orientarme y por enseñarme mucho más que contenidos, desde su forma de trabajar, de pensar y de sostener este proceso.

A mis amigas de la oficina, por haber hecho estos años mucho más lindos. Por las risas, las charlas interminables y por estar siempre, en lo académico y en la vida.

A mis amigos de la vida, por su presencia incondicional y por enseñarme, con su amistad, el valor de estar y de ser cada día una mejor amiga.

A Negrín, Cindy, Atila, Toby, Niní, Negro, Milo, Iris y todos los michinos, por el amor incondicional, por la compañía silenciosa y por ser refugio en tantos momentos.

A quienes forman parte del Departamento de Ciencias Naturales y del INIAB, por la cercanía, la calidez y el acompañamiento cotidiano.

A la cátedra de Cereales, en especial a Gabriel, Ceci y Walter, y a todos los que forman y formaron parte, por su gran aporte a este trabajo y por enriquecer mi aprendizaje.

A mis jurados, por haber aceptado ser parte de este proceso desde sus inicios y por sus aportes, sugerencias y acompañamiento, que fueron fundamentales para mi formación.

A la UNRC y al CONICET, por hacer posible esta tesis.

Y a este recorrido, que me enseñó a insistir, a confiar y a disfrutar cada etapa. Porque a los sueños hay que darles pico y pala, con amor y paciencia... hasta que un día les salen alas y empiezan a volar.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1:.....	1
Introducción General	1
1. Antecedentes	2
1.1 Importancia del cultivo de maíz en Argentina.....	2
1.2 Desarrollo vegetativo y reproductivo del maíz.....	3
1.3 Déficit de Zinc en los suelos agrícolas.....	5
1.4 Importancia del zinc en la nutrición vegetal y humana.....	7
1.5 Manejo del zinc en los cultivos de maíz	9
.....	11
2. Hipótesis y Objetivos.....	17
2.1 Hipótesis	17
2.2 Objetivo general.....	17
2.3 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 2:.....	19
<i>Azospirillum</i> frente a los compuestos de zinc: evaluación <i>in vitro</i> de la cepa Az39.....	19
1. Antecedentes	20
2. Objetivo específico	22
3. Metodología	22
3.1 Determinación de supervivencia bacteriana frente a los compuestos con Zn	22
3.2 Determinación de la capacidad de solubilización de compuestos de Zn	26
3.3 Análisis estadístico.....	27
4. Resultados y Discusión	28
4.1 Capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de Zn.....	28
4.2 Capacidad de solubilización de compuestos de Zn.....	33
5. Conclusiones	35
.....	37
CAPÍTULO 3:.....	37
Evaluación de la germinación y el crecimiento de maíz en la interacción con <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 y Zn	37
1. Antecedentes	38

2. Objetivos específicos	39
3. Metodología	39
3.1 Material vegetal	39
3.4 Supervivencia de la cepa <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 en semillas de maíz	42
3.5 Respuesta germinativa y crecimiento inicial de plántulas semillas de maíz inoculadas con <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 y tratadas con Zn	43
3.6 Análisis Estadístico	48
4. Resultados y Discusión	49
4.1 Supervivencia de la cepa <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 en semillas	49
4.2 Respuesta germinativa y crecimiento inicial de plántulas de maíz inoculadas con <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 y tratadas con Zn	50
4.3 Determinación del crecimiento temprano en plantas de maíz a partir de semillas tratadas con Zn y <i>A. argentinense</i> Az39	55
5. Conclusiones	66
CAPÍTULO 4:	68
Maíz, <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 y Zn bajo condiciones reales de cultivo: impacto agronómico y nutricional.....	68
1. Antecedentes	69
2. Objetivo específico	70
3. Metodología	70
3.1 Descripción del sitio, diseño y manejo experimental	70
3.2 Post-siembra	77
3.3 Estadío vegetativo V13	77
3.4 Madurez de cosecha	78
3.5 Análisis estadísticos	79
4. Resultados y Discusión	80
4.1 Respuesta productiva del maíz a lo largo de las campañas agrícolas	80
4.2 Asociación entre variables productivas y morfofisiológicas en las distintas campañas agrícolas	87
4.3 Efecto de los tratamientos sobre la concentración de zinc en el grano de maíz	96
4.4 Integración de procesos morfofisiológicos, nutricionales y su interacción con el ambiente en la determinación del rendimiento del cultivo	99
5. Conclusiones	102
CAPÍTULO 5:	103
Conclusiones finales.....	103
CAPÍTULO 6:	106

Bibliografia.....	106
-------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

1		
2		
3	Figura 1 Principales provincias productoras del país. (Campaña 2023/24) SAGYP, 2025.....	3
4	Figura 2 Morfología general de la planta de maíz.	4
5	Figura 3 Etapas fenológicas del cultivo de maíz desde la siembra hasta la madurez fisiológica	
6	según la escala propuesta por Ritchie y Hanway (1982).	5
7	Figura 4 Distribución espacial de la disponibilidad de Zn en suelos de la región pampeana	
8	argentina en distintos momentos históricos: condición prístina, 2011, 2018 y 2024.	7
9	Figura 5 Síntomas de deficiencia de Zn en plantas, incluyendo clorosis internerval en las	
10	hojas, deformación foliar y enanismo. Fuente Espósito <i>et al.</i> (2021).....	8
11	Figura 6 Representación de los mecanismos directos e indirectos de las PGPR en la promoción	
12	del crecimiento vegetal y el control de fitopatógenos.....	13
13	Figura 7 Imagen de microscopía electrónica de barrido de <i>Azospirillum argentinense</i> Az39..	16
14	Figura 8 Esquema experimental de los tratamientos evaluados para la determinación de la	
15	supervivencia de <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 frente a los compuestos de Zn.....	26
16	Figura 9 Esquema experimental de la metodología empleada para la determinación de la	
17	capacidad de <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 para solubilizar óxido de Zn.	27
18	Figura 10 Placa de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC mL ⁻¹) de la cepa	
19	Az39 cultivada en medio Nfb- Rojo Congo.	28
20	Figura 11 Crecimiento de Az39 en medio líquido MM suplementado con óxido de Zn (a) y	
21	sulfato de Zn (b) a distintas concentraciones.	30
22	Figura 12 Esquema general del diseño experimental empleado para desinfección de semillas y	
23	aplicación de los diferentes tratamientos.	41
24	Figura 13 Esquema general del diseño experimental empleado para determinar la	
25	supervivencia de Az39 en las semillas.	43
26	Figura 14 Metodología de germinación en papel según las Reglas Internacionales para el	
27	Análisis de Semillas (ISTA, 2019), aplicada a semillas de maíz sometidas a los distintos	
28	tratamientos experimentales..	44
29	Figura 15 Esquema general del diseño experimental empleado para evaluar el efecto de la	
30	inoculación con <i>Azospirillum argentinense</i> Az39 y la fertilización con Zn en el crecimiento	
31	temprano de plantas de maíz (21 días posteriores a la siembra).	46
32	Figura 16 a) Porcentaje de germinación (%) de semillas de maíz a las 24, 48, 72 y 168h.. b)	

33	Germinación acumulada (%) ajustada en función del tiempo de incubación (h) para los	
34	distintos tratamientos.	51
35	Figura 17 Longitud de raíz primaria y de b) coleóptilo de plántulas de maíz post168h de	
36	incubación.....	52
37	Figura 18 Altura de las plantas (cm) a los 7 (a), 14 (b) y 21 (c) días después de la siembra	
38	(DDS).....	56
39	Figura 19 Área foliar (cm ²) de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los valores	
40	corresponden a las medias $\pm$ SEM.	58
41	Figura 20 Peso seco (g) de parte aérea de plantas de maíz de 21 días de incubación post	
42	siembra..	59
43	Figura 21 Contenido de los pigmentos fotosintéticos foliares (μ g g ⁻¹ muestra): clorofila a (a),	
44	clorofila b (b) y carotenos (c) de plantas de maíz de 21 días post siembra.....	60
45	Figura 22 Peso seco (g) de parte radical de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los	
46	valores corresponden a las medias $\pm$ SEM.....	61
47	Figura 23 Longitud (cm) de raíz primaria de plantas de maíz de 21 días post siembra..	61
48	Figura 24 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2020-2021.....	89
49	Figura 25 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses de septiembre de 2020 a abril de 2021	
50	en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina..	90
51	Figura 26 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2021-2022.....	92
52	Figura 27 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses de septiembre de 2021 a abril de 2022	
53	en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina..	93
54	Figura 28 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2023-2024.....	95
55	Figura 29 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses desde septiembre de 2023 a abril de	
56	2024 en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina.	96
57	Figura 30 Rendimiento (kg ha ⁻¹) y concentración de Zn en grano (mg kg ⁻¹) en los distintos	
58	tratamientos durante la campaña 2023-24.	98

59

60

61

62

63

ÍNDICE DE TABLAS

64		
65	Tabla 1 Composición de Medio líquido LB (1 L) (Bertani, 1951).....	23
66	Tabla 2 Composición de medio mínimo (1L)	24
67	Tabla 3 Tratamientos evaluados en el ensayo in vitro para el análisis de la respuesta de	
68	<i>Azospirillum argentinense</i> Az39 a distintas fuentes y dosis de Zn.	24
69	Tabla 4 Composición medio sólido Nfb-Rojo Congo (1 L).....	25
70	Tabla 5 Parámetros del análisis de varianza (ANOVA) para las variables de crecimiento	
71	temprano y contenido de pigmentos fotosintéticos foliares en plantas de maíz (21DDS)	57
72	Tabla 6 Fecha y densidad de siembra (semillas ha ⁻¹), pH, Materia orgánica (MO, g kg ⁻¹), pH y	
73	contenido (mg kg ⁻¹) de nutrientes disponibles en el Suelo a una profundidad de 0-20 cm, fecha	
74	y densidad de siembra por Campaña Agrícola.	71
75	Tabla 7 Grado, cantidad y momento de aplicación de los fertilizantes utilizados en los ensayos	
76		73
77	Tabla 8 Balance de fósforo y recomendación de fertilización con FDA y MESZ	73
78	Tabla 9 Recomendación del modelo de Interacción Nitrógeno por Densidad de Siembra.	74
79	Tabla 10 Tratamientos experimentales aplicados en cada campaña agrícola (2020-2024).	76
80	Tabla 11 Resultados inferenciales del modelo lineal mixto (REML) para el rendimiento de	
81	maíz: efectos de Tratamiento, Año y su interacción.....	81
82	Tabla 12 Rendimiento promedio ajustado por Tratamiento y Año de campaña (kg ha ⁻¹ a 13%	
83	de humedad).	85
84		
85		
86		
87		
88		
89		
90		
91		

92 *ABREVIATURAS*

93

94 ACP: Análisis de Componentes Principales

95 AF: Área foliar

96 ANOVA: Análisis de la varianza

97 AP: Altura de planta

98 Az39: Cepa de *Azospirillum argentinense* utilizada como inoculante

99 EG: Energía germinativa

100 FDA: Fosfato diamónico

101 LB: Medio Luria-Bertani

102 LRP: Longitud de raíz primaria

103 MESZ: Fertilizante arrancador MicroEssentials® SZ®

104 MM: Medio mínimo

105 MO: Materia orgánica del suelo

106 NFb-Rojo Congo: Medio libre de nitrógeno (*nitrogen free broth*) suplementado con Rojo
107 Congo

108 p1000: Peso de mil granos

109 PG: Poder germinativo

110 PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

111 PFF: Pigmentos fotosintéticos foliares

112 PSPA: Peso seco de parte aérea

113 PSPR: Peso seco de parte radical

114 T: Tratamiento

115

116

117

118

119

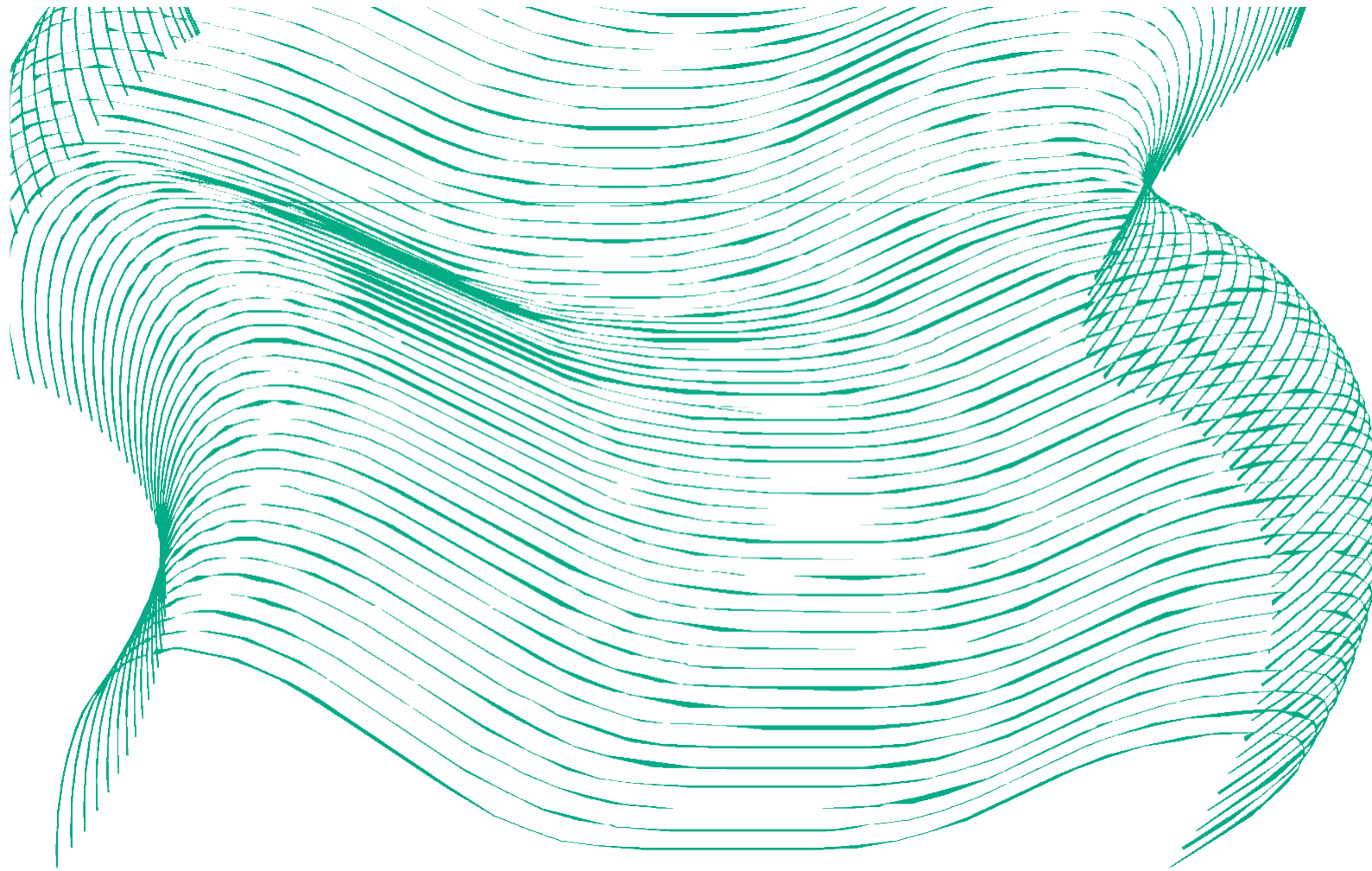
120

RESUMEN

La deficiencia de micronutrientes, particularmente de zinc (Zn), constituye un problema de alcance global que limita el crecimiento de los cultivos y reduce su calidad nutricional, contribuyendo al “hambre oculta” en poblaciones cuya dieta se basa en cereales. En este contexto, la integración de la fertilización con Zn y el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal surge como una alternativa para potenciar la productividad y la sustentabilidad agrícola. El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo clave a nivel mundial y nacional por su aporte a la seguridad alimentaria y a sistemas productivos. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la aplicación combinada de *Azospirillum argentinense* Az39 y fuentes de Zn sobre la germinación, el crecimiento, el rendimiento y la calidad nutricional del grano. La investigación se desarrolló mediante un enfoque multiescala que incluyó ensayos in vitro, en laboratorio, en condiciones controladas y a campo en sistemas de secano con suelos deficientes en Zn. La cepa Az39 mostró compatibilidad en un rango de 0,02 a 0,4 g L⁻¹ Zn, alcanzando recuentos del orden de 10⁷ UFC mL⁻¹ con ZnO y 10⁸ UFC mL⁻¹ con ZnSO₄, con reducciones conforme aumentaron las concentraciones, lo que evidenció un umbral de tolerancia dependiente de la fuente y dosis. La aplicación conjunta de Az39 y Zn aceleró la germinación, destacándose ZnSO₄ + Az39 con valores superiores al 70 % a las 48 h. En el estadio V3 del maíz, esta combinación promovió un incremento del 20-25 % en el peso seco de la parte aérea y aumentos en los distintos pigmentos fotosintéticos, entre 70% a superiores al 100% respecto al control. Además, los tratamientos ZnSO₄ + Az39 y ZnO + Az39 incrementaron el peso seco radical en 40-45 %, y la combinación ZnO + Az39 aumentó la longitud de la raíz primaria en 35-40 %, evidenciando efectos sinérgicos. A campo, las respuestas productivas estuvieron condicionadas por la disponibilidad hídrica. En campañas con restricción hídrica durante el período crítico del cultivo no se observaron diferencias entre los tratamientos. Mientras que, con menor restricción, los tratamientos integrados alcanzaron rendimientos de 11.200 kg ha⁻¹, significativamente superiores al control de 7.700 kg ha⁻¹. El contenido de Zn en grano se mantuvo estable incluso con incrementos de rendimiento superiores al 40-50 %. Así, la co-aplicación de Az39 y Zn se posiciona como una estrategia agronómica promisoriosa para incrementar la productividad y la calidad nutricional del maíz, contribuyendo al desarrollo de sistemas agrícolas más eficientes y sustentables.

ABSTRACT

Micronutrient deficiency, particularly zinc (Zn), is a global problem that limits crop growth and reduces their nutritional quality, contributing to “hidden hunger” in populations whose diets are primarily based on cereals. In this context, the integration of Zn fertilization and the use of plant growth-promoting microorganisms emerges as a promising strategy to enhance agricultural productivity and sustainability. Maize (*Zea mays* L.) is a key crop at both global and national levels due to its contribution to food security and production systems. The objective of this thesis was to evaluate the effect of the combined application of *Azospirillum argentinense* Az39 and Zn sources on germination, growth, yield, and grain nutritional quality. The study was conducted using a multiscale approach that included in vitro assays, laboratory experiments, controlled-environment studies, and field trials under rainfed conditions in Zn-deficient soils. The Az39 strain showed compatibility within a range of 0.02 to 0.4 g L⁻¹ Zn, reaching population levels on the order of 10⁷ CFU mL⁻¹ with ZnO and 10⁸ CFU mL⁻¹ with ZnSO₄, with reductions observed as concentrations increased, indicating a tolerance threshold dependent on Zn source and dose. The combined application of Az39 and Zn accelerated germination, with ZnSO₄ + Az39 showing the highest values, exceeding 70% at 48 hours. At the V3 growth stage of maize, this combination promoted a 20-25% increase in shoot dry weight and increases in photosynthetic pigments ranging from 70% to over 100% compared to the control. Additionally, the ZnSO₄ + Az39 and ZnO + Az39 treatments increased root dry weight by 40-45%, while the ZnO + Az39 combination enhanced primary root length by 35-40%, indicating synergistic effects. Under field conditions, yield responses were influenced by water availability. In seasons with water limitation during the critical growth period, no significant differences were observed among treatments. However, under more favorable conditions, integrated treatments achieved yields of 11,200 kg ha⁻¹, significantly higher than the control (7,700 kg ha⁻¹). Grain Zn concentration remained stable even when yield increased by more than 40-50%. Thus, the co-application of Az39 and Zn represents a promising agronomic strategy to increase maize productivity and nutritional quality of corn, contributing to the development of more efficient and sustainable agricultural systems.



CAPÍTULO 1:

Introducción General



1. Antecedentes

1.1 Importancia del cultivo de maíz en Argentina

El maíz (*Zea mays* L.) constituye uno de los cultivos estratégicos para la economía agrícola argentina, tanto por su papel clave en la seguridad alimentaria y el abastecimiento interno, como así también por su importancia dentro del complejo agroindustrial orientado a la exportación. Su versatilidad como materia prima permite su transformación en productos de alto valor agregado, tales como carnes, bioetanol y diversos subproductos industriales, consolidando su posición como uno de los pilares de la producción nacional (Paolilli *et al.*, 2021; Erenstein *et al.*, 2022). En particular, en la campaña 2023/2024 el 64% de la producción se destinó a la exportación, el 29% al consumo animal, el 6% a industrialización y otros usos, y el 1% correspondió al stock final (MAGyP, 2025a).

El protagonismo que posee este cultivo se explica tanto por la magnitud de la producción como por el desempeño exportador del país. De acuerdo con estimaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Argentina se ubica entre los cinco principales países productores de maíz a nivel mundial, junto con Estados Unidos, China, Brasil y la Unión Europea (USDA, 2025). Por su parte, la Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (FADA) señala que el país ocupa el tercer lugar a nivel mundial en exportaciones de maíz, considerando las exportaciones efectivas recientes y su participación en el comercio internacional, lo que reafirma su rol estratégico en el mercado global del cereal (FADA, 2025). Este desempeño se sustenta en una estructura productiva altamente competitiva y tecnificada, con fuerte presencia en la Región Pampeana, que concentra cerca del 82% de la producción nacional. La inserción internacional del maíz argentino se diversifica entre los principales destinos asiáticos, africanos y latinoamericanos, con una destacada participación de Vietnam, Corea del Sur y Egipto como países importadores clave (FADA, 2025).

Durante el primer semestre de 2025, las exportaciones del complejo maicero argentino alcanzaron USD 3.961 millones, lo que representa aproximadamente el 6% de las exportaciones totales del país. Dentro del conjunto de productos agroindustriales, el maíz aportó cerca del 17% del valor total exportado, consolidándose como uno de los principales

rubros generadores de divisas. Estos datos reflejan que el maíz además de ser un cultivo clave por su volumen de producción, lo es por su peso económico y su capacidad de dinamizar distintas actividades vinculadas —como la industria, el transporte y los servicios—, desempeñando así un papel central en la estructura productiva nacional (FADA, 2025). En este sentido, comprender su dinámica productiva y exportadora resulta clave para analizar la evolución del sector agroindustrial nacional y su contribución al crecimiento económico del país.

Dentro de las principales provincias, Córdoba explica el 35,9% de la producción nacional del cultivo, seguida por Buenos Aires, provincia que aporta el 31,1%, y en tercer lugar en importancia se encuentra Santa Fe con un 12,1% (Fig. 1). En lo que respecta a Córdoba, el departamento de Río Cuarto presenta la mayor participación en la superficie del cultivo, con un 21 % (Ministerio de Bioagroindustria de Córdoba, 2024).

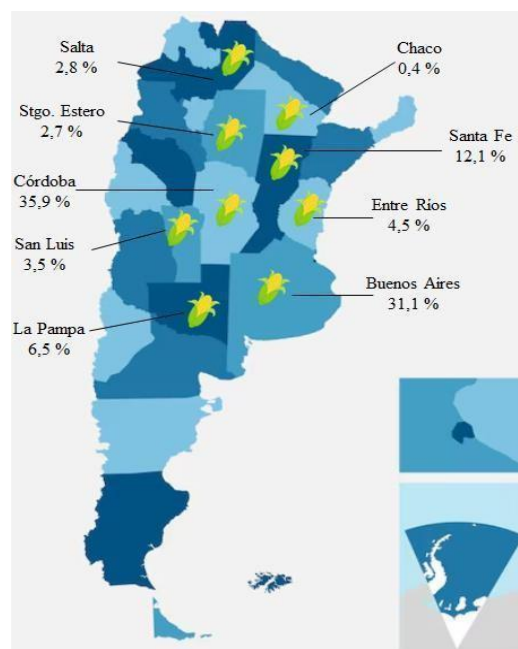


Figura 1 Principales provincias productoras del país. (Campaña 2023/24) SAGYP, 2025.

1.2 Desarrollo vegetativo y reproductivo del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), perteneciente a la familia Poaceae, es una especie anual de crecimiento determinado ampliamente cultivada por su grano. La planta presenta un sistema radical fasciculado compuesto por raíces seminales y adventicias nodales, que contribuyen a la absorción de agua y nutrientes y al anclaje. El tallo es erecto y segmentado en nudos y entrenudos, con hojas alternas de lámina alargada y venación paralela. Es una especie monoica, con inflorescencia masculina dispuesta en una panoja terminal y la femenina en espigas axilares (mazorcas), donde se desarrollan los granos (Fig. 2).

El ciclo ontogénico del cultivo se describe comúnmente mediante la escala fenológica de Ritchie y Hanway (1982; Fig. 3), que luego de la germinación, distingue un período vegetativo (VE-VT) y uno reproductivo (R1-R6). Así, la germinación constituye la primera etapa del desarrollo y se inicia con la imbibición de la semilla, la cual requiere absorber aproximadamente entre 30 y 40 % de su peso en agua para activar los procesos metabólicos que conducen a la emergencia de la radícula y del coleóptilo. En esta fase temprana se establecen las bases del vigor inicial de la plántula, parámetro estrechamente vinculado con la uniformidad de la implantación del cultivo y el rendimiento potencial del cultivo (Cárcova *et al.*, 2003). Tras la emergencia (VE), el ápice permanece protegido bajo la superficie del suelo durante los primeros estadios, lo que confiere cierta tolerancia a eventos de estrés térmico. Durante el período vegetativo, los estadios se identifican con la letra V seguida del número de hojas completamente expandidas. En las etapas V4-V6 ocurre la transición del meristema apical desde la diferenciación foliar hacia la formación de las estructuras reproductivas, determinándose el número potencial de hojas y, por lo tanto, el área foliar máxima. A partir de V6 se inicia la elongación de los entrenudos, proceso que continúa hasta el panojamiento (VT). En esta fase se definen atributos estructurales que condicionarán la captación de radiación y la capacidad fotosintética del cultivo.

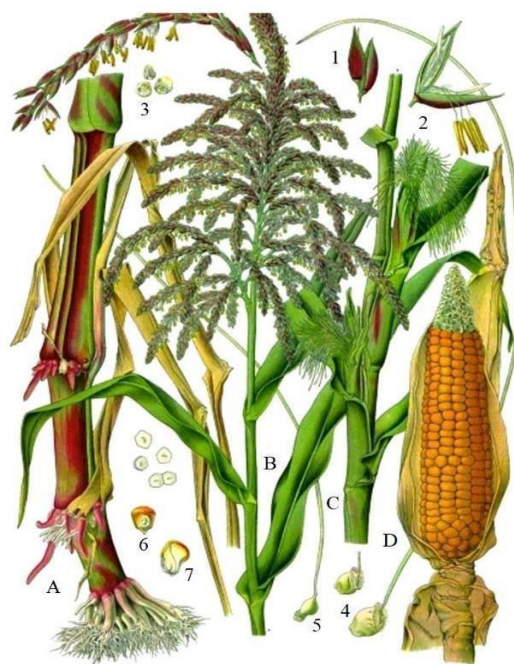


Figura 2 Morfología general de la planta de maíz. A) parte inferior; B) parte superior con inflorescencia masculina; C) centro de la planta con inflorescencia femenina; D) espiga femenina; 1) espiguilla masculina, 2) flor masculina; 3) granos de polen, 4) flor femenina, 5) flor femenina con estigma; 6) vista frente de fruto, 7) fruto: vista lateral femenina. Ilustración botánica tomada de Köhler, 1897.

El período reproductivo comienza con la emergencia de los estigmas (R1), momento en que se produce la fecundación. Le siguen las etapas de cuaje (R2), grano lechoso (R3),

grano pastoso (R4), grano duro o dentado (R5) y madurez fisiológica (R6). Entre R3 y R5 ocurre el llenado efectivo de los granos, fase crítica en la determinación del rendimiento final. La madurez fisiológica se identifica por la formación de la “capa negra”, que indica el cese del transporte de asimilados hacia el grano. Finalmente, el rendimiento del cultivo se define principalmente por el número de granos por unidad de superficie y el peso individual de los granos, componentes que se determinan en distintos momentos del ciclo y que son particularmente sensibles a las condiciones ambientales y nutricionales durante la diferenciación reproductiva y el llenado de grano (Savin, 2003; Cárcova *et al.*, 2003).

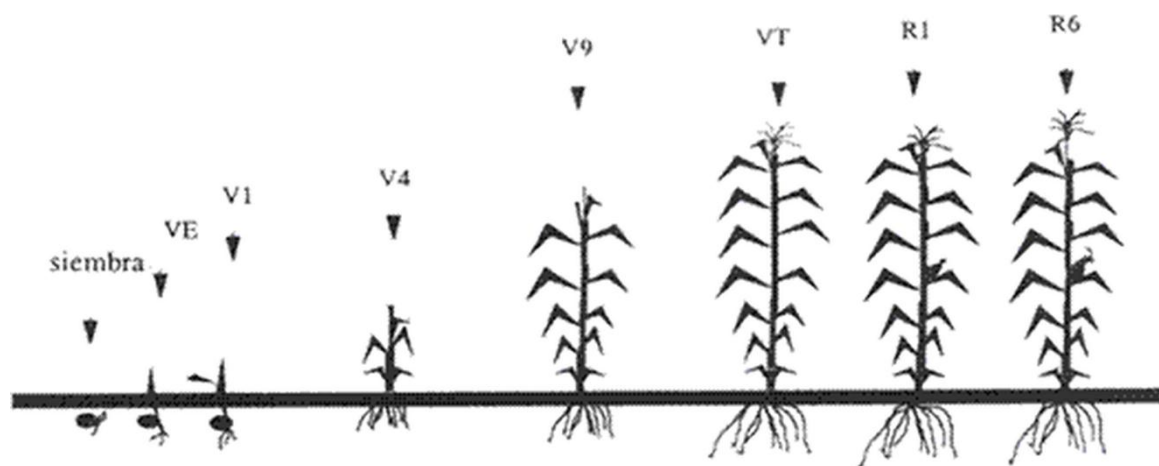


Figura 3 Etapas fenológicas del cultivo de maíz desde la siembra hasta la madurez fisiológica según la escala propuesta por Ritchie y Hanway (1982). Se ilustran los principales estados vegetativos (VE, emergencia; V1, V4 y V9) y reproductivos (VT, panojamiento; R1, floración o emisión de estigmas; R6, madurez fisiológica).

1.3 Déficit de Zinc en los suelos agrícolas

En la agricultura actual, la intensificación de los sistemas productivos y el enfoque exclusivo en el incremento del rendimiento han resultado en una elevada extracción de nutrientes y el consiguiente agotamiento de la fertilidad de los suelos (Cakmak, 2008). A ello se suma el efecto dilución, fenómeno por el cual los aumentos en el rendimiento tienden a disminuir la concentración de micronutrientes en el grano, lo que plantea un desafío adicional para alcanzar simultáneamente altos rendimientos y buena calidad nutricional (Cakmak, 2008,

2011). En la Región Pampeana los balances de nutrientes son negativos para los cultivos extensivos, evidenciando que la reposición realizada mediante fertilización resulta insuficiente frente a la extracción generada por los granos producidos (Koritschner *et al.*, 2023; Sainz Rozas *et al.*, 2025).

Una problemática regional del sur de la provincia de Córdoba da cuenta de la baja disponibilidad de micronutrientes en el suelo, particularmente Zinc (Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe) y Manganeseo (Mn) (Volmer y Ratto, 2005). Entre ellos el Zn es uno de los más críticos, detectándose en la mayoría de los sitios valores inferiores a 1 mg kg^{-1} (Ratto y Miguez, 2005; Sainz Rozas *et al.*, 2025), concentración que corresponde al nivel crítico de este micronutriente para maíz determinado por Barbieri *et al.* (2017) (Fig. 4). Además, se ha observado una relación directa entre el contenido de Zn disponible y la materia orgánica del suelo, de modo que suelos con bajos niveles de materia orgánica tienden a presentar una menor disponibilidad de este micronutriente, lo cual se vincula estrechamente con el sistema de manejo del suelo (Espósito *et al.*, 2010).

En este sentido, la mayor parte del Zn presente en los suelos se encuentra en formas no disponibles para las plantas, principalmente asociado a óxidos metálicos y otros complejos minerales. Las plantas acceden al Zn disuelto en la solución del suelo, adsorbido en la superficie de las partículas de arcilla o acomplejado con moléculas orgánicas de la materia orgánica. Su absorción ocurre principalmente en forma de cationes bivalentes (Zn^{+2}) y, bajo condiciones de pH elevado, también como catión monovalente (ZnOH^+) (Cakmak, 2015). Las plantas presentan dificultades para absorber Zn cuando las condiciones edáficas o climáticas limitan su disponibilidad. En cuanto a los factores del suelo que afectan la disponibilidad de Zn para las plantas son aquellos que controlan la cantidad de este elemento en la solución del mismo y su sorción-desorción desde/hacia la solución del suelo. Estos factores incluyen: el contenido total de Zn, pH, contenido de materia orgánica, contenido de arcilla, contenido de carbonato de calcio, condiciones redox, actividad microbiana en la rizósfera, estado de humedad del suelo, temperaturas bajas, concentraciones de otros oligoelementos, concentraciones de macronutrientes, especialmente fósforo (Alloway, 2008).

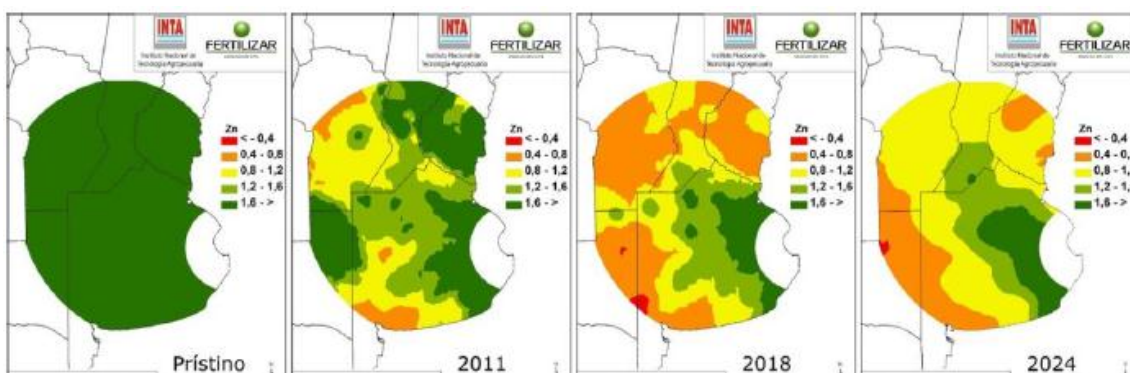


Figura 4 Distribución espacial de la disponibilidad de Zn en suelos de la región pampeana argentina en distintos momentos históricos: condición prístina, 2011, 2018 y 2024. Los mapas muestran la evolución de las concentraciones de Zn disponible en el suelo y evidencian un aumento progresivo de las áreas con niveles deficientes o bajos de este micronutriente. Adaptado de Sainz Rozas et al., (2025)

1.4 Importancia del zinc en la nutrición vegetal y humana

Entre los nutrientes esenciales para los cultivos, el Zn presenta suma importancia debido a sus diversas funciones en el vegetal. Es esencial para la síntesis de ADN, así como para los procesos de división y elongación celular (Marschner, 2011). Además, participa en la síntesis de fitohormonas, como las auxinas, claves para la regulación del crecimiento (Suganya et al., 2020). Su carencia puede provocar desequilibrios hormonales que derivan en anomalías en la arquitectura de las plantas y un desarrollo reducido. Desempeña un rol clave en la integridad estructural y funcional de los cloroplastos. Su ausencia limita la energía disponible para el crecimiento al reducir la eficiencia de los procesos fotosintéticos y la síntesis de clorofila (Alloway, 2008). Además, es indispensable para la estabilidad y adecuada actividad de numerosas enzimas, por lo que las plantas deficientes en este micronutriente suelen presentar alteraciones metabólicas y una disminución en la síntesis de proteínas (Nautiyal y Shukla, 2013). El Zn resulta imprescindible durante los estadios tempranos del crecimiento del maíz, dado que la absorción de este micronutriente es mayor al inicio del ciclo productivo y se ha evidenciado una relación positiva entre la concentración foliar de este nutriente y el

rendimiento del cultivo (Ratto *et al.*, 1991).

Con respecto a los síntomas de deficiencia de este micronutriente en las plantas de maíz, se observa clorosis internerval en hojas nuevas, plantas enanas, escaso desarrollo radical y menor rendimiento productivo (Hafeez *et al.*, 2013; Domingues *et al.*, 2016; Fig. 5). La aparición de síntomas es común durante las primeras etapas del desarrollo del cultivo, especialmente entre la segunda y tercera semana, y se caracteriza por su carácter transitorio, tendiendo a desaparecer completamente con el avance del ciclo. Sólo en algunas situaciones, en lotes de suelos arenosos, se ha observado que los síntomas de deficiencia de Zn persisten hasta la floración (Alloway, 2008; Marschner, 2012). Sin embargo, una situación similar ocurre en lotes que están en producción bajo siembra directa, con elevada fertilización fosfatada y en períodos de baja humedad (Ratto y Miguez, 2005). La aplicación de Zn durante la etapa de desarrollo del grano contribuye a aumentar la concentración de dicho micronutriente en el mismo, ya que este puede ser absorbido por la epidermis foliar y luego transportado a otras partes de la planta a través del xilema y floema (Impa *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019).



Figura 5 Síntomas de deficiencia de Zn en plantas, incluyendo clorosis internerval en las hojas, deformación foliar y enanismo. Fuente Espósito et al. (2021).

Además de su importancia en la producción agrícola, el Zn cumple un rol esencial en la nutrición humana. En este sentido, la deficiencia dietética de micronutrientes esenciales (o “hambre oculta”) constituye una crisis de salud pública global, que afecta a más de cinco mil millones de personas en todo el mundo convirtiéndolo en uno de los problemas más críticos de nuestro tiempo (Passarelli *et al.*, 2024). El déficit de micronutrientes, incluidos el Zn, se asocia con graves consecuencias para la salud humana como el retraso en el crecimiento, un sistema inmunológico comprometido y pérdidas significativas de productividad a nivel global (Ahsan *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2022; Hussain *et al.*, 2022; Younas *et al.*, 2023). Esta situación es especialmente grave en dietas centradas principalmente en alimentos a base de cereales, los cuales representan la mayor proporción de la ingesta diaria en muchas regiones (Cakmak *et al.*, 2010; Bouis *et al.*, 2011). En este contexto, aun cuando la concentración natural de Zn en el grano de maíz suele variar entre 14 a 24 mg.kg⁻¹ (Hess, 2017), esta cantidad resulta insuficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales humanos, estimados en aproximadamente 38 mg kg⁻¹ (Mutambu *et al.*, 2023). Este último corresponde a un valor objetivo establecido por la organización internacional de investigación HarvestPlus como parte de sus estrategias de biofortificación, con el fin de mejorar la calidad nutricional de cultivos básicos consumidos por poblaciones vulnerables (Bouis y Welch, 2010). Esta organización junto a CGIAR (por sus siglas en inglés; Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional) e IFPRI (por sus siglas en inglés; Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias), trabajan para combatir el hambre oculta a través del desarrollo y la difusión de variedades de cultivos enriquecidas con vitaminas y minerales (Bouis y Welch, 2010).

1.5 Manejo del zinc en los cultivos de maíz

Entre las principales estrategias destinadas a mitigar la deficiencia de Zn en la población se incluyen: (i) fortificación industrial de alimentos, que implica la adición del micronutriente durante su procesamiento; (ii) suplementación nutricional, basada en el consumo directo de preparados específicos; (iii) diversificación de la dieta, mediante la incorporación de alimentos naturalmente ricos en Zn; (iv) mejora genética, orientada al desarrollo de cultivares con mayor concentración del micronutriente; y (v) biofortificación, cuyo objetivo es incrementar el contenido de Zn en los cultivos. Sin embargo, las estrategias

de fortificación y suplementación suelen ser poco accesibles para sectores con recursos limitados, mientras que el mejoramiento genético constituye un proceso prolongado, costoso y sujeto a incertidumbres. En este contexto, la biofortificación agronómica, a través de prácticas de fertilización específicas y el empleo de tecnologías complementarias, se presenta como una alternativa eficaz, de rápida implementación y relativamente accesible, capaz de incrementar la concentración de Zn en los cultivos y contribuir a una alimentación más saludable (Praharaj *et al.*, 2021; Dhaliwal *et al.*, 2022; Aslam, 2023). En este sentido, las deficiencias de Zn se corrigen en la mayoría de los casos aplicando fertilizantes, ya sea Zn en forma granular, con macronutrientes iniciales (NPK), como recubrimiento o incorporado en el gránulo de macronutrientes. Los gránulos del fertilizante Zn o NPK se esparcen y se incorporan al suelo o se aplican en bandas al suelo debajo y al lado de las hileras de semillas. Históricamente, el sulfato de Zn (ZnSO_4) ha sido la fuente preferencial para aplicar este micronutriente. Este es un compuesto soluble al agua y puede ser aplicado en bandas, en cobertura total y en forma foliar. Sin embargo, existen otras alternativas para las fuentes de este elemento, algunas de las cuales afirman una mayor eficiencia de la disponibilidad de Zn para la planta (Lindenmayer, 2007). Dentro de las mismas, se mencionan (Alloway, 2008): óxido de Zn (ZnO) este es de baja solubilidad; complejo de amonio-Zn, el cual puede ser incluido con arrancadores líquidos; quelatos sintéticos de Zn, estos compuestos son hasta cinco veces más eficaces que las fuentes inorgánicas solubles en una base de contenido de Zn; residuos orgánicos variables, como estiércol y otros residuos orgánicos que son muy buenas fuentes de Zn. En este sentido, el tratamiento de semillas con Zn, tanto en formulaciones sólidas como líquidas, ha demostrado promover incrementos en la acumulación de materia seca de la parte aérea y del sistema radical, así como mejoras en el número de granos y en la productividad del cultivo (Dourado Neto *et al.*, 2015; Choukri *et al.*, 2022). Estos efectos se explican por el rol del Zn como componente esencial de diversos sistemas enzimáticos involucrados en la regulación del metabolismo de carbohidratos, fosfatos y proteínas, así como en la síntesis de auxinas, ARN y ribosomas, procesos clave para el crecimiento y desarrollo vegetal (Dubey y Pathak, 2024). No obstante, la respuesta del cultivo a la fertilización con este micronutriente depende fuertemente del estado nutricional inicial del suelo, ya que en situaciones donde los contenidos disponibles del micronutriente superan el nivel crítico, no se observan incrementos significativos en los componentes del rendimiento ni en la productividad del maíz (Jamami *et*

al., 2006; Gonçalves Júnior *et al.*, 2007).

1.5.1. Fertilización de Zn en el cultivo de maíz

En la Región Pampeana Argentina, numerosos estudios han documentado respuestas positivas del cultivo de maíz a la fertilización con Zn, especialmente en suelos con baja disponibilidad del micronutriente. En este sentido, en una red de 14 ensayos realizados en diferentes localidades de la región pampeana durante las campañas 2009/10 y 2010/11, se registraron respuestas significativas a la fertilización con Zn en ocho de los sitios evaluados, determinándose una dosis óptima promedio de 1,5 kg Zn ha⁻¹ (Michiels y Ruffo, 2012). Esta aplicación permitió obtener incrementos de rendimiento de 736 kg ha⁻¹ (6,8 %) respecto al tratamiento con aplicación de N y P, y de 484 kg ha⁻¹ (4,4 %) respecto al tratamiento donde se añadió N, P y S, sin observarse disminuciones de rendimiento asociadas a la incorporación de este micronutriente. Asimismo, en el sur de la provincia de Córdoba, donde se registraron niveles de Zn disponible en suelo entre 0,19 y 0,80 kg ha⁻¹, se evaluó la respuesta del cultivo de maíz a la aplicación de dosis crecientes de Zn (0-3 kg Zn ha⁻¹). Los resultados mostraron incrementos de rendimiento desde 7206 kg ha⁻¹ en el tratamiento sin Zn hasta valores de 8071-8112 kg ha⁻¹ en los tratamientos fertilizados, lo que representa aumentos de aproximadamente 12-13 % en el rendimiento de grano (Espósito *et al.*, 2010). Resultados similares han sido reportados en experimentos de campo realizados en Mollisoles con disponibilidades contrastantes de Zn en suelo, donde se evaluaron distintas estrategias de fertilización (tratamiento de semilla, aplicación foliar y aplicación al suelo) en cinco sitios-año. En estos ensayos, el rendimiento de grano del tratamiento control varió entre 3990 y 12 856 kg ha⁻¹, mientras que los tratamientos fertilizados con Zn alcanzaron valores de 4526 a 14 385 kg ha⁻¹, con respuestas comprendidas entre 892 y 2519 kg ha⁻¹ respecto al tratamiento sin fertilización (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020). Considerando estos antecedentes, se destaca la importancia de desarrollar estrategias que no sólo incrementen la productividad, sino también la calidad nutricional de los granos.

1.5.2 Estrategias biológicas que promueven una agricultura sostenible

En el marco de la biofortificación agronómica, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) constituyen una estrategia biológica complementaria a la fertilización mineral, con potencial para mejorar la nutrición y el desarrollo de los cultivos (Olanrewaju *et al.*, 2017; Kaur y Karnwal, 2023). Estas bacterias constituyen un grupo funcional diverso de microorganismos capaces de colonizar la rizósfera, la superficie radical o los tejidos vegetales, ejerciendo efectos beneficiosos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Vacheron *et al.*, 2013; Spaepen y Vanderleyden, 2015).

Los mecanismos mediante los cuales las PGPR estimulan el crecimiento vegetal incluyen una combinación de efectos directos e indirectos que actúan de manera complementaria sobre procesos fisiológicos, nutricionales y fitosanitarios del cultivo (Fig. 6). Entre los mecanismos directos más relevantes se destacan la producción de fitohormonas, la mejora en la disponibilidad y absorción de nutrientes minerales, la fijación biológica de nitrógeno y la modulación de procesos fisiológicos clave durante las etapas tempranas del desarrollo de los cultivos (Cassán *et al.*, 2011). Como se mencionó, dentro de los mecanismos directos, la síntesis de fitohormonas constituye uno de los procesos centrales en la promoción del crecimiento vegetal. Numerosas PGPR producen auxinas, particularmente ácido indol-3-acético (AIA), las cuales estimulan la elongación celular, la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelos radicales, incrementando la superficie de absorción de agua y nutrientes (Dobbelaere *et al.*, 2003). Asimismo, algunas cepas son capaces de sintetizar citoquininas y giberelinas, hormonas involucradas en la regulación del crecimiento aéreo, la división celular y el desarrollo de órganos reproductivos (Bottini *et al.*, 2004; Glick, 2012), así como otros reguladores del crecimiento vegetal, como ácido abscísico, etileno y ácido salicílico (Strzelczyk *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 2008; Sahoo *et al.*, 2014). Además, las PGPR pueden incrementar la disponibilidad de nutrientes mediante procesos como la solubilización de compuestos fosfatados inorgánicos, la mineralización de compuestos orgánicos y la producción de sideróforos, moléculas quelantes que facilitan la absorción de hierro en suelos con baja disponibilidad de este micronutriente (Vessey, 2003; Richardson *et al.*, 2009).

Asimismo, se ha demostrado su capacidad para favorecer la absorción de micronutrientes como Zn, Mn (manganeso) y Cu (cobre), a través de modificaciones en la rizósfera que aumentan su solubilización y movilidad (Adesemoye *et al.*, 2009; Gadd, 2010). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) constituye otro de los mecanismos directos ampliamente documentados, particularmente en bacterias asociativas del género *Azospirillum*. Estas bacterias convierten el N atmosférico (N_2) en formas asimilables por la planta, contribuyendo al suministro parcial de este nutriente esencial y mejorando la eficiencia del uso del nitrógeno en cultivos no leguminosos, como el maíz (Bashan y de-Bashan, 2010). En cuanto a los mecanismos indirectos, las PGPR pueden mitigar el impacto del estrés biótico y abiótico mediante la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR), un fenómeno que desencadena respuestas defensivas frente a patógenos sin comprometer el crecimiento vegetal (Pieterse *et al.*, 2014). Asimismo, algunas bacterias producen enzimas como ACC desaminasa, que reducen los niveles de etileno en plantas sometidas a condiciones de estrés, favoreciendo el crecimiento radical y la tolerancia a situaciones adversas como sequía, salinidad o deficiencias nutricionales (Glick, 2014; Sivasakthivelan *et al.*, 2021).

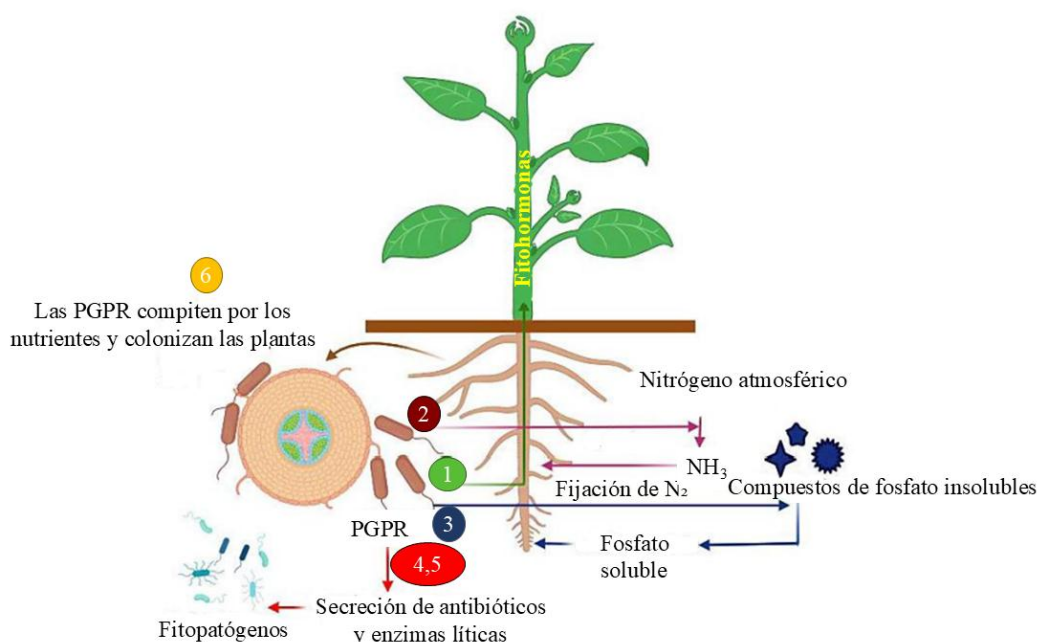


Figura 6 Representación de los mecanismos directos e indirectos de las PGPR en la promoción del crecimiento vegetal y el control de fitopatógenos: (1) producción de

fitohormonas, (2) fijación de N_2 , (3) solubilización de fosfatos, (4-5) secreción de antibióticos y enzimas líticas, y (6) competencia por espacio y nutrientes en la rizosfera. Imagen tomada y adaptada de Ansabayeva et al. (2025)

Entre las PGPR, las especies del género *Azospirillum* se destacan por ser uno de los grupos más estudiados y utilizados en agricultura (Cassán y Díaz-Zorita, 2016). Estas bacterias se asocian frecuentemente con las raíces de gramíneas y otros cultivos, donde contribuyen al crecimiento vegetal a través de distintos mecanismos fisiológicos y metabólicos. Estimulan principalmente el desarrollo del sistema radical, favoreciendo una mayor exploración del suelo y una mejora en la absorción de agua y nutrientes, efectos estrechamente vinculados a la producción de reguladores del crecimiento vegetal, particularmente auxinas (Tien et al., 1979; Bashan y de-Bashan, 2010; Cassán et al., 2011; Sivasakthivelan et al., 2021). En lo que respecta al género *Azospirillum*, desde el punto de vista taxonómico, este pertenece a la clase *Alphaproteobacteria* y al orden *Rhodospirillales*, y actualmente constituye el género tipo de la familia *Azospirillaceae* (Pfennig y Trüper, 1971; Tarrand et al., 1978; Baldani et al., 2015). Los miembros de *Azospirillum* son bacterias Gram negativas, diazotróficas, de vida libre y no formadoras de esporas, capaces de acumular gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato. El grupo fue originalmente descrito por Beijerinck (1925) bajo el nombre *Spirillum lipoferum*, pero posteriormente Tarrand et al. (1978) establecieron el género *Azospirillum*, incluyendo inicialmente a *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Con el avance de los estudios taxonómicos y genómicos, el número de especies reconocidas dentro del género ha aumentado considerablemente. Actualmente se han descrito al menos 24 especies válidas, entre ellas *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. argentinense* y *A. baldaniorum*, a las que se suman nuevas especies propuestas en años recientes, alcanzando aproximadamente 32 especies registradas en la base de datos de la List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (Nievas et al., 2023). Dentro de este grupo, varias especies han sido empleadas para el desarrollo de inoculantes agrícolas, especialmente en países de América del Sur. Entre ellas, *Azospirillum brasilense* ha sido históricamente la más utilizada, aunque en los últimos años también se han incorporado cepas pertenecientes a *A. baldaniorum* y *A. argentinense* (Okon y Labandera-González, 1994; Cassán y Díaz-Zorita, 2016).

1.5.2.1 *Azospirillum argentinense* Az39: una cepa de relevancia para la agricultura

Dentro del género *Azospirillum*, una de las especies más estudiadas es *Azospirillum brasilense*, recientemente reclasificada como *Azospirillum argentinense* sp. nov. (dos Santos Ferreira *et al.*, 2022). En particular, la cepa Az39, aislada originalmente de la rizósfera de trigo en la provincia de Córdoba (Fig. 7), ha sido ampliamente reconocida por su capacidad para promover el crecimiento vegetal y aumentar el rendimiento en cultivos extensivos como trigo y maíz. Esta cepa fue obtenida a partir de raíces de *Triticum aestivum* L. cultivado en Marcos Juárez (Córdoba, Argentina) y posteriormente depositada en la colección de cultivos BPCV-IMYZA-INTA (Rodríguez Cáceres *et al.*, 2008).

En Argentina, el desarrollo de inoculantes basados en *Azospirillum* tiene una larga trayectoria, destacándose el registro en 1996 del primer producto comercial formulado con la cepa Az39, actualmente reclasificada como *A. argentinense*. Desde entonces, numerosos ensayos a campo en maíz han demostrado su efectividad en la promoción del crecimiento y el rendimiento del cultivo. En este contexto, un metaanálisis reciente que integró ensayos realizados en la región pampeana argentina, evaluó el impacto de la inoculación con la cepa Az39 en cereales bajo una amplia diversidad de condiciones ambientales y productivas, aportando evidencia robusta sobre la consistencia de sus efectos en sistemas agrícolas reales. El análisis incluyó 638 sitios experimentales en trigo y 318 en maíz, con rendimientos que oscilaron entre 850 y 8990 kg ha⁻¹ en trigo y 2020 y 18 654 kg ha⁻¹ en maíz. En promedio, la inoculación con Az39 incrementó el rendimiento de grano en 231 kg ha⁻¹ en trigo y 432 kg ha⁻¹ en maíz ($p < 0,01$), valores que representan aproximadamente 5,4 % y 4,5 % del rendimiento máximo alcanzable, respectivamente. Asimismo, la respuesta positiva a la inoculación se observó en alrededor del 77 % de los sitios evaluados, aunque la magnitud del efecto varió según el nivel productivo y las condiciones ambientales, reflejando el carácter multifactorial que determina el rendimiento de los cultivos (Maroniche *et al.*, 2024). Estos resultados sintetizan la evidencia generada por numerosos estudios previos que evaluaron el desempeño agronómico de esta cepa, lo que contribuyó a su recomendación para la formulación de inoculantes comerciales destinados a diversos cereales y otros cultivos (Rodríguez Cáceres *et al.*, 2008; Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2008; Cassán *et al.*, 2015). De hecho, se estima

que está presente en alrededor del 75 % de los productos basados en *Azospirillum* utilizados en Sudamérica, lo que la posiciona como una cepa de referencia ampliamente estudiada tanto en condiciones de laboratorio como en sistemas agrícolas (Cassán *et al.*, 2020).

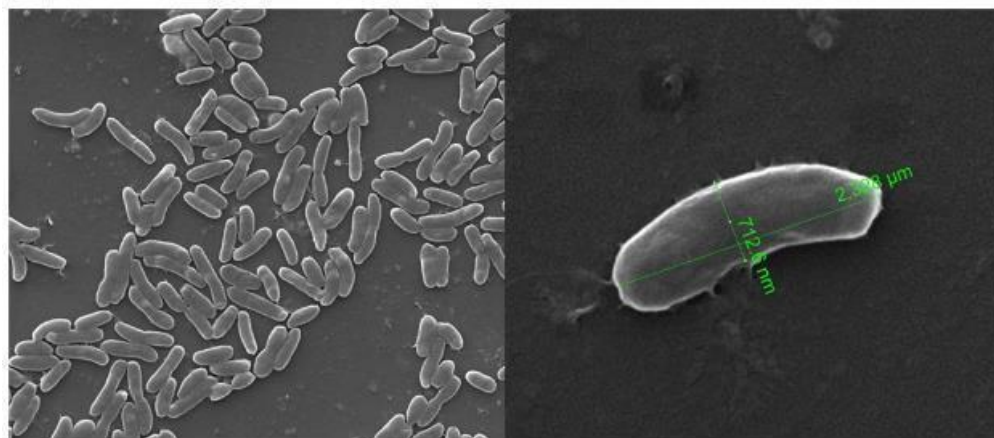


Figura 7 Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Azospirillum argentinense* Az39. Tomada de dos Santos Ferreira *et al.* (2022).

Cabe destacar que la respuesta de los cultivos a la inoculación con PGPR depende estrechamente del contexto nutricional y del manejo agronómico. Mientras que deficiencias severas de nutrientes difícilmente pueden ser compensadas exclusivamente mediante la acción biológica, los esquemas de fertilización sin limitaciones tienden a reducir la contribución relativa de los microorganismos asociados a la eficiencia en el uso de recursos (Ferraris y Faggioli, 2008). En este sentido, comprender la interacción entre los procesos biológicos de la rizósfera y la disponibilidad de nutrientes resulta clave para el desarrollo de estrategias de manejo integradas.

En particular, la combinación de la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 y la fertilización con micronutrientes esenciales, como Zn, representa una alternativa potencial para optimizar el crecimiento vegetal y la productividad del cultivo de maíz. Si bien existe evidencia que demuestra efectos positivos tanto de la inoculación con *Azospirillum* como de la fertilización con Zn sobre el crecimiento, la nutrición y el rendimiento del maíz en

condiciones de campo, la mayoría de los estudios han evaluado estos factores de manera independiente. En consecuencia, aún es limitado el conocimiento acerca de su interacción y de los posibles efectos complementarios o sinérgicos que podrían generarse en el sistema suelo-planta-microorganismo.

Considerando que las PGPR pueden modificar la disponibilidad y absorción de nutrientes en la rizosfera, el análisis conjunto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la fertilización con Zn adquiere especial relevancia para comprender su impacto sobre el crecimiento, el rendimiento y la calidad del grano de maíz. En este contexto, el presente trabajo plantea la siguiente hipótesis y objetivos general y específicos.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La inoculación de *Azospirillum argentinense* Az39 combinado al micronutriente Zn incrementa el comportamiento germinativo, el crecimiento y rendimiento del cultivo de maíz y la calidad nutritiva del grano.

2.2 Objetivo general

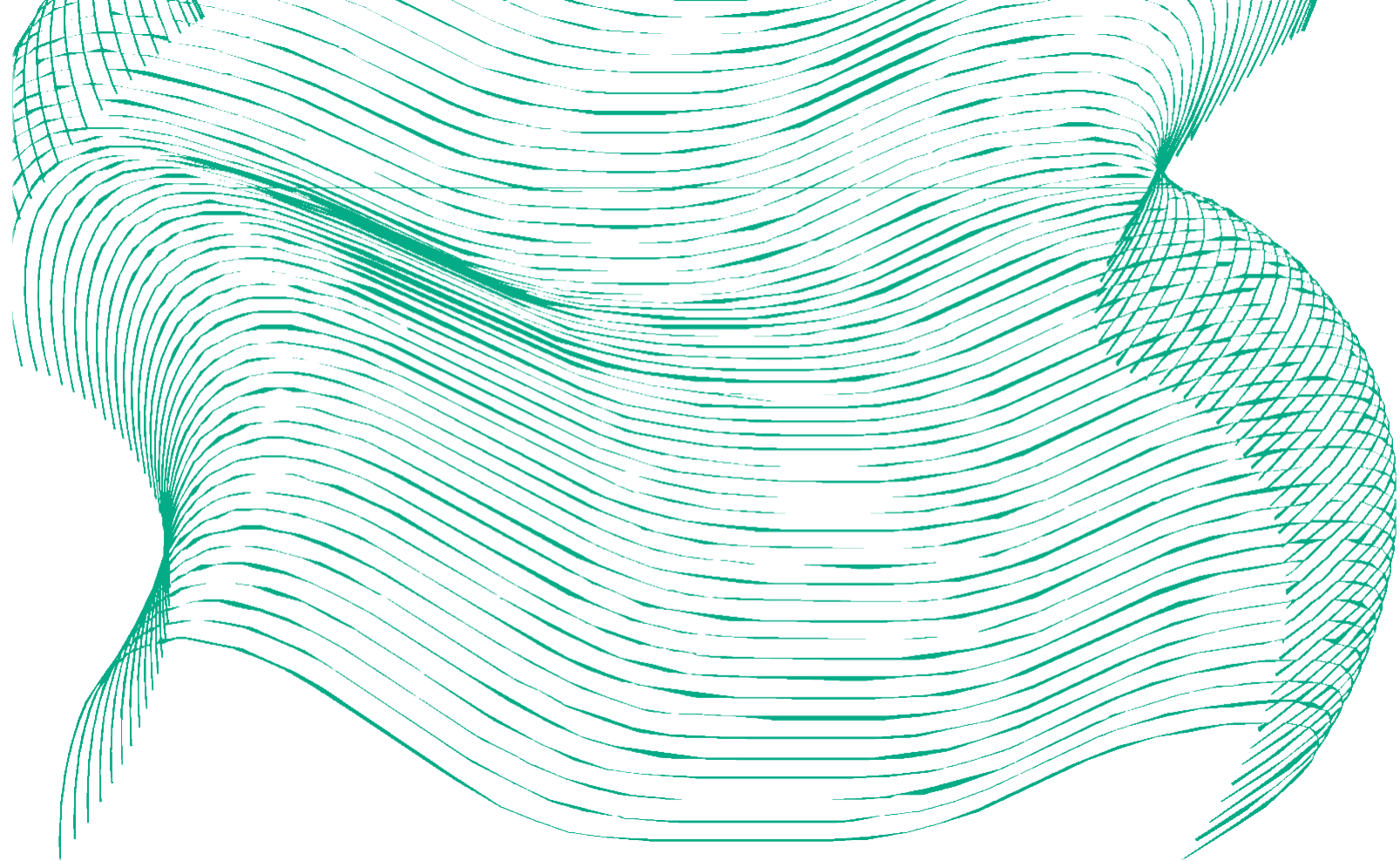
Evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 y la aplicación del micronutriente Zn, en forma individual y combinada, sobre el comportamiento germinativo, el crecimiento, el rendimiento y la calidad nutritiva del grano de maíz, con el propósito de valorar su potencial como estrategia integrada de biofertilización y biofortificación del cultivo.

2.3 Objetivos específicos

1. Establecer la capacidad de *Azospirillum argentinense* Az39 para crecer en presencia de diferentes fuentes y concentraciones de Zn *in vitro*, a fin de investigar la

compatibilidad fisiológica entre la bacteria y el micronutriente y su potencial uso conjunto en tratamientos de semillas.

2. Determinar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la suplementación con Zn sobre la germinación de semillas de maíz, con el propósito de identificar posibles interacciones sinérgicas o antagonistas durante las etapas de crecimiento tempranas del cultivo.
3. Determinar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la fertilización con Zn sobre el crecimiento y el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas de maíz bajo condiciones controladas, con el fin de caracterizar las respuestas fisiológicas asociadas al tratamiento combinado.
4. Investigar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la fertilización con Zn sobre los componentes del rendimiento y la calidad nutricional del grano de maíz en condiciones de campo, con el propósito de estimar el impacto agronómico y nutricional del uso combinado de ambos tratamientos



CAPÍTULO 2:

*Azospirillum frente a los compuestos de zinc:
evaluación in vitro de la cepa Az39*



1. Antecedentes

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) constituye una de las estrategias biotecnológicas más relevantes para mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes y promover sistemas agrícolas más productivos y ambientalmente sustentables (Bashan y de-Bashan, 2010; Vacheron *et al.*, 2013; Basu *et al.*, 2021; Backer *et al.*, 2018; Jalal *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2022). Estas bacterias interactúan estrechamente con las raíces de las plantas y pueden estimular el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, tales como la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno, la mejora en la arquitectura radical y la optimización de la absorción de nutrientes esenciales, contribuyendo además a una mayor tolerancia frente a condiciones ambientales adversas (Vacheron *et al.*, 2013; Basu *et al.*, 2021; Santoyo *et al.*, 2021; Jalal *et al.*, 2023).

Dentro de este grupo funcional, el género *Azospirillum* ha sido ampliamente estudiado debido a su capacidad para establecer asociaciones beneficiosas con gramíneas de importancia agronómica, modulando procesos fisiológicos clave asociados al crecimiento y desarrollo vegetal (Dobbelaere *et al.*, 2001; Cassán *et al.*, 2011). En este contexto, *Azospirillum argentinense* Az39 se destaca como una cepa de alto interés agronómico, con eficacia demostrada como bioinoculante en cultivos extensivos, incluyendo maíz, y una elevada estabilidad bajo diferentes condiciones ambientales y de manejo (Rodríguez Cáceres *et al.*, 2008; Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2008; Cassán *et al.*, 2015). La reciente reclasificación taxonómica de esta cepa como *Azospirillum argentinense* Az39 (dos Santos Ferreira *et al.*, 2022) consolidó su posicionamiento como cepa modelo para la industria de inoculantes en Sudamérica. En este marco, estudios recientes destacan que la expresión de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por parte de *Azospirillum* spp. y la magnitud de la respuesta observada en las plantas dependen fuertemente de factores ambientales y nutricionales, así como de la capacidad de la bacteria para sobrevivir, multiplicarse y mantener su actividad metabólica en distintos contextos edáficos y de manejo (Dobbelaere *et al.*, 2001; Cassán *et al.*, 2011; Bashan y de-Bashan, 2010; Chattaraj *et al.*, 2025).

Diversos estudios han demostrado que la acción de las PGPR puede verse modulada por la disponibilidad y forma química de los nutrientes, influyendo sobre la eficiencia de absorción, la regulación metabólica y la tolerancia al estrés abiótico (Alloway, 2008; Jalal *et*

al., 2023). En este sentido, la interacción entre *A. argentinense* Az39 y micronutrientes esenciales, particularmente el Zn, adquiere una relevancia central dado su rol clave tanto en procesos fisiológicos vegetales como microbianos. El Zn es un micronutriente indispensable tanto para las plantas como para los microorganismos del suelo. En los vegetales, participa en la activación de numerosas enzimas, en la síntesis de proteínas, en la regulación hormonal, especialmente de auxinas, en la estabilidad de membranas y en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los cloroplastos (Alloway, 2008; Marschner, 2011). Asimismo, su participación en sistemas antioxidantes dependientes de Zn y en la regulación de procesos metabólicos esenciales para el crecimiento celular temprano convierte a este micronutriente en un factor crítico durante las etapas iniciales del desarrollo vegetal (Jalal *et al.*, 2023).

En los sistemas agrícolas, la disponibilidad de Zn en el suelo depende en gran medida de su forma química y de los procesos microbianos que regulan su movilización y transformación (Kamran *et al.*, 2017). Una fracción considerable del Zn presente en los suelos se encuentra en formas minerales poco solubles, por lo que la actividad de microorganismos rizosféricos puede desempeñar un papel fundamental en su disponibilidad biológica. Así mismo, este micronutriente es aportado principalmente mediante compuestos tales como el sulfato de Zn (ZnSO_4), caracterizado por su alta solubilidad, y el óxido de Zn (ZnO), de menor solubilidad, cuyas propiedades fisicoquímicas pueden condicionar su interacción con los microorganismos del suelo y su disponibilidad biológica (Alloway, 2008; Jalal *et al.*, 2023). Desde el punto de vista microbiológico, el Zn también influye sobre la supervivencia bacteriana, la actividad enzimática y la expresión de rasgos funcionales asociados a la promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, cuando su concentración intracelular supera determinados umbrales fisiológicos puede generar efectos tóxicos asociados a alteraciones en la homeostasis metálica, desestabilización de proteínas y perturbaciones en la integridad de membranas celulares (Nies, 2003; Lemire *et al.*, 2013; Fukami *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2018). En bacterias ambientales se ha reportado que la tolerancia al Zn puede variar ampliamente entre especies y cepas, dependiendo de los sistemas de regulación de metales presentes en la célula. Estudios sobre resistencia microbiana a metales indican que numerosas bacterias del suelo pueden tolerar concentraciones aproximadas de 0,006 a 0,33 g L⁻¹ de Zn⁺² (equivalentes a 0,1-5 mM), aunque cepas con mecanismos de resistencia más eficientes pueden tolerar

niveles superiores (Bruins *et al.*, 2000). En bacterias asociadas a la rizósfera se ha descripto que la tolerancia al Zn puede variar entre cepas, con concentraciones mínimas inhibitorias comprendidas entre 0,04 y 0,16 g L⁻¹ de Zn, valores a partir de los cuales se observa inhibición del crecimiento bacteriano dependiendo de la especie evaluada (Raklami *et al.*, 2024). Asimismo, la forma química del Zn influye en su biodisponibilidad y toxicidad, observándose que, compuestos como nanopartículas de ZnO han demostrado que pueden generar efectos inhibitorios sobre bacterias del suelo a concentraciones comprendidas entre 0,04 y 0,41 g L⁻¹, debido principalmente a la liberación progresiva de iones Zn⁺² en el medio y a la alteración de la homeostasis metálica celular (Dimkpa *et al.*, 2012).

En este marco, la evaluación de la supervivencia de *Azospirillum argentinense* Az39 frente a diferentes compuestos de Zn bajo condiciones *in vitro* constituye un paso metodológico clave para comprender los límites fisiológicos de la bacteria y su compatibilidad con estrategias de fertilización mineral. Este enfoque permite generar información fundamental para el diseño de tecnologías integradas que combinen inoculación bacteriana y fertilización con micronutrientes de manera eficiente y sustentable. Para determinar las concentraciones y compuestos de Zn a las cuales esta bacteria es capaz de crecer, se abordó el siguiente objetivo específico:

2. Objetivo específico

Establecer la capacidad de *Azospirillum argentinense* Az39 para crecer en presencia de diferentes fuentes y concentraciones de Zn *in vitro*, a fin de investigar la compatibilidad fisiológica entre la bacteria y el micronutriente y su potencial uso conjunto en tratamientos de semillas.

3. Metodología

3.1 Determinación de supervivencia bacteriana frente a los compuestos de Zn

Se utilizó la cepa *Azospirillum argentinense* Az39, cultivada en medio líquido LB

(Luria Broth, Bertani, 1951) durante 24 h en agitador orbital a 28 °C y 80 rpm. A partir de este cultivo se obtuvo el inóculo bacteriano utilizado en los ensayos de supervivencia y crecimiento. La composición del medio LB se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1 Composición de Medio líquido LB (1 L) (Bertani, 1951)

Componente	Cantidad
Tripteína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Para evaluar la capacidad de crecimiento de Az39 en presencia de Zn, se transfirieron 500 µL del inóculo a 50 mL de medio mínimo líquido (MM), cuya composición se presenta en la Tabla 2, suplementado con diferentes concentraciones de Zn en forma de óxido (ZnO) o sulfato (ZnSO₄). Las dosis evaluadas para cada fuente de Zn se presentan en la Tabla 3, de acuerdo con el esquema experimental ilustrado en la Figura 8. Cada ensayo *in vitro* se repitió 3 veces de manera independiente.

Tabla 2 Composición de medio mínimo (1L)

Componente	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Glucosa	1 g
CaCl ₂	10 mL
FeCl ₃	10 mL
MnCl ₂	10 mL
ZnSO ₄	1 mL
Agar	20 g L ⁻¹

Tabla 3 Tratamientos evaluados en el ensayo in vitro para el análisis de la respuesta de *Azospirillum argentinense* Az39 a distintas fuentes y dosis de Zn.

Tratamiento	Fuente de Zn	Dosis (g L ⁻¹)	Inoculación
Control (+)	-	0	Si
ZnO	ZnO	0,02 - 0,03 - 0,2 - 0,4 - 0,6	Si
ZnSO ₄	ZnSO ₄	0,02 - 0,2 - 0,4 - 0,8	Si
Control (-)	-	0	No

Se realizó un seguimiento del crecimiento durante un período de 72 horas, con intervalos de muestreo cada 24 horas de incubación, mediante la evaluación de la pureza del cultivo y el recuento de células viables. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC mL⁻¹) (Herigstad *et al.*, 2001). Para ello, se empleó la técnica de microgota descrita por Somasegaran y Hoben (1994). Se prepararon diluciones decimales seriadas, utilizando 900 µL de solución salina (NaCl al 0,9%) y 100 µL de muestra. Posteriormente, se sembraron tres gotas de 20 µL por cada dilución en un medio de cultivo

selectivo para bacterias fijadoras de N₂ libre, Nfb-Rojo Congo cuya composición se detalla en la Tabla 4 (nitrogen free broth; Rodríguez Cáceres, 1982). Las placas se dejaron secar y, a continuación, se incubaron a 28 °C. El recuento se realizó a partir de aquellas diluciones que presentaron entre 3 y 30 colonias por gota. Finalmente, las UFC se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$UFC\ mL^{-1} = (\text{promedio dl número de colonias}) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

Tabla 4 Composición medio sólido Nfb-Rojo Congo (1 L) (Rodríguez Cáceres, 1982)

Componente	Cantidad
Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	10 mL
FeCl ₃	10 mL
K(OH)	4,5 g
Extracto de levadura	0,2 g
Agar	12 g
Rojo Congo	15 mL

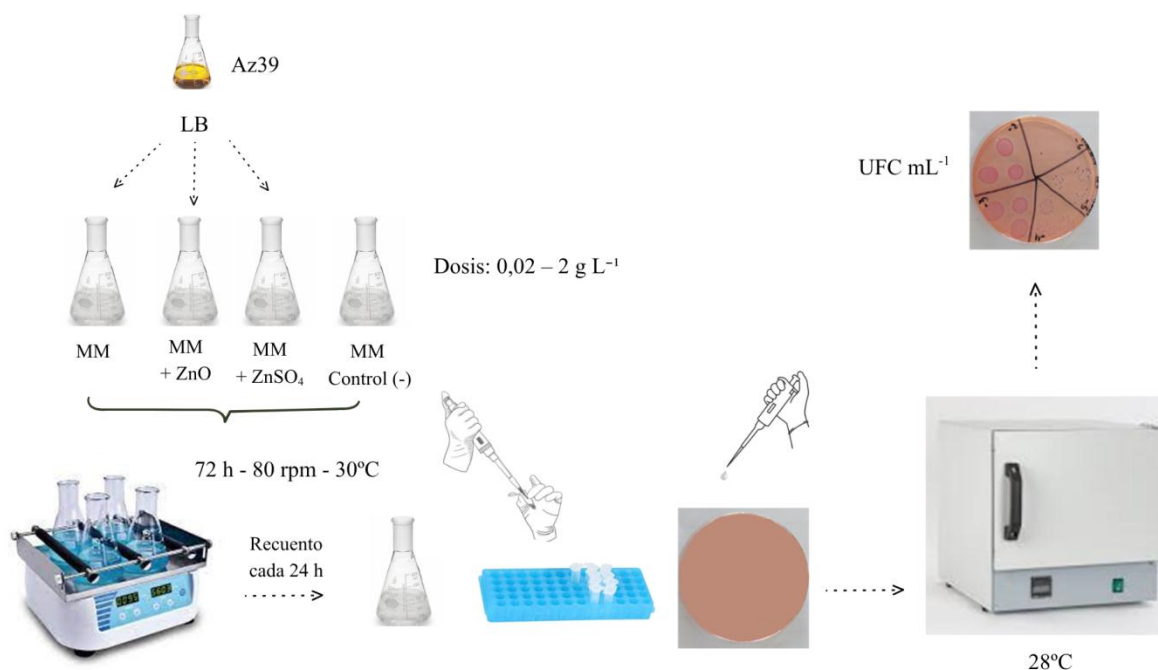


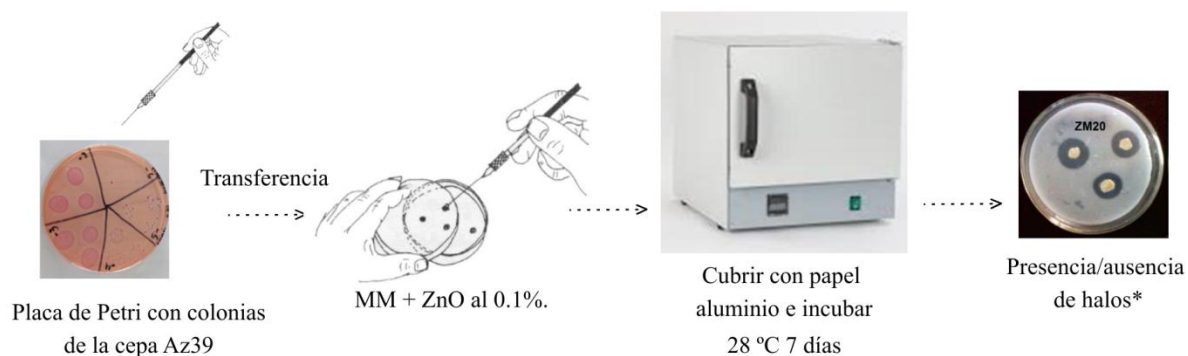
Figura 8 Esquema experimental de los tratamientos evaluados para la determinación de la supervivencia de *Azospirillum argentinense* Az39 frente a los compuestos de Zn.

3.2 Determinación de la capacidad de solubilización de compuestos de Zn

La capacidad de solubilización de compuestos de Zn por parte de Az39 se evaluó mediante un ensayo en medio sólido, siguiendo la metodología descrita por Sharma *et al.* (2012). Para ello, se utilizaron colonias de Az39 obtenidas a partir de medio NFb- Rojo Congo sólido, las cuales se transfirieron como *spot* sobre placas conteniendo medio mínimo suplementado con óxido de Zn (ZnO) al 0,1 %, como fuente insoluble de Zn. Las placas se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 7 días (Fig. 9). Transcurrido este período, se evaluó la presencia o ausencia de zonas claras alrededor de las colonias, así como el diámetro de dichas zonas cuando correspondió. La formación de halos se consideró indicativo de la capacidad de solubilización de los compuestos de Zn presentes en el medio. El ensayo se repitió en tres ocasiones independientes.

Los tratamientos evaluados fueron:

- Control: medio mínimo completo + Az39
- T1: medio mínimo completo suplementado con ZnO al 0,1 % + Az39



*Imagen ilustrativa de placa con medio mínimo con presencia de halos de solubilización de Mumtaz *et al.*, 2017

Figura 9 Esquema experimental de la metodología empleada para la determinación de la capacidad de Azospirillum argentinense Az39 para solubilizar óxido de Zn. La imagen de la placa de Petri denota la presencia de halos de solubilización de Zn (extraída de Mumtaz et al., 2017).

3.3 Análisis estadístico

Los datos de las diferentes variables evaluadas para todas las experiencias fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA). Se verificaron los supuestos de homogeneidad de las varianzas y normalidad utilizando las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Además, se empleó la prueba de LSD Fisher Alfa al 5 % para determinar diferencias significativas entre tratamientos, con el programa InfoStat/Profesional versión. (Di Rienzo *et al.*, 2020). Las Figuras se elaboraron utilizando el software Graph Pad Prism (versión 8.0.3.0).

4. Resultados y Discusión

4.1 Capacidad de crecimiento bacteriano en presencia de Zn

Las colonias obtenidas en medio NFb-Rojo Congo presentaron la morfología típica de *Azospirillum argentinense* Az39, caracterizada por colonias de color rojo escarlata, superficie plana y textura seca (Fig. 10), confirmando la identidad y estabilidad fenotípica de la cepa bajo las condiciones experimentales evaluadas (dos Santos Ferreira *et al.*, 2022). Los ensayos *in vitro* mostraron que *Azospirillum argentinense* Az39 mantiene su viabilidad y forma colonial característica en el medio selectivo y es capaz de crecer en presencia de compuestos de Zn (ZnO y ZnSO₄) dentro de los rangos de concentración evaluados. Estas observaciones confirman la tolerancia y adaptabilidad de la cepa a ambientes enriquecidos con Zn y son coherentes con la descripción fenotípica y funcional de Az39 como cepa empleada en inoculantes agrícolas. La reclasificación genómica reciente que posiciona a Az39 como *Azospirillum argentinense* respalda su carácter de cepa tipo y su potencial agronómico documentado (dos Santos Ferreira *et al.*, 2022).



Figura 10 Placa de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC mL⁻¹) de la cepa Az39 cultivada en medio NFb- Rojo Congo. Cada sector de la placa corresponde a una dilución diferente, indicada por los números escritos (2 = 10⁻²; 3 = 10⁻³; 4 = 10⁻⁴; 5 = 10⁻⁵; 6 = 10⁻⁶ UFC mL⁻¹). Se observan colonias características de la cepa distribuidas en los distintos sectores de dilución. Imagen propia

Los ensayos *in vitro* realizados en medio de cultivo líquido MM y en medio sólido Nfb-Rojo Congo, si bien demostraron que Az39 fue capaz de crecer en presencia de ambos compuestos de Zn, fue posible observar diferencias en los rangos de concentración tolerados. En medio mínimo suplementado con ZnO la cepa mantuvo su viabilidad en concentraciones comprendidas entre 0,02 y 0,4 g L⁻¹ (Fig. 11a). El crecimiento máximo se observó a las 48 h, con recuentos del orden de 10⁸ UFC mL⁻¹, tanto en el tratamiento control como cuando se adicionó 0,02 g L⁻¹, mientras que, con 0,4 g L⁻¹ se observó un crecimiento del orden de 10⁷ UFC mL⁻¹. En cuanto a las concentraciones superiores a dicho rango fue posible observar una disminución significativa del crecimiento desde las primeras 24 h, sugiriendo un efecto inhibitorio asociado al aumento de la carga de Zn en el medio.

Por su parte, en la adición de ZnSO₄ al medio de cultivo, Az39 fue capaz de crecer en un rango de concentraciones de 0,02 a 0,4 g L⁻¹ (Fig. 11b). El máximo crecimiento bacteriano se registró a las 24 h, principalmente con 0,02 g L⁻¹ de ZnSO₄ siendo similar al control, los cuales presentaron valores más elevados de UFC mL⁻¹ del orden de 10¹⁰, sin diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0,05$). En cuanto a la dosis de 0,4 g L⁻¹ se observó un recuento bacteriano del orden de 10⁸ UFC mL⁻¹, donde dosis superiores produjeron una reducción significativa del crecimiento bacteriano, evidenciando la existencia de un umbral fisiológico de tolerancia frente al Zn. En todos los ensayos, el tratamiento control negativo (-) no evidenció crecimiento bacteriano (datos no mostrados), confirmando la ausencia de contaminación y la confiabilidad de las condiciones experimentales.

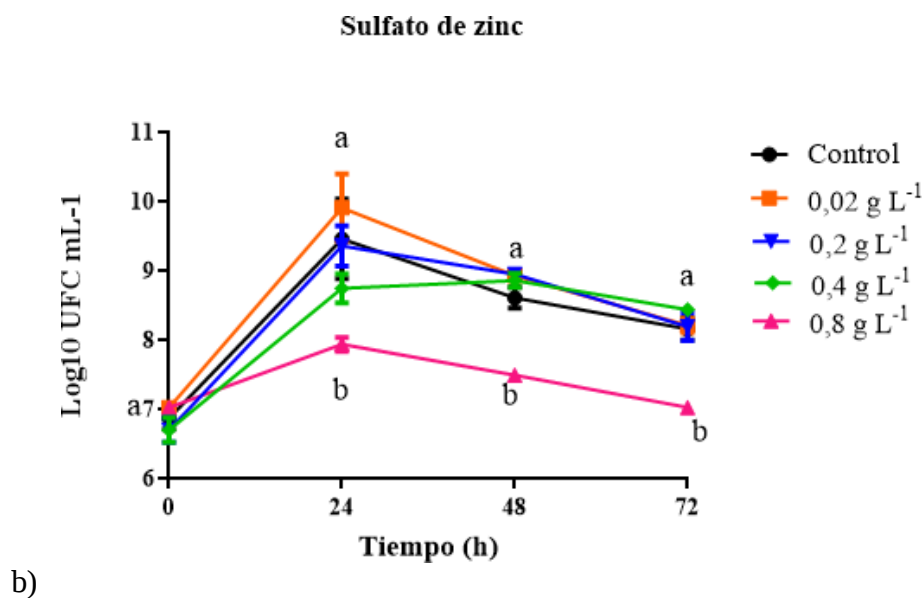
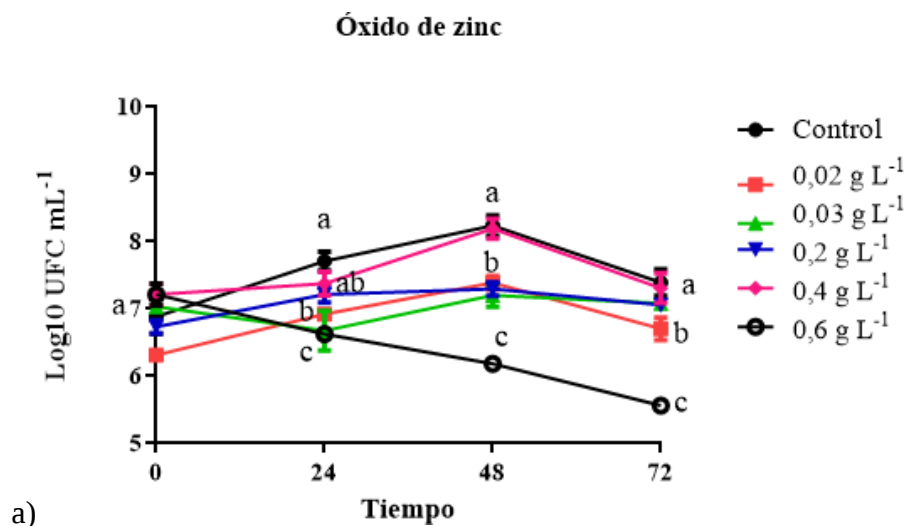


Figura 11 Crecimiento de Az39 en medio líquido MM suplementado con óxido de Zn (a) y sulfato de Zn (b) a distintas concentraciones. El crecimiento se expresó como Log₁₀ UFC mL⁻¹ y se evaluó a 0, 24, 48 y 72 h. Los valores representan la media $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo ($p < 0,05$)

Los resultados obtenidos indican que *Azospirillum argentinense* Az39 mantiene su capacidad de crecimiento en presencia de concentraciones moderadas de Zn, aunque se observa una disminución significativa del crecimiento cuando la concentración del micronutriente aumenta. Este comportamiento es consistente con lo reportado para numerosas bacterias del suelo, en las cuales el Zn^{+2} actúa simultáneamente como micronutriente esencial y como potencial agente tóxico cuando supera ciertos umbrales fisiológicos (Chandrangsu *et al.*, 2017; Lemire *et al.*, 2013). En bajas concentraciones, este elemento cumple funciones estructurales y catalíticas en numerosas enzimas bacterianas, participando en procesos metabólicos como la regulación de proteínas, la estabilización de estructuras ribosomales y la actividad de enzimas oxidoreductasas. Sin embargo, a concentraciones elevadas puede inducir estrés oxidativo debido a la perturbación de los sistemas antioxidantes bacterianos y al incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que contribuye a limitar la proliferación celular bajo estas condiciones. Uno de los principales mecanismos mediante los cuales concentraciones elevadas de Zn^{+2} afectan a las bacterias, es la desestabilización de la homeostasis de metales intracelulares. El exceso de este puede desplazar otros cationes metálicos esenciales, como hierro o manganeso, de los sitios activos de diversas enzimas, fenómeno conocido como *mismetallation*, lo que conduce a la pérdida de funcionalidad en proteínas clave del metabolismo celular (Nies, 2003; Lemire *et al.*, 2013). Además, el aumento de Zn intracelular puede inducir estrés oxidativo debido a la alteración de los sistemas antioxidantes bacterianos y al incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (Chandrangsu *et al.*, 2017). En el presente trabajo, se evaluaron concentraciones comprendidas entre 0,02 y 2 g L⁻¹ de Zn, según el compuesto utilizado. Estos valores se encuentran dentro del orden de magnitud reportado para estudios de tolerancia bacteriana a este metal. En bacterias asociadas a la rizósfera, se han reportado concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para Zn entre 0,04 y 0,16 g L⁻¹ de Zn, a partir de las cuales se observa inhibición del crecimiento bacteriano dependiendo de la cepa evaluada (Raklami *et al.*, 2024). Asimismo, se ha descrito que numerosas bacterias ambientales presentan tolerancias variables al Zn, generalmente en rangos comprendidos entre 0,006 y 0,33 g L⁻¹ de Zn^{+2} (Bruins *et al.*, 2000). En este contexto, los efectos observados en el presente estudio pueden interpretarse considerando que la respuesta bacteriana al Zn depende tanto de la concentración como de la forma química del metal. Por lo que, la reducción del crecimiento observada en las

concentraciones más elevadas evaluadas en el presente estudio ($0,6 \text{ g L}^{-1}$ de ZnO y $0,8 \text{ g L}^{-1}$ de ZnSO_4) resulta consistente con estos antecedentes y sugiere que el aumento en la disponibilidad del metal genera condiciones de estrés fisiológico que limitan la proliferación bacteriana. No obstante, la capacidad de la cepa Az39 para mantener crecimiento bacteriano, incluso en concentraciones relativamente elevadas, indicaría un grado de tolerancia comparable al reportado para otras bacterias rizosféricas capaces de persistir en ambientes agrícolas donde se aplican fertilizantes micronutrientes.

Por otra parte, la diferencia observada en la tolerancia bacteriana frente a ZnO y ZnSO_4 puede interpretarse considerando la dinámica de liberación de Zn^{+2} en el medio de cultivo. El ZnSO_4 es una fuente altamente soluble que libera rápidamente Zn^{+2} en solución, aumentando la actividad iónica del metal en el medio. En contraste, el ZnO presenta una solubilidad considerablemente menor y su disolución ocurre de forma más gradual, generando concentraciones efectivas de este elemento más bajas durante el crecimiento bacteriano. Estas diferencias en la disponibilidad iónica determinan distintos niveles de exposición celular al Zn, lo que puede modificar la intensidad del estrés metálico sobre las bacterias (Siddiqi *et al.*, 2018; de Francisco *et al.*, 2024). En el caso particular de bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum* spp, se ha demostrado que estas poseen mecanismos fisiológicos y moleculares de tolerancia a metales que les permiten sobrevivir en ambientes con disponibilidad variable de micronutrientes. Estos incluyen barreras de exclusión iónica, bombas de eflujo, producción de exopolisacáridos que se unen a metales y sistemas antioxidantes que mitiguen el estrés por especies reactivas (Bruins *et al.*, 2000; Nies, 2003; Kaushal y Pati, 2025). Estudios recientes indican que cepas del género *Azospirillum* poseen la capacidad de tolerar concentraciones elevadas de metales y de inducir respuestas de protección en las plantas bajo condiciones de estrés metálico, lo que sugiere la presencia de mecanismos de tolerancia relativamente conservados dentro del género (Gureeva y Gureev, 2023). En este sentido, se ha observado que cepas de *A. brasilense* resistentes a metales son capaces de mantener su actividad promotora del crecimiento vegetal y, al mismo tiempo, atenuar la fitotoxicidad generada por elementos como el cromo en cultivos de leguminosas (El-Ballat *et al.*, 2023). Este tipo de tolerancia podría estar asociada a la capacidad de distintas especies del género *Azospirillum* para persistir en ambientes agrícolas, donde se aplican fertilizantes minerales o donde existen variaciones en la disponibilidad de micronutrientes (Bashan y de-

Bashan, 2010). En sistemas agrícolas, esta tolerancia podría resultar relevante para la compatibilidad entre inoculantes bacterianos basados en Az39 y estrategias de fertilización con Zn, ya que permitiría la coexistencia de la bacteria con fertilizantes micronutrientes sin comprometer su viabilidad ni su potencial para estimular procesos fisiológicos en la planta, como la producción de fitohormonas y el desarrollo del sistema radical (Cassán *et al.*, 2011). Estos antecedentes resultan consistentes con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la cepa Az39 fue capaz de persistir y mantener crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Zn bajo condiciones controladas. Asimismo, diversos estudios sobre el manejo de Zn en sistemas agrícolas destacan que la forma química del fertilizante influye significativamente en la dinámica de disponibilidad del micronutriente en el suelo y en sus efectos sobre la microbiota rizosférica y el crecimiento vegetal (Jalal *et al.*, 2023; 2024). En consecuencia, diferencias en la solubilidad y liberación de Zn entre compuestos como ZnO y ZnSO₄ pueden generar distintos niveles de exposición bacteriana al ion Zn⁺², lo que podría contribuir a explicar las variaciones observadas en el crecimiento de Az39 frente a ambas fuentes del micronutriente.

4.2 Capacidad de solubilización de compuestos de Zn

En los ensayos realizados para evaluar la capacidad de solubilización de Zn, fue posible observar que Az39 no fue capaz de crecer en el medio mínimo suplementado con ZnO. De acuerdo con el criterio metodológico utilizado, la ausencia de crecimiento bacteriano o de halos de solubilización indica que la cepa no expresaría mecanismos detectables de movilización de Zn insoluble asociados a la acidificación del medio o a la producción de compuestos quelantes, capaces de disolver minerales que contienen este micronutriente (Sharma *et al.*, 2012). Este resultado coincide con antecedentes que señalan que la solubilización bacteriana de compuestos de Zn es una capacidad relativamente específica de ciertos géneros bacterianos del suelo, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Gluconacetobacter*. En estos microorganismos, la movilización de Zn insoluble suele estar asociada a la producción de ácidos orgánicos, sideróforos y otros metabolitos de bajo peso molecular que favorecen la disolución de compuestos minerales y liberan el ion Zn⁺² a la solución del suelo (Sharma *et al.*, 2012; Kamran *et al.*, 2017). Mientras que, como se

mencionó anteriormente, la solubilización directa de micronutrientes no constituiría un rasgo funcional característico del género *Azospirillum*, la ausencia de actividad solubilizadora de Zn observada en Az39 resulta coherente con el perfil fisiológico y funcional descrito para especies del género. Diversos estudios han demostrado que la promoción del crecimiento vegetal por estas bacterias, puede traducirse en una mejora indirecta en la absorción de nutrientes minerales, incluyendo micronutrientes como el Zn, como consecuencia del aumento en la longitud y ramificación de las raíces y de la mayor exploración del volumen de suelo por parte del sistema radical (Ardakani y Mafakheri, 2011; Fukami *et al.*, 2017).

Como se discutió previamente, los resultados de crecimiento en presencia de compuestos de Zn sugieren que la interacción entre la cepa Az39 y este micronutriente se encuentra principalmente asociada a mecanismos de tolerancia frente a variaciones en su disponibilidad en el medio, más que a procesos de solubilización química de los mismos. En relación a este comportamiento, en bacterias del suelo, la tolerancia a concentraciones elevadas de Zn suele involucrar sistemas de regulación de la homeostasis metálica, entre los que se destacan transportadores de eflujo capaces de expulsar cationes metálicos desde el citoplasma hacia el exterior celular, cuando su acumulación alcanza niveles potencialmente tóxicos. Estos sistemas, como los transportadores del tipo Czc (cobalt-zinc-cadmium resistance), han sido ampliamente descritos en bacterias ambientales y desempeñan un papel central en la regulación de la concentración intracelular de metales (Nies, 2003). Igualmente, la exposición a concentraciones elevadas de Zn puede generar estrés celular debido a la interferencia del metal con proteínas y sistemas redox, lo que puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno. En respuesta a esta condición, muchas bacterias activan sistemas antioxidantes, incluyendo enzimas como superóxido dismutasa y catalasa, que permiten mitigar el daño oxidativo y preservar la funcionalidad metabólica de la célula (Lemire *et al.*, 2013). Además, en bacterias rizosféricas se ha documentado que componentes de la superficie celular, como los exopolisacáridos asociados a la formación de biofilms, pueden actuar como barreras fisicoquímicas que inmovilizan parcialmente los metales en el entorno inmediato de la célula y reducen su ingreso al citoplasma (Gadd, 2010). Si bien estos mecanismos han sido descritos principalmente en distintos géneros bacterianos del suelo, su consideración resulta pertinente para interpretar los resultados observados en la cepa Az39, dado que las especies del género *Azospirillum* habitan la rizósfera, un ambiente caracterizado

por fluctuaciones en la disponibilidad de micronutrientes metálicos. En este sentido, como ya fue mencionado anteriormente, existe un gran volumen de bibliografía sobre la capacidad de las PGPR, que indican que microorganismos como *Azospirillum* spp. pueden tolerar la presencia de metales mediante diversos mecanismos fisiológicos (Bruins *et al.*, 2000; Nies, 2003; Hasan *et al.*, 2024; Kaushal y Pati, 2025). Desde una perspectiva agronómica, esta compatibilidad microbiológica resulta relevante, ya que indica que la inoculación con la cepa Az39 podría integrarse con estrategias de fertilización con Zn sin afectar la viabilidad de la bacteria, permitiendo posteriormente que sus efectos promotores del crecimiento vegetal se expresen a nivel de la planta.

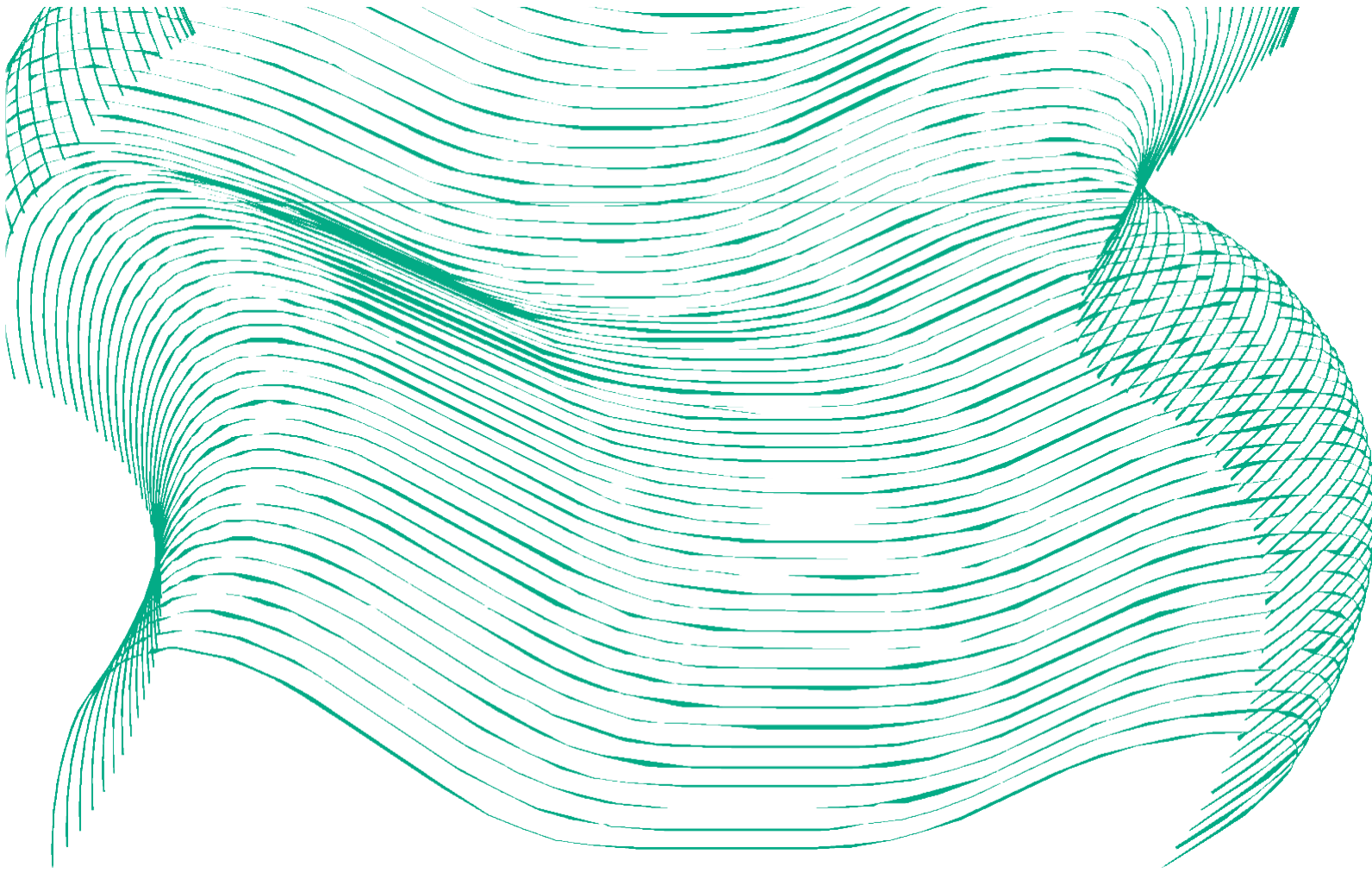
5. Conclusiones

Los ensayos de crecimiento de *Azospirillum argentinense* Az39 en presencia de distintas fuentes y concentraciones de Zn, indican que esta cepa de gran interés biotecnológico mantiene su viabilidad y capacidad de crecimiento bajo condiciones *in vitro*. Si bien se observan diferencias en cuanto a la viabilidad, la cepa es capaz de desarrollarse tanto con óxido como con sulfato de Zn. Esto indica una adecuada estabilidad fisiológica frente a ambientes con disponibilidad de este metal. La mayor inhibición registrada a concentraciones elevadas, especialmente en las fuentes más solubles, sugiere la existencia de umbrales de tolerancia vinculados a la disponibilidad iónica efectiva del micronutriente.

Por otra parte, la ausencia de halos transparentes en los ensayos de solubilización de compuestos de Zn, indica que la cepa Az39 no presenta capacidad detectable para solubilizarlos en las condiciones evaluadas. Este comportamiento resulta consistente con el perfil funcional del género bacteriano, cuya acción promotora del crecimiento vegetal se asocia principalmente a mecanismos como la producción de fitohormonas y la estimulación del desarrollo radical, más que a la movilización directa de micronutrientes.

A partir de lo expuesto, se concluye que la presencia de Zn no compromete la supervivencia bacteriana dentro de determinados rangos, lo cual respalda la compatibilidad potencial entre la inoculación con la cepa Az39 y la fertilización con este micronutriente. Esta información constituye una base experimental relevante para la interpretación de estudios

posteriores en plantas y para el diseño de estrategias combinadas de bioinoculación y nutrición mineral.



CAPÍTULO 3:

*Evaluación de la germinación y el crecimiento
de maíz en la interacción con Azospirillum
argentinense Az39 y Zn*



1. Antecedentes

El establecimiento temprano del cultivo de maíz constituye una etapa crítica para la definición del crecimiento posterior y del potencial rendimiento, ya que durante este período se determinan el vigor inicial, el desarrollo del sistema radical y la capacidad de exploración del suelo (Ritchie y Hanway, 1982; Cárcova *et al.*, 2003). La disponibilidad de nutrientes y la interacción con microorganismos benéficos desempeñan un rol central en estos procesos (Singh *et al.*, 2022; Khoso *et al.*, 2024; Wankhade *et al.*, 2025).

Entre estos factores, la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Azospirillum argentinense* Az39, ha evidenciado un impacto significativo en las etapas iniciales del cultivo, principalmente a través de la estimulación del desarrollo radical, la producción de fitohormonas y la mejora en la absorción de nutrientes (Cassán *et al.*, 2009, 2015; Bashan y de-Bashan, 2010). Como ya se mencionó anteriormente, la inoculación en distintos cultivos con bacterias del género *Azospirillum* se ha asociado con mejoras en el crecimiento vegetal y en el desarrollo del sistema radical. En maíz, la inoculación con *A. brasilense* ha mostrado incrementos cuantificables en variables morfológicas y fisiológicas, incluyendo aumentos de 16,7 % en la longitud de raíces y 30,1 % en la biomasa radical, junto con incrementos de 21,3 % en la biomasa aérea y 27,7 % en la concentración de N foliar, lo que favorece una mayor exploración del suelo y una mejora en la nutrición del cultivo. Estos cambios se traducen además en incrementos de rendimiento de grano del orden del 21,8 %, así como en una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno, permitiendo reducciones de hasta 30 kg N ha⁻¹ sin afectar el desempeño del cultivo (Condori *et al.*, 2024). En concordancia, otros estudios han evidenciado que la inoculación con *Azospirillum brasilense* mejora significativamente la morfología del sistema radical, incrementando la longitud, el volumen y el área superficial de raíces, así como parámetros fisiológicos como la fotosíntesis y la conductancia estomática, reforzando su rol en la captación de agua y nutrientes durante las etapas iniciales del desarrollo del cultivo (Marques *et al.*, 2021). Asimismo, se ha informado que la inoculación puede incrementar la absorción de N entre 10 y 40 % en gramíneas como trigo y maíz (Dobbelaere *et al.*, 2002). En un ensayo reciente en maíz, la inoculación con la cepa Az39 se asoció con mejoras en el vigor inicial y con incrementos significativos en el rendimiento de grano en ensayos a campo, con aumentos que oscilaron entre 8 % y 27 %

según la localidad y la modalidad de inoculación (tratamiento de semilla o aplicación foliar) (González Hernández *et al.*, 2024).

Por su parte, el Zn constituye un micronutriente esencial durante la germinación y el crecimiento temprano, ya que interviene en la síntesis de auxinas, la activación de enzimas antioxidantes y la regulación del metabolismo celular (Marschner, 2011; Suganya *et al.*, 2020). La deficiencia de este micronutriente en las primeras etapas de crecimiento puede limitar el desarrollo inicial del cultivo, aun cuando los síntomas visuales no sean evidentes (Alloway, 2008; Sadeghzadeh, 2013; Matiello *et al.*, 2015). Así, la combinación de la cepa Az39 con diferentes fuentes de Zn representa una estrategia de interés para potenciar el crecimiento temprano del maíz. El estudio integrado de la interacción Az39-Zn-maíz permitiría analizar posibles efectos sinérgicos sobre la germinación, el desarrollo radical y la acumulación inicial de biomasa, contribuyendo a optimizar el establecimiento del cultivo. De allí surge la necesidad de plantear los objetivos que se mencionan a continuación.

2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la suplementación con Zn sobre la germinación de semillas de maíz, con el propósito de identificar posibles interacciones durante las etapas de crecimiento tempranas del cultivo.
- Determinar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la fertilización con Zn sobre el crecimiento y el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas de maíz bajo condiciones controladas, con el fin de caracterizar las respuestas morfofisiológicas asociadas al tratamiento combinado.

3. Metodología

3.1 Material vegetal

Se trabajó con semillas de maíz (*Zea mays* L.), pertenecientes al híbrido BREVANT NEXT 22.6 PW. Este se caracteriza por presentar tolerancia a herbicidas como glifosato,

glufosinato de amonio, Galant Max y Enlist Colex-D, lo que brinda una amplia flexibilidad en el manejo de malezas. Su madurez relativa es de 122, lo que lo posiciona dentro de los híbridos de ciclo intermedio. Se caracteriza por presentar un buen comportamiento productivo, con vigor inicial elevado y un perfil sanitario favorable frente a las principales enfermedades foliares y bacterianas. Además, presenta adecuada estabilidad agronómica en cuanto a porte, inserción de espiga y resistencia al vuelco (Brevant Semillas, s. f.).

3.2 Desinfección de semillas y aplicación de tratamientos

Las semillas se desinfectaron superficialmente, mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % (3 mL de hipoclorito de sodio en 97 mL de agua destilada) durante 10 minutos, y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril (Vincent, 1970). Para la aplicación de los tratamientos, se prepararon soluciones de óxido de Zn y sulfato de Zn en agua destilada, a partir del valor de referencia de 80 mg de Zn en 200 mL para 60.000 semillas (Comunicación personal, Cerliani, 2020). Las semillas se sumergieron en las respectivas soluciones y mantuvieron en agitación durante 30 minutos empleando un agitador magnético. En el caso de los tratamientos sin Zn (Control y Az39) se empleó agua destilada en igual volumen y condiciones. Finalizado el tratamiento, las semillas se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la inoculación bacteriana en los tratamientos correspondientes (se detallarán posteriormente), cuyo inóculo se preparó como fue descrito en el Capítulo 2 (punto 3.1). Para la inoculación, las semillas se colocaron en bolsas de polietileno junto con el volumen correspondiente de inóculo ($9 \text{ mL kg semilla}^{-1}$ o $3,3 \mu\text{L}$ por semilla; 10^7 UFC mL^{-1}) y, en los tratamientos sin inoculación con igual volumen de agua destilada. En todos los casos, las semillas se sometieron a agitación manual durante 10 minutos, para asegurar una distribución homogénea de la bacteria o agua, según correspondió (Fig. 12).

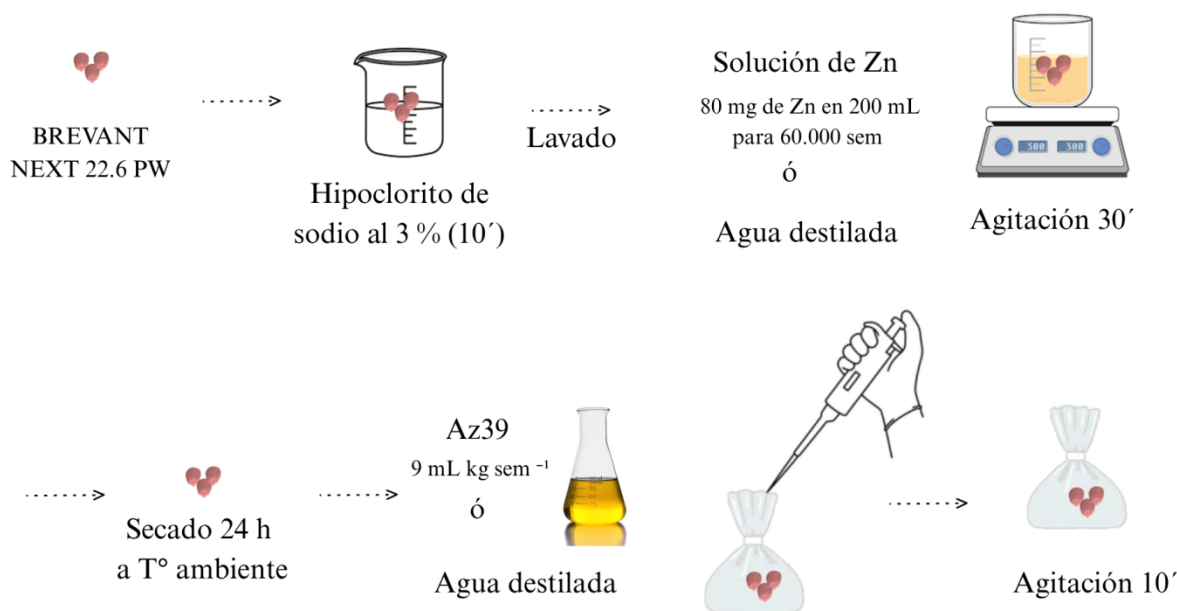


Figura 12 Esquema general del diseño experimental empleado para desinfección de semillas y aplicación de los diferentes tratamientos.

3.3 Diseño experimental

Los experimentos de germinación y crecimiento temprano se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2×3 , donde los factores evaluados fueron: inoculación bacteriana (sin inocular y con *Azospirillum argentinense* Az39) y fertilización con Zn (sin Zn, ZnO y ZnSO_4). De la combinación de ambos factores se obtuvieron seis tratamientos, que se describen y detallan a continuación:

C: Plantas de semillas sin agregado de Zn y sin inocular (control)

Az39: Plantas de semillas inoculadas con la cepa Az39

ZnO: Plantas de semillas impregnadas con ZnO

ZnSO_4 : Plantas de semillas impregnadas con ZnSO_4

ZnO+Az39: Plantas de semillas inoculadas con la cepa Az39 e impregnadas con ZnO

ZnSO₄+Az39: Plantas de semillas inoculadas con la cepa Az39 e impregnadas con ZnSO₄

Previo a estas experiencias se determinó la supervivencia bacteriana en las semillas de maíz, como se detalla a continuación.

3.4 Supervivencia de la cepa Az39 en semillas de maíz

La determinación se llevó a cabo en semillas de maíz correspondientes a distintos tratamientos, incluyendo tanto semillas sin agregado de Zn (control) como semillas tratadas con este micronutriente. Para su preparación se siguió el protocolo general descrito en la Sección 3.2, considerando únicamente la etapa de tratamiento con soluciones de Zn en aquellos casos en que correspondió; mientras que, la inoculación bacteriana se realizó de acuerdo con el procedimiento específico detallado a continuación (Fig. 13). Se emplearon 20 semillas por tratamiento, definidos como:

C: semillas sin Zn y sin inoculación

ZnO+Az39: semillas impregnadas con ZnO e inoculadas con Az39

ZnSO₄+Az39: semillas impregnadas con ZnSO₄ e inoculadas con Az39

Para la inoculación, las semillas fueron suspendidas en una solución estéril de sacarosa al 20% y sometidas a agitación manual durante 10 min (Tittabutra *et al.*, 2007). Posteriormente, se transfirieron a un cultivo líquido de la cepa Az39 (50 mL, 24 h de incubación), preparado según lo descrito en el Capítulo 2 (Sección 3.1), y se mantuvieron en agitación durante 30 min. Luego, las semillas se colocaron sobre una placa de vidrio con algodón y papel de filtro estéril, donde se dejaron secar bajo flujo laminar durante 30 min (Fig. 12). Para la determinación de la supervivencia bacteriana, 10 semillas de cada tratamiento se transfirieron a 10 mL de solución fisiológica estéril (NaCl al 0,9%) y se agitaron durante 10 min a fin de desprender las bacterias adheridas a la superficie. A partir de 1 mL del sobrenadante se realizaron diluciones seriadas decimales en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución fisiológica. El recuento de células viables se llevó a cabo mediante la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994), utilizando medio de cultivo NFb-Rojo Congo (Rodríguez

Cáceres, 1982), e incubando las placas a 28 °C. Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se determinaron según lo descrito por Herigstad *et al.* (2001) y de acuerdo con la metodología detallada en el Capítulo 2 (Sección 3.1). Este procedimiento se aplicó de manera uniforme a todos los tratamientos (Fig. 12). El ensayo se repitió en tres ocasiones independientes.

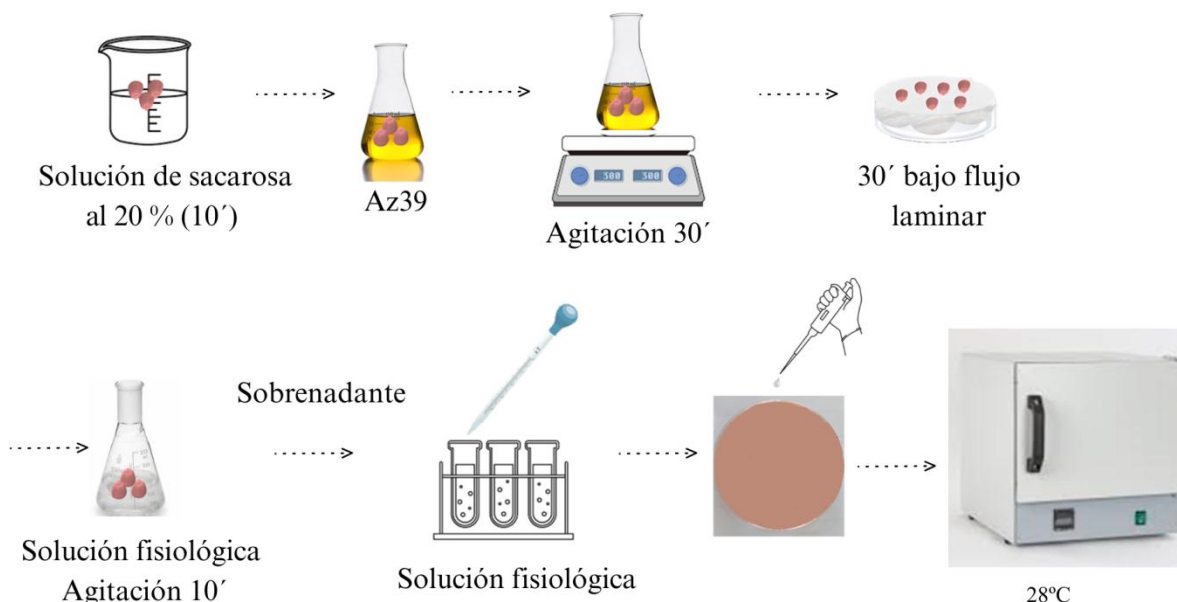


Figura 13 Esquema general del diseño experimental empleado para determinar la supervivencia de Az39 en las semillas.

3.5 Respuesta germinativa y crecimiento inicial de plántulas semillas de maíz inoculadas con *Azospirillum argentinense* Az39 y tratadas con Zn

3.5.1 Ensayo de germinación

Para la realización de los experimentos se emplearon 100 semillas por tratamiento, estas fueron desinfectadas y tratadas según metodología general previamente descrita (Sección 3.2). El diseño experimental llevado a cabo se presentó en la sección 3.3. Para la germinación, se colocaron 10 semillas sobre papel absorbente para germinación (toallas SUPREME de 22cm x 36cm, gofradas; Fig. 14a) embebido con agua destilada para el proceso

de imbibición, este se enrolló (Fig. 14b) y se colocó en bolsas de polietileno transparentes (Fig. 14c). Cada unidad experimental estuvo constituida por un rollo de papel, con un total de 10 repeticiones por tratamiento, completando así un total de 100 semillas por cada tratamiento como fue mencionado. Luego se llevó a incubar por 168 h (7 días) dentro de la cámara de germinación con condiciones controladas (16h luz, 8h oscuridad, 28 °C) (ISTA, 2019). El ensayo se repitió en tres ocasiones independientes.

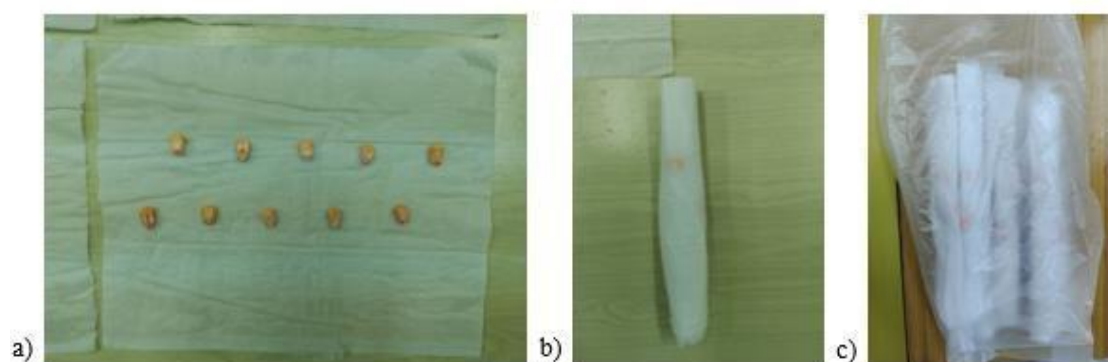


Figura 14 Metodología de germinación en papel según las Reglas Internacionales para el Análisis de Semillas (ISTA, 2019), aplicada a semillas de maíz sometidas a los distintos tratamientos experimentales. a) Disposición de las semillas sobre papel húmedo; b) armado de los rollos de germinación; c) acondicionamiento de los rollos previo a la incubación en cámara de germinación bajo condiciones controladas.

3.5.1.1 Comportamiento germinativo

Se determinó el porcentaje de germinación cada 24h, hasta las 168h y, se consideró como semilla germinada a aquella que cumplió con los siguientes requisitos: longitud del ápice radical no menor a 5 mm, presencia de raíz primaria normal y ausencia de crecimiento anormal (ISTA, 1999). Además, a las 72 h se determinó la energía germinativa (%EG) que se define como la velocidad de germinación y rapidez de las semillas para desarrollar una plántula normal al 3er día de colocadas sobre el papel de germinación en las condiciones mencionadas. A las 168 h se determinó también el poder germinativo (%PG), definido como el porcentaje de semillas que germinó y desarrolló una plántula normal al 7mo día de

incubación (ISTA, 2019).

3.5.1.2 Parámetros de crecimiento de plántulas de maíz

Transcurridas las 168 h de incubación se determinó la longitud del coleóptilo (Sixto *et al.*, 1997) y raíz primaria (Beckie *et al.*, 1990) de las plántulas. Para ello se utilizó una regla y se expresó su valor en cm.

3.5.2 Determinación del crecimiento temprano de plantas de maíz de semillas tratadas con Zn y *A. argentinense* Az39

3.5.2.1 Preparación de macetas y siembra, condiciones de crecimiento

Se comenzó llenando macetas de 800 cm³ hasta las 3/4 partes con una mezcla de tierra:perlita (1:1) no estéril. La procedencia de la tierra que se usó como soporte se obtuvo del Campo de Docencia y Experimentación (CAMDOCEX) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto “Pozo del Carril”, ubicado en las cercanías del paraje La Aguada, departamento Río Cuarto, el cual es deficiente en Zn, presentando valores de 0,73 mg kg⁻¹ (concentración menor a 1 mg kg⁻¹ determinada mediante metodología DTPA, que es el valor crítico para Zn; Barbieri *et al.*, 2017). Posteriormente, se añadieron 130 mL de agua destilada (volúmenes estandarizados en ensayos previos) y se dispusieron las semillas de maíz (tratadas como se describió previamente (Sección 3.3)) en cada maceta, cubriéndolas con la mezcla de tierra:perlita, seguida de la adición de 20 mL de agua destilada. Con el fin de asegurar una única plántula, se sembraron dos semillas por maceta (16 semillas por tratamiento, un total de 96 semillas) y, tras la emergencia, se realizó el raleo, conservando solo una. Cada maceta constituyó la unidad experimental, con 8 repeticiones biológicas (n = 8) por tratamiento. Por lo tanto, las 48 unidades finales, se colocaron de manera aleatoria en una cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas (16 h de luz a 28 °C, 8 h de oscuridad a 20 °C y 60-80 % de humedad relativa). El diseño experimental llevado a cabo se presentó en la sección 3.3 y se detalla en la Figura 15. El experimento completo se repitió en tres ensayos independientes.

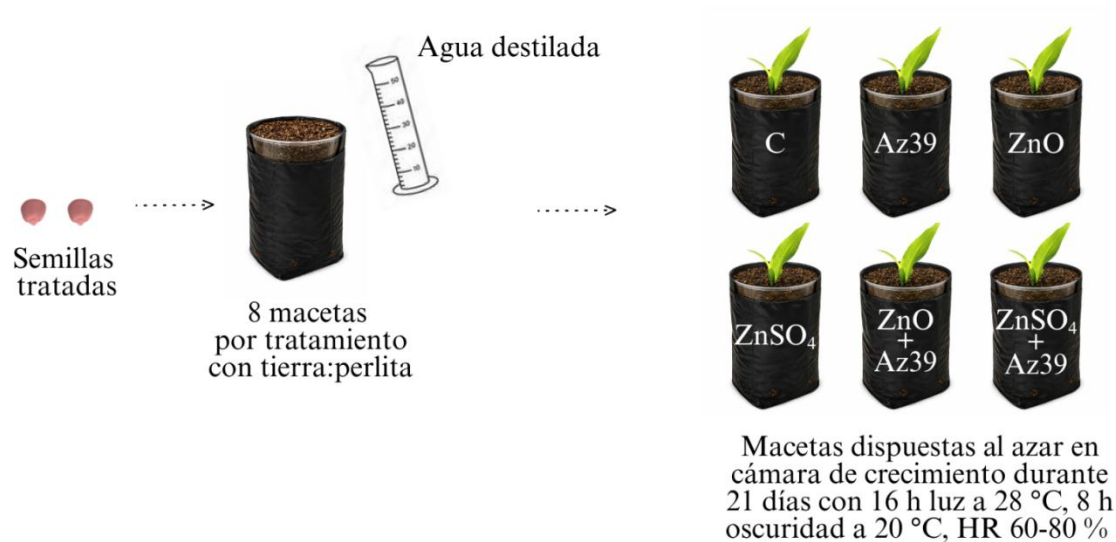


Figura 15 Esquema general del diseño experimental empleado para evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 y la fertilización con Zn en el crecimiento temprano de plantas de maíz (21 días posteriores a la siembra).

3.5.2.2 Parámetros de crecimiento de plantas de maíz

Las evaluaciones se realizaron en el estadio V3 del maíz, identificado visualmente por la presencia de tres hojas con collar visible (Ritchie y Hanway, 1982). Las variables se describen a continuación.

Altura de las plantas

Se midió con regla y se expresó en cm la longitud desde la zona del cuello (transición entre tallo y raíz) hasta el ápice de la última hoja totalmente expandida. Esto se realizó a los 7, 14 y 21 días después de la siembra (DDS).

Área foliar

Se calculó a los 21 DDS a través de medidas lineales de largo (L) y ancho (A) máximos (cm) de la tercera hoja totalmente expandida de cada planta, multiplicando los

valores por el factor de corrección (0,75), según la ecuación Área foliar (AF) = 0,75 (LxA), metodología propuesta por Oliveira *et al.* (2016).

Contenido de pigmentos fotosintéticos foliares

Esta determinación se realizó a los 21 DDS tomando una muestra de 0,1 g de peso fresco de la lámina de la tercera hoja de cada planta correspondiente a cada tratamiento, y se las colocó en tubos de ensayo con 5 mL de una solución de alcohol al 80 % (V/V), se cubrió cada tubo con su respectivo tapón de plástico y se llevaron a baño maría (80°C) 10 minutos. Luego se retiraron los tubos del baño y se esperó hasta que alcanzaran temperatura ambiente. Se empleó como muestra blanco una solución de alcohol al 80 %. Posteriormente se determinó la absorbancia a 650, 665 y 450 nm de cada muestra empleando el espectrofotómetro Spectronic genesys 2 (Thermo Scientific, EE.UU.). Los resultados se expresaron en µg de pigmentos por g de muestra. Para la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos se emplearon las fórmulas dadas por Vernon y Mac Kinney (modificada por Mac Kinney, 1938):

$$\text{Clorofila } a = (\text{Absorbancia } 665 \times 11,36) - (\text{Absorbancia } 650 \times 2,39)$$

$$\text{Clorofila } b = (\text{Absorbancia } 650 \times 20,11) - (\text{Absorbancia } 665 \times 5,18)$$

$$\text{Carotenos} = \text{Absorbancia } 450 \times 0,02$$

Longitud radical

Las plantas se cosecharon a los 21 DDS, se lavó la parte radical para eliminar restos del sustrato y se procedió a medir sus longitudes en cm empleando una regla.

Biomasa seca de parte aérea y de raíz

Luego de realizar las mediciones de longitud, las plantas se partitionaron en parte aérea y radical. Estas se colocaron en sobres de papel madera y se llevaron a estufa a

60°C, hasta peso constante para determinar la biomasa seca en gramos.

3.6 Análisis Estadístico

Los datos de porcentaje de germinación se analizaron mediante un modelo lineal generalizado mixto (GLMM), ajustado en R utilizando la función *glmer* del paquete *lme4*. Se consideró el tratamiento como efecto fijo y las repeticiones como efecto aleatorio. La variable fue modelada con distribución Poisson y función de enlace logarítmica.

Para las variables de crecimiento temprano evaluadas en plantas (altura de planta, AP), se consideró que las mediciones realizadas a los 7, 14 y 21 días después de la siembra (DDS) corresponden a mediciones repetidas sobre las mismas unidades experimentales (macetas). El análisis de la variable AP se realizó mediante un modelo lineal mixto de medidas repetidas, considerando como efectos fijos el tratamiento, el tiempo (DDS) y su interacción (tratamiento $\times$ tiempo), mientras que la unidad experimental (maceta) se incluyó como efecto aleatorio para contemplar la correlación entre mediciones sucesivas sobre la misma planta. Este enfoque permitió evaluar tanto los efectos simples como la dinámica temporal del crecimiento. Para las variables determinadas en un único momento (21 DDS), incluyendo longitud de raíz primaria (LRP), peso seco de parte aérea (PSPA), peso seco de parte radical (PSPR), área foliar (AF) y pigmentos fotosintéticos foliares (PFF), los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.

En todos los casos, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se compararon mediante la prueba de LSD de Fisher ($p < 0,05$). Las figuras se elaboraron utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2.0).

4. Resultados y Discusión

4.1 Supervivencia de la cepa *Azospirillum argentinense* Az39 en semillas

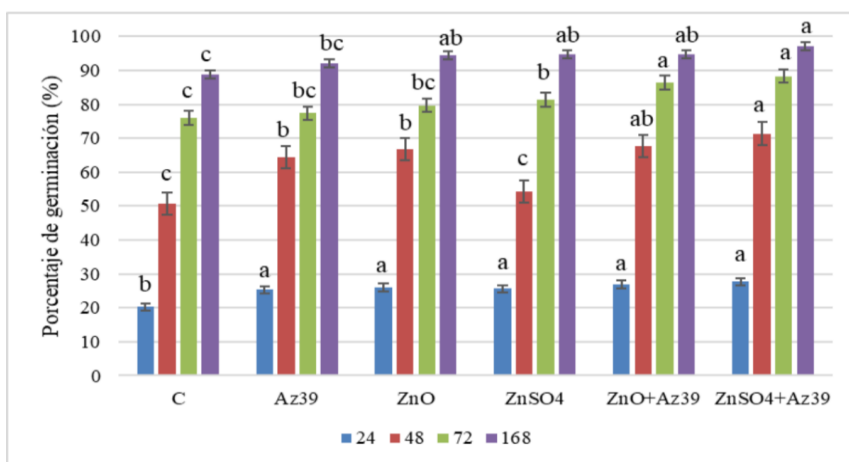
Los resultados obtenidos demostraron que la cepa Az39 fue capaz de sobrevivir luego de la inoculación de las semillas. El recuento bacteriano inicial del inóculo fue de $6,15 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, registrándose un recuento bacteriano de $2,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ a las 24 h en el tratamiento control. Asimismo, en las semillas previamente tratadas con compuestos de Zn también se observó la supervivencia de la cepa Az39. El recuento bacteriano fue de $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ en semillas tratadas con óxido de Zn y de $3,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ en aquellas tratadas con sulfato de Zn. La reducción observada de la población bacteriana en las semillas tras el proceso de inoculación y el contacto con la superficie seminal, fue esperable ya que es un fenómeno ampliamente documentado para PGPR y bacterias asociativas inoculadas en semillas (Somasegaran y Hoben, 1994; Bashan y de-Bashan, 2010; Cassán *et al.*, 2009). Estos resultados coinciden con antecedentes que muestran que, al rastrear mediante qPCR la colonización de tres cepas de *Azospirillum* (Ab-V5, Az39 y HM053 excretor de amonio) en cultivos de maíz y empleando diferentes métodos de inoculación, todas las cepas colonizaron eficientemente las raíces. Sin embargo, únicamente *A. argentinense* Az39 presentó translocación bidireccional entre raíces y brotes, lo que indica su persistencia en la planta tras la inoculación (Takahashi *et al.*, 2024). Es así que, estos resultados refuerzan la capacidad de la cepa Az39 para mantenerse viable en la superficie seminal y establecerse posteriormente en la planta, incluso en presencia de distintos tratamientos. En este sentido, la persistencia observada refuerza el concepto de que las semillas no solo actúan como estructuras de propagación vegetal, sino también como reservorios microbianos funcionales, cuya interacción con el cultivo puede favorecer su establecimiento y contribuir positivamente a las etapas iniciales del desarrollo.

4.2 Respuesta germinativa y crecimiento inicial de plántulas de maíz inoculadas con *Azospirillum argentinense* Az39 y tratadas con Zn

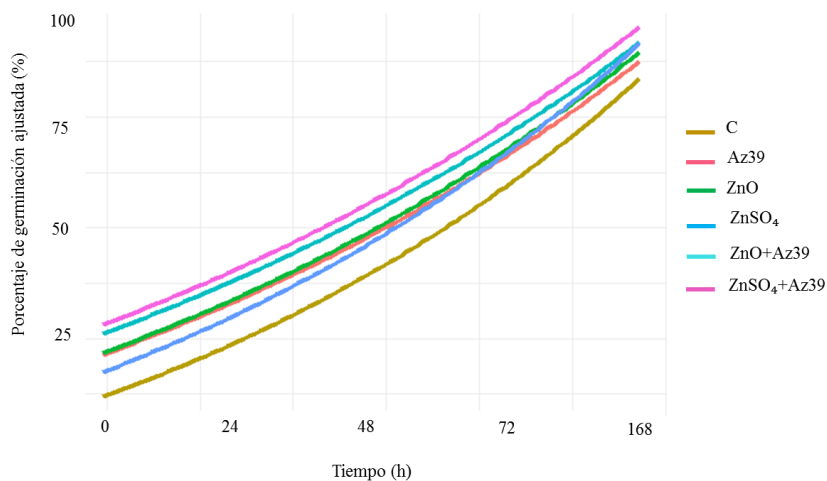
4.2.1 Comportamiento germinativo

El análisis del porcentaje de germinación de semillas de maíz evaluado a distintos tiempos (24, 48, 72 y 168 horas después de la siembra), mostró efectos diferenciales de los tratamientos aplicados, que incluyeron la inoculación de *Azospirillum argentinense* Az39, la aplicación de óxido de Zn (ZnO), sulfato de Zn (ZnSO_4) y sus combinaciones (Fig. 16a). Fue posible observar que, a las 24 h todos los tratamientos fueron estadísticamente superiores al tratamiento control (C), sin presentar diferencias entre ellos. A las 48 h el control mostró nuevamente el menor porcentaje germinativo sin diferencias significativas con el tratamiento ZnSO_4 , mientras que las combinaciones de los compuestos con Zn y Az39 registraron los mayores valores. En este sentido, ZnSO_4 +Az39 presentó incrementos alrededor del 70% en el porcentaje con respecto a control. La energía germinativa, determinada a las 72 h, presentó los valores más altos en las semillas tratadas con las combinaciones de los compuestos de Zn y la bacteriana (ZnSO_4 +Az39 y ZnO+Az39). Finalmente, el poder germinativo evaluado a las 168 h, alcanzó su máximo en el tratamiento ZnSO_4 +Az39. En esta última evaluación, todas las variantes con Zn, aplicadas solas o en combinación, presentaron porcentajes significativamente superiores al control, sin diferencias entre ellas.

En la figura 16b, se observa un incremento progresivo de la germinación con el tiempo en todos los tratamientos respecto al control. Estos resultados coinciden con lo señalado anteriormente, evidenciando que las combinaciones de Zn y la cepa Az39 superan al control a lo largo del tiempo analizado. Además, los tratamientos que incluyen Az39 y Zn alcanzaron porcentajes más altos en períodos más cortos, lo que sugiere que podrían acelerar el proceso de germinación. Hacia el final del período de evaluación, todos los tratamientos alcanzaron valores de germinación cercanos al máximo (100%).



a)



b)

Figura 16 a) Porcentaje de germinación (%) de semillas de maíz a las 24, 48, 72 y 168h. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). b) Germinación acumulada (%) ajustada en función del tiempo de incubación (h) para los distintos tratamientos. C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

4.2.2 Parámetros de crecimiento de plántulas de maíz

Los resultados obtenidos de longitud de raíz primaria y coleóptilo de las plántulas indicaron un incremento estadísticamente significativo de estos parámetros en todos los tratamientos ensayados, con respecto al control (Fig. 17 a y b).

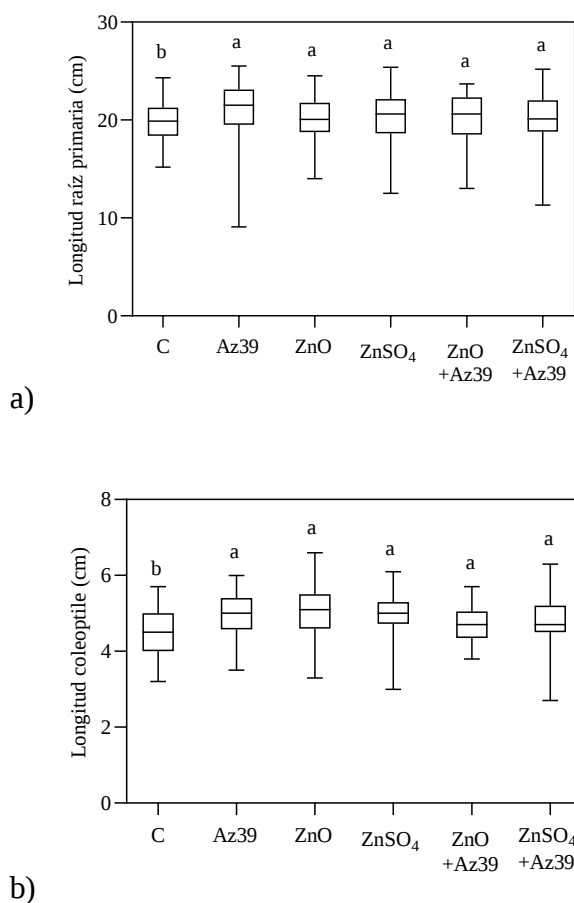


Figura 17 Longitud de raíz primaria y de b) coleóptilo de plántulas de maíz post168h de incubación. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$. C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

Los resultados obtenidos indican que la inoculación de semillas con

Azospirillum argentinense Az39 promovió la germinación temprana y el desarrollo inicial de las plantas. Este comportamiento es consistente con antecedentes que documentan el efecto positivo de *Azospirillum* spp. sobre procesos tempranos del ciclo vegetal. En este sentido, se han documentado incrementos significativos en el porcentaje de germinación de semillas tratadas con Az39 en especies ornamentales como *Lisianthus* (Santos *et al.*, 2022), así como mejoras en la germinación y el vigor de plántulas de especies arbóreas nativas tras la inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 y Ab-V6) (José *et al.*, 2024). Asimismo, se ha demostrado que *A. argentinense* Az39 incrementa el poder germinativo de semillas de *Glycine max* L. y *Zea mays* L., además de favorecer el crecimiento temprano de las plantas, consolidando su rol como PGPR asociada a cultivos de importancia agronómica (Cassán *et al.*, 2009).

Por otro lado, la aplicación de Zn, ya sea de forma individual o en combinación con Az39, también promovió una mayor germinación en comparación con el control. Este efecto puede atribuirse a que el Zn participa en procesos bioquímicos claves durante la germinación, tales como la activación de enzimas antioxidantes y la síntesis de fitohormonas como las auxinas, que regulan el desarrollo temprano de las plantas (Rehman *et al.*, 2017; Mirakhorli *et al.*, 2021). En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que el tratamiento de semillas con sulfato de Zn incrementa tanto la velocidad como el porcentaje de germinación, destacando el rol del Zn como micronutriente clave durante las etapas iniciales del desarrollo del cultivo (Lamichhane *et al.*, 2024).

Como se mencionó en este estudio, el porcentaje de germinación, la energía y el poder germinativo mostraron un aumento con la inoculación bacteriana y la aplicación de Zn, especialmente cuando se combinaron. Este efecto se tradujo en un incremento en la velocidad y uniformidad de la germinación, lo que sugiere una influencia positiva sobre el vigor de las semillas de maíz. Estos resultados son consistentes con la definición de vigor de semillas como un rasgo agronómico complejo, que además de depender de la capacidad de germinar, también lo es de la rapidez y uniformidad con que las plantas emergen (Reed *et al.*, 2022). Diversos estudios han señalado que estos parámetros son centrales para evaluar el vigor. Desde esta perspectiva, se ha demostrado que el poder de germinación y la energía germinativa constituyen indicadores rápidos y confiables del vigor en trigo, incluso cuando

son evaluados mediante metodologías avanzadas como técnicas de imágenes hiperespectrales (Zhang *et al.*, 2020). De manera complementaria, se ha identificado que parámetros asociados a la germinación y al crecimiento temprano de las plántulas, tales como la longitud del brote, el índice de vigor y la tasa de crecimiento radical, representan componentes claves del vigor en especies como sésamo y arroz (Manjeet *et al.*, 2019; Barik *et al.*, 2022).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre *Azospirillum argentinense* Az39 y el Zn no se limita a efectos aditivos, sino que respondería a la integración de mecanismos morfofisiológicos y funcionales complementarios que potencian la germinación y el crecimiento inicial del maíz. Las especies del género *Azospirillum* han sido ampliamente caracterizadas por su capacidad de promover el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, particularmente ácido indol-3-acético (IAA), así como por su influencia sobre la arquitectura radical (Cassán *et al.*, 2015). Este efecto se traduce en una mayor elongación celular y en una estimulación temprana del crecimiento de raíces y brotes, lo cual coincide con los incrementos observados en longitud de raíz primaria y coleóptilo en este estudio. Por su parte, el Zn cumple un rol central como cofactor estructural y catalítico de numerosas enzimas, participando en procesos clave como la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión génica y el control del estrés oxidativo (Alloway, 2008). Durante la germinación, estos procesos resultan críticos para la reactivación metabólica de la semilla, lo que explica los efectos positivos del Zn sobre la velocidad y el porcentaje de germinación documentados en distintos cultivos (Cakmak, 2008). Por lo tanto, la mejora en la velocidad y uniformidad de la germinación observada en los tratamientos combinados, podría explicarse por una sinergia funcional entre la señalización hormonal inducida por la cepa Az39 y la disponibilidad de Zn, que favorece tanto la activación metabólica como la protección frente al estrés oxidativo propio de las etapas iniciales. Así, se ha propuesto que la interacción entre micronutrientes y microorganismos promotores del crecimiento puede optimizar la eficiencia fisiológica de las plantas desde estadios tempranos (Vessey, 2003; Bashan y de-Bashan, 2010).

Asimismo, el mayor desarrollo radical registrado en los tratamientos combinados adquiere relevancia desde el punto de vista agronómico, ya que una mayor longitud y exploración de la raíz en etapas tempranas se asocia con una mejor capacidad de absorción de

agua y nutrientes (Lynch, 2013). Este atributo resulta particularmente importante en condiciones productivas, donde la implantación rápida del cultivo influye directamente sobre su establecimiento y competitividad. En este contexto, la aceleración y sincronización de la germinación, junto con el incremento en el crecimiento inicial, constituyen rasgos funcionales estrechamente vinculados al éxito del cultivo en campo. Diversos estudios han señalado que una emergencia rápida y uniforme se relaciona con una mayor eficiencia en el uso de recursos y una mayor estabilidad del rendimiento (Finch-Savage y Bassel, 2016). Así, la combinación de la cepa Az39 y Zn podría representar una estrategia promisorio para mejorar la implantación del cultivo de maíz, especialmente en ambientes con limitaciones nutricionales o condiciones subóptimas durante las primeras etapas del desarrollo.

4.3 Determinación del crecimiento temprano en plantas de maíz a partir de semillas tratadas con Zn y A. argentinense Az39

Los resultados obtenidos de los ensayos tendientes a analizar el efecto de la aplicación de Az39 y Zn en el crecimiento temprano de plantas de maíz se presentan en la Tabla 5. El número total de observaciones, $n = 144$, las cuales resultan de la combinación de los 6 tratamientos, 8 repeticiones biológicas y 3 repeticiones independientes del ensayo.

4.3.1 Parámetros de crecimiento aéreo

Los resultados obtenidos de la variable altura de las plantas (AP) determinadas indicaron que si bien a los 7 DDS no se observaron diferencias entre los tratamientos (Fig. 18a), a los 14 y 21 DDS sí fue posible observar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$) (Tabla 5). A los 14 DDS todos los tratamientos aplicados generaron incrementos en la altura con respecto al control (37,26 cm). Fue interesante observar que, las plantas con el tratamiento combinado ZnO+Az39 obtuvieron la mayor altura promedio (43,12 cm), seguido por aquellas del tratamiento con Az39 (42,80 cm) y ZnSO₄+Az39 (42,35 cm) (Fig. 18b). En cuanto a los 21 DDS las diferencias entre tratamientos persistieron, aunque menos marcadas que a los 14 DDS. Las plantas de los tratamientos ZnO+Az39, ZnSO₄+Az39, ZnO y Az39 mostraron un incremento de la altura (53,36; 52,65; 52,56; 52,51 cm, respectivamente) con respecto a los tratamientos control (50,94 cm) y ZnSO₄

(50,84 cm) (Fig. 18c). Así, la altura de la planta mostró una respuesta positiva y significativa a los tratamientos a partir del día 14 DDS, momento en que se evidenció un claro efecto promotor del crecimiento medido en esta variable. La inoculación con la cepa Az39, sola o en combinación con Zn, fue el tratamiento más efectivo para estimular el crecimiento en altura.

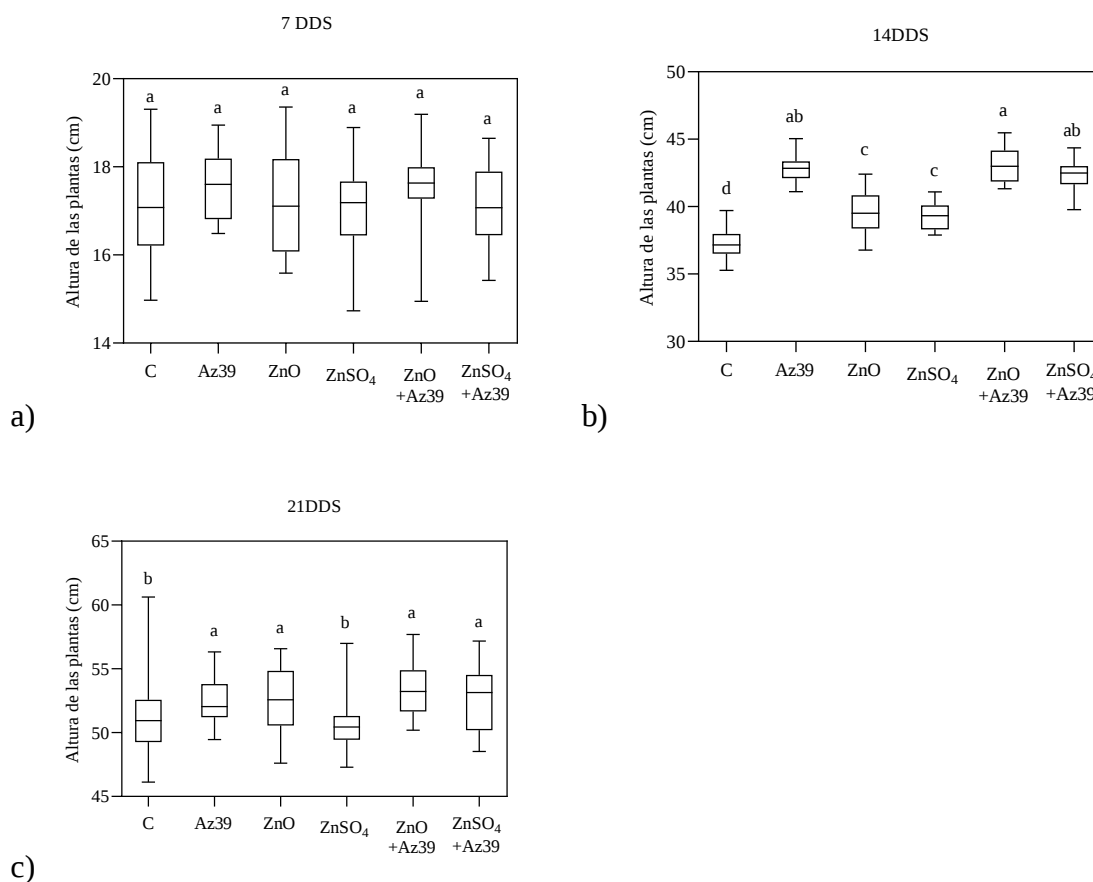


Figura 18 Altura de las plantas (cm) a los 7 (a), 14 (b) y 21 (c) días después de la siembra (DDS). Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

Tabla 5 Parámetros del análisis de varianza (ANOVA) para las variables de crecimiento temprano y contenido de pigmentos fotosintéticos foliares en plantas de maíz (21DDS)

Variable	N	R ²	R ² ajustado	CV (%)	p-valor (modelo)	F (modelo)	DMS (LSD)	Error (CM)
AP 7 DDS	144	0,04	0,01	5,71	0,3182	1,19	0,563	0,974
AP 14 DDS	144	0,79	0,78	2,83	<0,0001	101,05	0,657	1,328
AP 21 DDS	144	0,13	0,1	4,62	0,0012	4,29	1,374	5,796
LRP	144	0,83	0,83	4,82	<0,0001	135,93	1,423	6,223
SPR	144	0,81	0,8	11,01	<0,0001	118,84	0,030	0,003
PSPA	144	0,17	0,14	12,33	0,0001	5,73	0,022	0,002
AF	144	0,06	0,03	7,78	0,1184	1,81	1,569	7,561
Clorofila <i>a</i>	144	0,89	0,89	6,3	<0,0001	235,24	0,163	0,082
Clorofila <i>b</i>	144	0,74	0,74	14,19	<0,0001	80,33	0,127	0,05
Carotenos	144	0,68	0,66	12,57	<0,0001	57,64	0,0006	0,00001

AP: Altura de las plantas; DDS: Días después de la siembra; LRP: Longitud raíz primaria; PSPR: Peso seco parte radical;

PSPA: Peso seco parte aérea. AF: Área foliar; d.s.: Diferencias significativas

En la determinación de área foliar (AF) el análisis estadístico arrojó un p valor de 0,1184, indicando ausencia de diferencias entre tratamientos. Sin embargo, se observaron tendencias hacia valores más altos en los tratamientos ZnO+Az39 (36,27 cm^2) y Az39 (35,66 cm^2) (Tabla 5; Fig. 19). En cuanto al peso seco de parte aérea (PSPA) se destacaron los tratamientos que incluyeron a la inoculación con Az39 (0,33 g), sola o combinada con los compuestos con Zn (ZnSO₄+Az39: 0,35 g y ZnO+Az39: 0,34 g), presentando valores estadísticamente superiores al tratamiento control (0,3 g) (Tabla 5; Fig. 20).

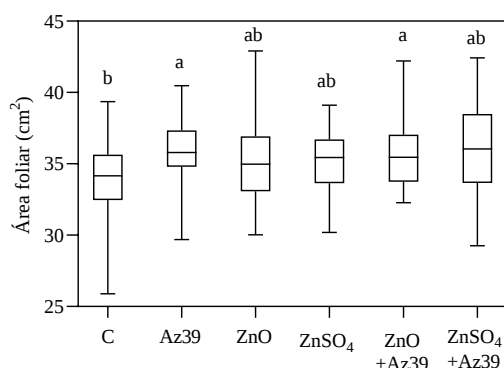


Figura 19 Área foliar (cm^2) de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

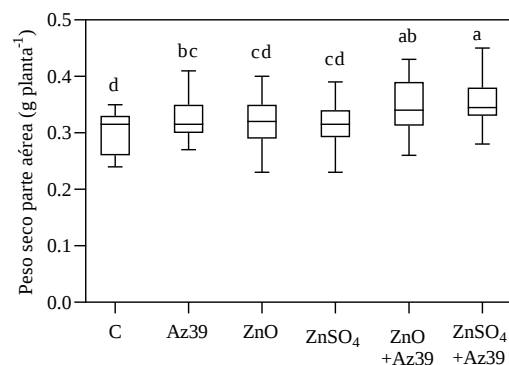


Figura 20 Peso seco (g) de parte aérea de plantas de maíz de 21 días de incubación post siembra. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

En cuanto a los pigmentos fotosintéticos foliares (PFF) los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos aplicados tuvieron efectos significativamente mayores ($p < 0,0001$; Tabla 5) sobre los niveles de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenos en plantas de maíz a los 21 DDS. Fue posible observar que todos los tratamientos fueron estadísticamente superiores al control en los resultados observados en la concentración de los tres PFF determinados (Fig. 20). En cuanto a la clorofila *a* (Fig. 21a) se observó una mayor concentración ($5,52 \mu\text{g g}^{-1}$) con el tratamiento ZnSO₄+Az39 seguido por ZnO ($5,41 \mu\text{g g}^{-1}$). De manera similar, el mayor contenido de clorofila *b* se observó en tratamientos con ZnSO₄+Az39 ($2,07 \mu\text{g g}^{-1}$), destacándose los tratamientos con Az39 ($1,73 \mu\text{g g}^{-1}$) y su combinación con ZnO ($1,83 \mu\text{g g}^{-1}$; Fig. 21b). En cuanto al contenido de carotenos el tratamiento ZnSO₄+Az39 presentó el máximo valor ($0,011 \mu\text{g g}^{-1}$; Fig. 21c). Estos resultados indican que las combinaciones de fertilización con Zn e inoculación con Az39 influyeron significativamente sobre la acumulación de PFF.

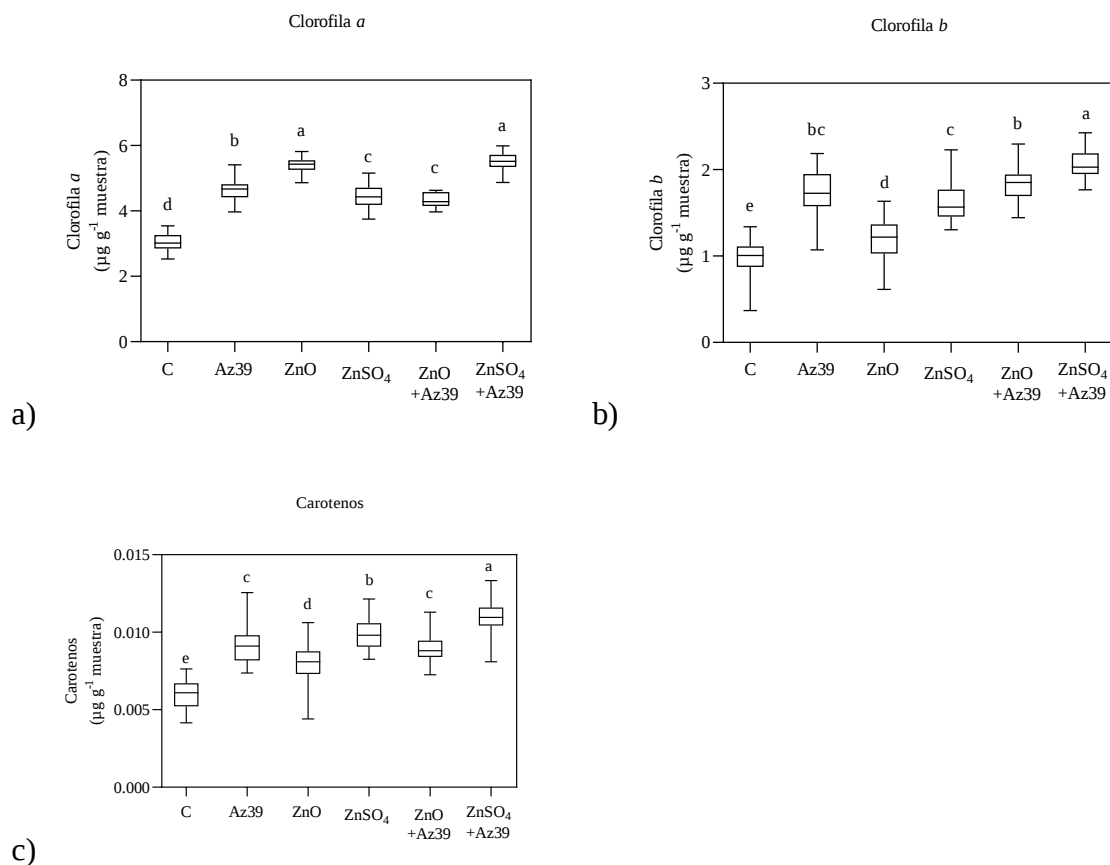


Figura 21 Contenido de los pigmentos fotosintéticos foliares ($\mu\text{g g}^{-1}$ muestra): clorofila a (a), clorofila b (b) y carotenos (c) de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

4.3.2 Parámetros de crecimiento radical

Las determinaciones de peso seco de parte radical (PSPR) y de longitud de raíz primaria (LRP) presentaron aumentos estadísticamente significativos entre tratamientos respecto al control ($p < 0,0001$) (Tabla 5) (Figs. 22 y 23, respectivamente). Los valores más altos se registraron en las combinaciones de Az39 y Zn (ZnO+Az39: 0,62 g y ZnSO₄+Az39:

0,6 g para PSPR y ZnO+Az39: 58,51 cm y ZnSO₄+Az39: 56,08 cm para LRP), seguidas por la aplicación individual de Az39 (0,56 g para PSPR y 55,63 cm para LRP), superando significativamente al control (0,34 g para PSPR y 42,87 cm para LRP).

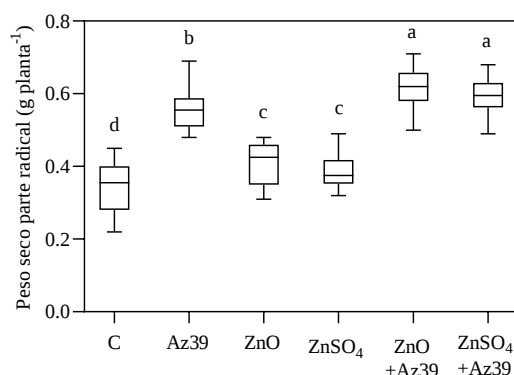


Figura 22 Peso seco (g) de parte radical de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

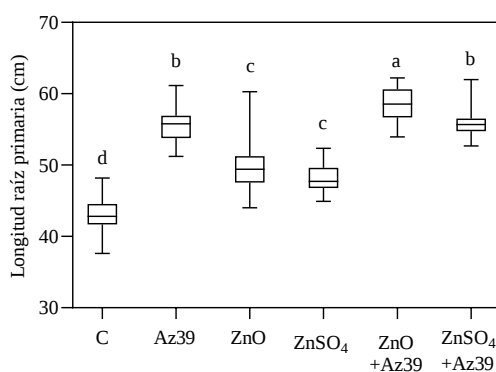


Figura 23 Longitud (cm) de raíz primaria de plantas de maíz de 21 días post siembra. Los valores corresponden a las medias $\pm$ SEM. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD de Fisher, $p < 0,05$). C: control; Az39: Inoculación con Az39; ZnO: Impregnación con ZnO; ZnSO₄: Impregnación con ZnSO₄; ZnO+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnO; ZnSO₄+Az39: Inoculación con Az39 e impregnación con ZnSO₄.

Az39 e impregnación con ZnSO₄.

4.3.3 Integración de parámetros de crecimiento temprano y respuesta morfofisiológica

Con la finalidad de integrar los resultados obtenidos para las variables de crecimiento aéreo y radical, a continuación, se presenta un análisis conjunto de los efectos de los tratamientos sobre el desarrollo temprano del cultivo, considerando tanto aspectos morfológicos como fisiológicos.

En relación con las determinaciones de la parte aérea (AP, PSPA, AF, PFF), se observó que la aplicación de tratamientos con *Azospirillum argentinense* Az39, tanto de manera individual como en combinación con fuentes de Zn (ZnO o ZnSO₄), favoreció el crecimiento temprano de las plantas de maíz. En cuanto a la AP, si bien a los 7 DDS no se registraron diferencias estadísticas entre tratamientos, a los 14 y 21 DDS se evidenciaron diferencias significativas. La ausencia de dicha diferencia en este parámetro, posiblemente se deba al escaso tiempo de interacción entre las semillas tratadas y los bioestimulantes para generar un efecto sobre esta variable. Respecto al PSPA se destacaron los tratamientos ZnO+Az39 y ZnSO₄+Az39, mientras que, en el AF se identificaron tendencias positivas en los tratamientos que incluyeron a la cepa bacteriana Az39, particularmente cuando se combinó con Zn. Estos resultados son consistentes con antecedentes que describen que la interacción entre PGPR y micronutrientes puede potenciar procesos fisiológicos asociados al crecimiento vegetal, a través de mecanismos como la producción de fitohormonas (especialmente auxinas), la mejora en la absorción y uso de nutrientes y una mayor eficiencia del Zn en sistemas enzimáticos clave para el metabolismo vegetal (Housh *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022). En particular, estos efectos benéficos han sido ampliamente documentados para especies del género *Azospirillum*, cuya acción promotora del crecimiento no se limita exclusivamente a la síntesis de auxinas. En esa línea, se ha demostrado que la interacción de *Azospirillum brasilense* con plantas de maíz activa rutas de señalización independientes del ácido indol acético (AIA), modulando la expresión de genes vinculados al estrés, al transporte de auxinas y al control del ciclo celular, incluso en presencia de inhibidores de auxina, lo que evidencia una acción multifactorial del inoculante en la promoción del crecimiento vegetal (Espindula *et al.*, 2023).

Asimismo, al evaluar la aplicación de diferentes dosis de *Azospirillum brasilense* en distintas etapas del crecimiento de la caña de azúcar, se observaron respuestas dependientes del momento de inoculación y del estadio fenológico de la planta, con efectos más marcados a partir de la segunda semana de desarrollo. Esto sugiere que la contribución de *Azospirillum* al crecimiento vegetal puede variar temporalmente y estar asociada a la activación progresiva de procesos fisiológicos y metabólicos específicos (Scudeletti *et al.*, 2023).

Desde el punto de vista fisiológico, las determinaciones de PFF evidenciaron incrementos en los tres pigmentos evaluados tras la aplicación de Zn y de Az39, tanto de forma individual como combinada. Investigaciones previas han documentado aumentos en el índice de clorofila en plantas de maíz cuando el Zn y *Azospirillum brasilense* se aplicaron por separado, sin efectos adicionales bajo su aplicación conjunta (Silva *et al.*, 2022). En contraste, los hallazgos del presente estudio sugieren que la interacción específica entre la cepa Az39 y el Zn promueve una mayor síntesis de pigmentos fotosintéticos foliares bajo las condiciones evaluadas. Este comportamiento podría explicarse por la acción complementaria de ambos factores sobre el estado nutricional y la regulación de procesos fisiológicos vinculados a la fotosíntesis. Por un lado, el Zn actúa como cofactor enzimático esencial en la biosíntesis de clorofila y en diversas funciones metabólicas y estructurales, incluyendo la fotosíntesis, la respiración y el funcionamiento de los cloroplastos (Rehman *et al.*, 2017). Asimismo, especies del género *Azospirillum* han demostrado capacidad para estimular la absorción de nutrientes, la síntesis de fitohormonas y la actividad fotosintética (Galindo *et al.*, 2021; Chieb y Gachomo, 2023). Es así que, el aumento en los pigmentos fotosintéticos observado en este trabajo resulta coherente con estos mecanismos y sugiere que la combinación de Zn con la inoculación de *A. argentinense* Az39 contribuye a optimizar procesos relacionados con la captura y transformación de energía durante las etapas tempranas del cultivo.

En relación con las determinaciones radicales, expresadas como longitud de raíz primaria (LRP) y peso seco de la parte radical (PSPR), la aplicación combinada de Zn y *Azospirillum argentinense* Az39 evidenció el mayor efecto, registrándose los valores más elevados. Este comportamiento es consistente con antecedentes que indican que la inoculación con bacterias del género *Azospirillum*, en combinación con la fertilización con compuestos de Zn, favorece un mayor desarrollo radical en cultivos de cereales, promoviendo una

arquitectura radical más extensa y funcional (Silva *et al.*, 2022).

En línea con lo anterior, se ha informado que la inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 y Ab-V6), combinada con la aplicación de sulfato de Zn, incrementó significativamente el crecimiento radical en trigo y maíz, efecto que los autores asociaron a una mayor eficiencia en la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas (Silva *et al.*, 2022). Asimismo, se ha sugerido que el aumento en la absorción de minerales observado en plantas inoculadas con PGPR se debe, de manera indirecta, a un incremento del volumen del sistema radical, particularmente en la zona pilosa funcionalmente activa, donde se concentra la mayor capacidad de exploración del suelo y de absorción de nutrientes (Wang *et al.*, 2016). En relación al papel del Zn, existen numerosos estudios realizados a lo largo de los años, que han demostrado que la aplicación de éste en semillas logró mejorar su viabilidad, vigor y la salud general de las plantas, lo que se traduce en mayores rendimientos, especialmente en suelos con deficiencia de este micronutriente (Rengel y Graham, 1995; Yilmaz *et al.*, 1998; Rengel, 2002; Cakmak, 2008). Además, el Zn desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estabilidad estructural de las membranas celulares frente a diversos factores de estrés (Marschner y Marschner, 2012). Es así que, estos antecedentes permiten contextualizar los resultados obtenidos en este trabajo, reforzando la interpretación de que la combinación de Zn y la cepa Az39 contribuye a promover un sistema radical más desarrollado y funcional, lo cual constituye una base clave para una mayor eficiencia en la captación de recursos en etapas tempranas del cultivo. La interacción entre Az39 y el Zn contribuiría a generar condiciones favorables para el crecimiento inicial de la planta, probablemente mediante la complementariedad entre la estimulación fisiológica inducida por *Azospirillum* y el rol del Zn en procesos metabólicos claves vinculados a la fotosíntesis y la nutrición vegetal (Hafeez *et al.*, 2013; Rehman *et al.*, 2017). Sobre esta base, el desarrollo del sistema radical adquiere un rol central, ya que constituye el principal soporte para la captación de agua y nutrientes que sustenta dichos procesos, en línea con lo documentado para la relación entre arquitectura radical y eficiencia en la adquisición de recursos (Lynch, 2007; Cassán *et al.*, 2020). En tanto que, la magnitud de la respuesta en el sistema radical, con incrementos de hasta ~36% en longitud de raíz primaria (58,51 cm en ZnO+Az39 vs. 42,87 cm en el control) y ~80% en biomasa radical (0,62 g vs. 0,34 g), demuestra que la interacción Az39 y Zn tiene un fuerte impacto sobre la arquitectura y funcionalidad del sistema radical. Este aspecto resulta clave,

ya que se ha demostrado que un mayor desarrollo radical temprano mejora la adquisición de recursos y condiciona positivamente el crecimiento aéreo posterior (Koevoets *et al.*, 2016). Además, las PGPR como *Azospirillum* pueden aumentar la densidad de pelos radicales y la superficie de absorción, mientras que el Zn contribuye a mantener la integridad de las membranas y la actividad de transportadores iónicos (Grover *et al.*, 2020; Housh *et al.*, 2021; Alzate Zuluaga *et al.*, 2024).

Un aspecto particularmente relevante es la dinámica temporal de la respuesta, donde los efectos más marcados se observan a partir de los 14 DDS. Este patrón sugiere que la interacción entre Az39 y Zn no se limita a la fase de germinación, sino que se fortalece progresivamente a medida que la planta desarrolla su aparato fotosintético y su sistema radical, en concordancia con lo documentado para bioinsumos cuyo impacto depende de la colonización efectiva de la rizósfera y de la activación metabólica de la planta (Backer *et al.*, 2018). Es así que, la respuesta observada pone de manifiesto la importancia de considerar de manera integrada los cambios en el crecimiento aéreo, la actividad fotosintética y el desarrollo radical durante las etapas tempranas. La convergencia de estos procesos sugiere una mejora en la eficiencia funcional del cultivo, particularmente en lo que respecta a la captación y utilización de recursos, aspectos clave para el desempeño inicial. En sistemas productivos de maíz, donde el vigor inicial y el desarrollo temprano del cultivo condicionan fuertemente la expresión del rendimiento, este tipo de respuestas ha sido asociado con mejoras en la eficiencia en el uso de recursos y en la estabilidad productiva entre ambientes (Vacheron *et al.*, 2013; Bashan y de-Bashan, 2010). En este contexto, los resultados obtenidos permiten proponer que la co-aplicación de *A. argentinense* Az39 y Zn, además de generar mejoras en variables de crecimiento aisladas, promueve una reconfiguración funcional del cultivo en etapas tempranas, que integrarían procesos hormonales, nutricionales y fotosintéticos. Esta sinergia posiciona a esta estrategia como una herramienta biotecnológica de alto potencial para favorecer la fase de establecimiento del maíz y mejorar su desempeño en condiciones productivas reales.

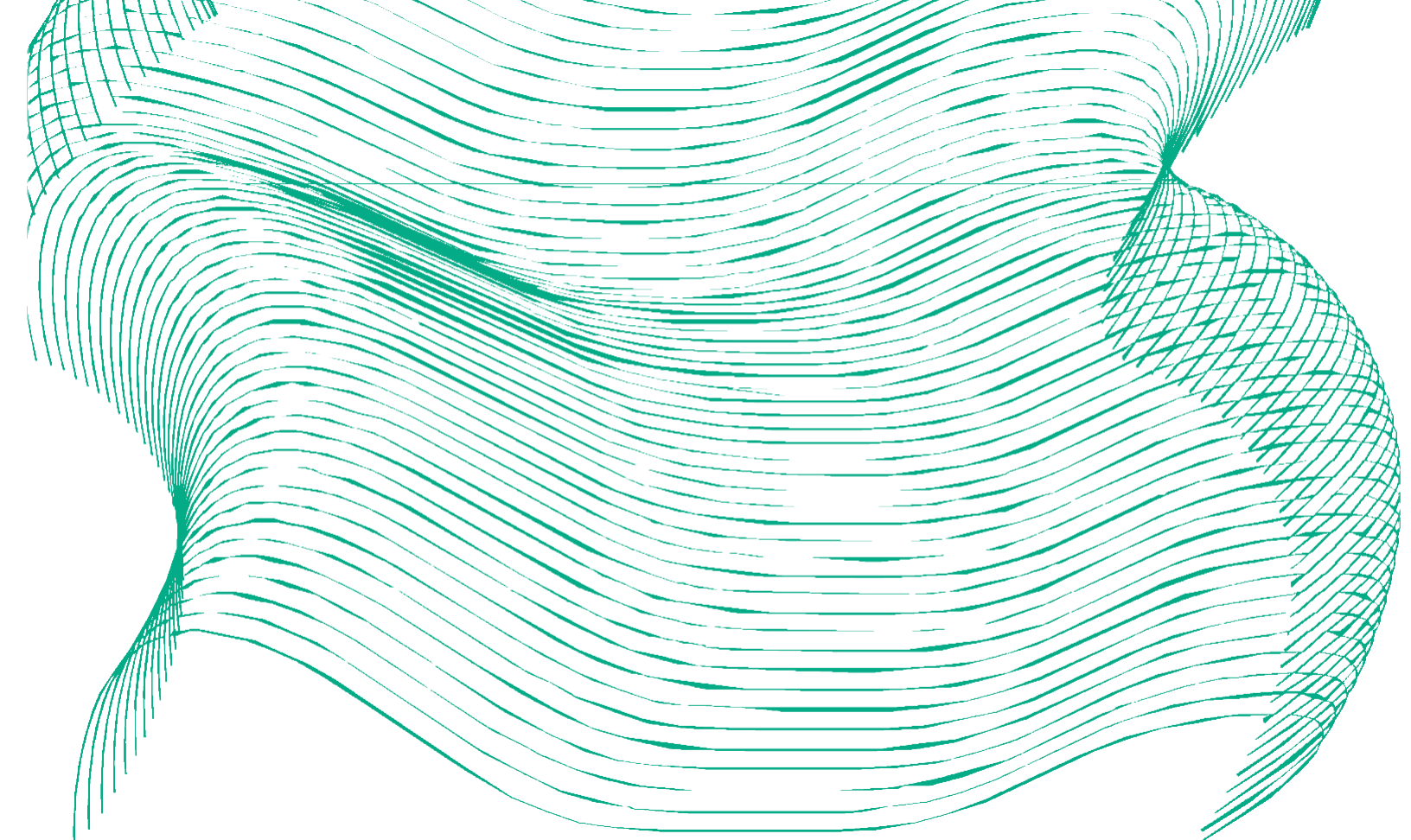
5. Conclusiones

Los ensayos de inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 y la fertilización con Zn, aplicados a nivel de semilla de manera individual y conjunta, evidencian un claro efecto positivo sobre el establecimiento temprano del cultivo de maíz bajo condiciones controladas. La viabilidad de la cepa Az39 sobre la superficie seminal tratada con compuestos de Zn confirma la compatibilidad técnica entre ambos tratamientos, respaldando su uso combinado en estrategias de tratamiento de semillas. Asimismo, los resultados de germinación permiten establecer que tanto la inoculación bacteriana como la provisión de Zn, especialmente cuando se implementan en conjunto, constituyen una herramienta eficaz para favorecer la implantación del cultivo, promoviendo una germinación más rápida y uniforme. Este comportamiento refleja una acción complementaria entre ambos factores, donde la regulación hormonal y la estimulación del crecimiento inducidas por Az39 se integran con el rol del Zn en la activación metabólica y la protección frente a condiciones adversas, contribuyendo a un mayor vigor inicial de las plántulas. Además, la evaluación del cultivo hasta el estadio V3 demuestra que la inoculación con la cepa Az39, tanto por sí sola como en interacción con Zn, promueve el crecimiento temprano del maíz y consolida un establecimiento más vigoroso. Este se caracteriza por un mayor desarrollo aéreo y radical, una mayor acumulación de biomasa y una mejora en el estado fotosintético. En este contexto, la incorporación de Zn potencia la respuesta del cultivo, evidenciando una interacción funcional entre la nutrición mineral y la acción de las PGPR. Por lo tanto, la integración de estos efectos adquiere especial relevancia desde una perspectiva agronómica, ya que configura un fenotipo más eficiente en la captura y uso de recursos. Esto se traduce en una mejor implantación del cultivo y en una mayor capacidad de respuesta frente a condiciones subóptimas, como déficits hídricos o baja disponibilidad de nutrientes.

Así, la evidencia generada indica que la interacción entre la cepa Az39 y el Zn constituye una estrategia integrada de alto valor, basada en mecanismos morfofisiológicos complementarios que promueven una respuesta coordinada del cultivo durante las etapas iniciales. En este sentido, la co-aplicación de *A. argentinense* Az39 y Zn se posiciona como una alternativa biotecnológica promisorio para fortalecer la implantación del maíz en sistemas productivos. La validación de estos resultados en condiciones de campo permitirá consolidar el alcance de

estos efectos sobre el rendimiento y la nutrición del cultivo, aspectos que serán abordados en el capítulo siguiente.

.

An abstract graphic at the top of the page consists of numerous thin, wavy green lines that flow from the top left towards the bottom right, creating a sense of movement and depth. The lines are more densely packed in some areas, forming a grid-like pattern, while in others they are more spread out.

CAPÍTULO 4:

Maíz, Azospirillum argentinense Az39 y Zn bajo condiciones reales de cultivo: impacto agronómico y nutricional

—

1. Antecedentes

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel global debido a su elevada producción, versatilidad de empleo y su papel central en los sistemas alimentarios, y el desarrollo económico mundial (Erenstein *et al.*, 2022; MAGyP, 2025a). Su grano constituye un componente fundamental de la dieta humana en muchas regiones, aportando energía, proteínas y compuestos bioactivos, y también forma parte de numerosos productos alimentarios y cadenas de valor industriales (Kihara *et al.*, 2024). Además, el maíz no solo provee macronutrientes, sino que es fuente de micronutrientes y antioxidantes que contribuyen a la calidad nutricional de los alimentos, lo que enfatiza su importancia en la dieta humana y la nutrición global (Palacios-Rojas *et al.*, 2020).

Entre los micronutrientes, el Zn cumple un rol esencial en el desempeño fisiológico del cultivo y en la calidad del grano. Sin embargo, su disponibilidad limitada continúa siendo una restricción frecuente en diversos sistemas productivos (Alloway, 2008; Cakmak y Kutman, 2018). En maíz, una adecuada provisión de este micronutriente durante etapas avanzadas del ciclo del cultivo resulta particularmente relevante para sostener la actividad fotosintética y los procesos asociados al llenado de granos (Liu *et al.*, 2019; Kihara *et al.*, 2024). Sin embargo, si bien la fertilización mineral ha sido la estrategia predominante para corregir deficiencias de Zn, su aplicación intensiva plantea interrogantes en términos de eficiencia y sustentabilidad. Frente a este escenario, la incorporación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal se posiciona como una herramienta complementaria para optimizar el aprovechamiento de nutrientes y contribuir a sistemas de producción más eficientes (Praharaj *et al.*, 2021; Francioli *et al.*, 2025).

En este sentido, *Azospirillum argentinense* Az39, por su capacidad para estimular el crecimiento, favorecer la absorción de nutrientes y mejorar procesos fisiológicos clave (Cassán *et al.*, 2015; González Hernández *et al.*, 2024), representa una herramienta biológica de alto potencial para acompañar la fertilización con Zn en el cultivo de maíz. El análisis de esta interacción en etapas avanzadas del ciclo del cultivo permite evaluar su impacto sobre el rendimiento y la calidad nutricional del grano, aportando información relevante para el desarrollo de estrategias productivas más eficientes y sustentables. En función de ello, se plantea un abordaje a escala real del cultivo, con el siguiente objetivo específico.

2. Objetivo específico

- Investigar el efecto de la inoculación con *A. argentinense* Az39 y la fertilización con Zn sobre los componentes del rendimiento y la calidad nutricional del grano de maíz en condiciones de campo, con el propósito de estimar el impacto agronómico y nutricional del uso combinado de ambos tratamientos.

3. Metodología

3.1 Descripción del sitio, diseño y manejo experimental

Se llevaron a cabo cuatro campañas agrícolas, de las cuales tres (2020-21, 2021-22 y 2023-24) se realizaron en diferentes lotes del Campo de Docencia y Experimentación (CAMDOCEX) de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAyV) de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) “Pozo del Carril”, ubicado en las cercanías del paraje La Aguada, departamento Río Cuarto (32° 58′ 02.89″ S; 64° 36′ 12.42″ O), Córdoba, Argentina. Por su parte, la campaña agrícola 2022-23 se realizó en el CAMDOCEX de la FAyV, UNRC, situado sobre Ruta Nacional 36, Km 601, Río Cuarto (33° 06′ S, 64° 17′ O), Córdoba, Argentina. Estos sitios fueron seleccionados en base a los análisis de suelo (muestras compuestas obtenidas de diferentes sectores de cada lote), los cuales mostraron concentraciones del micronutriente Zn inferiores al valor crítico para maíz (1 mg kg⁻¹, determinado mediante el método DTPA; Barbieri *et al.* 2017). En todos los ensayos se trabajó con el híbrido de maíz BREVANT NEXT 22.6 PWU (Madurez relativa: 122). Se realizó siembra tardía del cultivo y el ciclo se llevó a cabo bajo secano en todas las campañas. Las características de fecha y densidad de siembra de los 4 ensayos se detallan en la Tabla 6. Se utilizó una unidad experimental (parcela), representada por 7 surcos de ancho por 10 m de largo, con pasillos entre bloques de 0,7 m. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones, en bloques completamente al azar.

Tabla 6 Fecha y densidad de siembra (semillas ha⁻¹), pH, Materia orgánica (MO, g kg⁻¹), pH y contenido (mg kg⁻¹) de nutrientes disponibles en el Suelo a una profundidad de 0-20 cm, fecha y densidad de siembra por Campaña Agrícola.

Campaña	Fecha	Densidad	pH	MO	Nutrientes disponibles en el suelo			
					P	N	S	Zn
2020-21	18/12/2020	54840	6.1	17.4	15	19.7	13.3	0.83
2021-22	16/12/2021	60000	6.7	17.3	14.5	20	11.7	0.78
2022-23	29/12/2022	62000	6.5	15.6	21.7	16.9	7.3	0.81
2023-24	21/12/2023	65000	6.3	19.7	17.9	17.3	8.5	0.73

Las propiedades químicas de suelo, determinadas al momento de la siembra en los primeros 20 cm, mostraron un rango de valores de materia orgánica (MO) que osciló entre 15,6 a 19,7 g kg⁻¹, el fósforo (P) extractable (método de Bray y Kurtz 1945) entre 14,5 y 21,7 mg kg⁻¹, el Zn (método DTPA, Lindsay y Norvell 1978) entre 0,73 a 0,83 mg kg⁻¹ y el pH de 6,1 a 6,7. Estos valores de MO, P y pH se encuentran como normales para los suelos de la región donde se realizaron los ensayos de acuerdo a lo propuesto por Espósito *et al.* (2014)

Los tratamientos evaluados contemplaron la combinación de la inoculación a nivel de semilla con la cepa *Azospirillum argentinense* Az39 y la aplicación de Zn en diferentes formas. A continuación, se describen para cada campaña:

C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control)

FDA: Fertilización con fosfato di amónico

ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn

FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico

FDA+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización con fosfato di amónico;

ZnSO₄: Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ

ZnSO₄+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ

En cuanto a la implementación de los tratamientos, el inoculante bacteriano Az39 (preparado según metodología descrita en capítulo 2, punto 3.1) se aplicó en el momento de la siembra a una dosis de 9 mL (10^8 UFC mL⁻¹) por kg de semilla de maíz. Los compuestos de Zn utilizados fueron óxido de Zn, ZnO, aplicado sobre la semilla con el producto comercial YaraVita Teprosyn Zn, a una dosis de 8 mL kg semilla⁻¹, y sulfato de Zn, ZnSO₄, aplicado al voleo con el fertilizante arrancador MicroEssentials® SZ® (MESZ), a una dosis de 135 kg ha⁻¹, que además aporta nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) (Espósito *et al.*, 2014). Los fertilizantes empleados y las correspondientes dosis se detallan en la Tabla 7, indicándose tipo, grado, cantidad y momento de aplicación, lo cual fue analizado y consensuado con Ingenieros Agrónomos de la Cátedra de Cereales de la FAyV, UNRC. Para el cálculo de las dosis de fertilización se utilizó el balance de P y la correspondiente recomendación de fertilización con fosfato di amónico (FDA) y MESZ, en función de la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la demanda estimada del cultivo (Tabla 8). Además, se consideró la recomendación del modelo de Interacción entre densidad de siembra y dosis de N (mg kg^{-1}), proporcionado por la mencionada Cátedra, con el fin de ajustar la cantidad de N aplicada de acuerdo con la densidad de cultivo y las condiciones edáficas (Tabla 9).

Tabla 7 Grado, cantidad y momento de aplicación de los fertilizantes utilizados en los ensayos

Fertilizante	Grado	Cantidad	Momento de aplicación
Fosfato diamónico (FDA)	18N-46P-0K	80 kg ha ⁻¹	Línea de siembra
MicroEssentials® SZ® (MESZ)	N12-40P-0K-S10-Zn1	135 kg ha ⁻¹	Voleo a la siembra
YaraVita Teprosyn Zn	Zn 60%	8 mL kg ⁻¹ semilla	Curasemilla
Urea	46N-0P-0K	200 kg ha ⁻¹	Voleo en V6

Tabla 8 Balance de fósforo y recomendación de fertilización con FDA y MESZ

Campaña	P en suelo	P Crítico	Dosis suficiencia	Dosis Reposición	Dosis FDA	Dosis MESZ	Balance con FDA	Balance con MESZ
2020-21	15	15	0	22,4	16	22,2	-6,4	0
2021-22	14,5	15	0,5	22,4	16	22,2	-6,4	0
2022-23	21,7	15	0	22,4	16	22,2	-6,4	0
2023-24	17,9	15	0	22,4	16	22,2	-6,4	0

P: mg kg⁻¹; Dosis: mg kg⁻¹

Tabla 9 Recomendación del modelo de Interacción Nitrógeno por Densidad de Siembra.

Campaña	Densidad (semillas ha ⁻¹)	Profundidad (cm)	N-NO3 (mg kg ⁻¹)	N-NO3 (kg ha ⁻¹)	N-NO (0-60 cm)	Requerimiento (kg ha ⁻¹)	Dosis N a aplicar (kg ha ⁻¹)	Dosis Urea (kg ha ⁻¹)
2020-21	54840	0-20	19,7	51,22	93,86	126,13	32,272	70
		20-40	10,2	26,52				
		40-60	6,2	16,12				
2021-22	60000	0-20	20	52	89,18	138	48,82	106
		20-40	9,8	25,48				
		40-60	4,5	11,7				
2022-23	62000	0-20	16,9	43,94	73,84	142,6	68,76	149
		20-40	8	20,8				
		40-60	3,5	9,1				
2023-24	65000	0-20	17,3	44,98	78	149,5	71,5	155
		20-40	8,5	22,1				
		40-60	4,2	10,9				

De acuerdo con lo señalado previamente (Tabla 8), los cálculos de concentración de P se realizaron bajo el criterio de suficiencia, considerando como umbral crítico de respuesta el valor de 15 mg kg^{-1} (Echeverría y García, 2015), con el propósito de asegurar que el rendimiento del cultivo no se vea limitado por deficiencias de este elemento. Asimismo, para evitar un balance negativo de P asociado a la extracción de nutrientes durante la producción de granos, la dosis de fertilización se estimó en función de un rendimiento objetivo de 8.000 kg ha^{-1} . Considerando que la extracción promedio de P en maíz es de aproximadamente $2,8 \text{ kg}$ por tonelada de grano producido, la dosis teórica requerida sería de $22,4 \text{ kg}$ de P. Sin embargo, la dosis aplicada se vio condicionada por el sistema de fertilización de la sembradora, que deposita el fertilizante en la línea de siembra, estableciéndose un límite máximo de 80 kg ha^{-1} para evitar efectos de fitotoxicidad. Dicho riesgo se asocia principalmente al contenido de N amoniacal del FDA (18 %), que puede generar una alcalinización localizada del suelo durante la transformación del amonio a nitrato. En consecuencia, y debido a estas restricciones operativas, la dosis finalmente aplicada fue de 16 kg de P como FDA en la línea de siembra.

En el caso del fertilizante arrancador MESZ, que contiene un 12 % de N en forma amoniacal, se aplicó una dosis de 135 kg ha^{-1} , asegurando una adecuada provisión de P, N y Zn. La bibliografía señala un umbral crítico de Zn de 1 mg kg^{-1} (Barbieri *et al.*, 2017), mientras que, estudios regionales de Espósito *et al.* (2010 y 2014) recomiendan considerar dosis de Zn entre 1 y $1,5 \text{ kg ha}^{-1}$ de Zn. Con base en estos antecedentes, se estableció la dosis de MESZ a emplear, equivalente a $1,35 \text{ kg ha}^{-1}$ de Zn (Tabla 7).

En todas las campañas el maíz se sembró con soja como cultivo antecesor. El requerimiento de N del cultivo se estimó considerando el rendimiento objetivo de 8.000 kg ha^{-1} y un requerimiento aproximado de $20\text{-}25 \text{ kg}$ de N por tonelada de grano producido, valor comúnmente reportado para maíz en la literatura (Ciampitti y Vyn, 2012). En función de las densidades de plantas utilizadas en cada campaña, este requerimiento corresponde aproximadamente a $2,3 \text{ g}$ de N por planta (Espósito, comunicación personal, 2020). Teniendo en cuenta el contenido de N en suelo (a una profundidad de 0 a 60 cm, en kg ha^{-1}) y el requerimiento de N por parte del maíz, se calculó la dosis a aplicar. Al emplearse urea como fuente de este nutriente, la dosis de fertilizante se determinó en función del contenido de N de la fuente (46 % N). Si bien, en la Tabla 9 se indica que la dosis aplicada en los ensayos (200

kg ha⁻¹) fue superior a la calculada, se consideró que cubrió los requerimientos del cultivo sin provocar fitotoxicidad en las plantas.

A lo largo de las diferentes campañas experimentales algunas combinaciones de tratamientos se mantuvieron, mientras que otras fueron incorporadas progresivamente en función de los aprendizajes previos y/o para evaluar nuevas alternativas de manejo. Estas variaciones permitieron explorar distintas interacciones entre el biofertilizante (Az39) y las formas de Zn, así como identificar posibles respuestas diferenciales en el cultivo. En la Tabla 10 se detallan los tratamientos ensayados en cada campaña agrícola. Asimismo, es importante aclarar que durante la campaña 2020-21 se realizaron aplicaciones foliares de compuestos con Zn; sin embargo, dichos tratamientos debieron excluirse del análisis de la tesis por razones económicas.

Tabla 10 Tratamientos experimentales aplicados en cada campaña agrícola (2020-2024).

Tratamientos	Campañas			
	2020-21	2021-22	2022-23	2023-24
C				
FDA				
ZnO+Az				
FDA+ZnO+Az				
FDA+Az				
ZnSO ₄				
ZnSO ₄ +Az				

Nota: Las celdas sombreadas en azul indican los tratamientos que fueron realizados en cada campaña experimental.

Las determinaciones que se realizaron, en los diferentes estadios fenológicos de maíz (post siembra, V13 y madurez de cosecha y fueron las siguientes:

3.2 Post-siembra

Porcentaje de emergencia

Se evaluó desde los 5 días post-siembra, hasta la total emergencia de las plantas. Se realizó un recuento del número de plántulas emergidas en cada parcela experimental (conformada por 4 surcos), considerando como plántula emergida aquella que presentaba coleoptilo visible por encima de la superficie del suelo (Taylor *et al.*, 2014; Haque, 2024). El porcentaje de emergencia se calculó en función del número de plántulas emergidas respecto al total de semillas sembradas, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Emergencia} = \frac{\text{Numero total de plantulas emergidas}}{\text{Numero total de semillas sembradas}} \times 100$$

3.3 Estadío vegetativo V13

Área foliar

Se tomaron 4 muestras de lámina de hoja de la espiga de plantas diferentes en una misma parcela por cada tratamiento, a las cuales se les midió el largo (L) por ancho (A) (en cm, empleando una regla) multiplicado por el factor de corrección 0,75 según la siguiente ecuación (Oliveira *et al.*, 2016):

$$\text{Área foliar (AF)} = 0,75 (L \times A)$$

Contenido de N

Se determinó el contenido de N de las muestras de hojas de la espiga, según método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), realizado en el Laboratorio de Servicios de Nutrición Animal, FAyV-UNRC.

3.4 Madurez de cosecha

Se cosecharon en cada tratamiento las espigas de 5 m lineales de plantas en competencia perfecta ($n=4$), a una humedad de grano del 13%, y se determinaron las siguientes variables (Andrade *et al.*, 1999):

Número de granos por espiga

Estimación indirecta del número total de granos por espiga, realizada a partir del recuento del número de hileras por espiga y del número de granos por hilera, cuyo producto permitió obtener el valor total de granos por espiga.

Peso de granos por espiga

Se desgranó manualmente cada espiga y se pesó en balanza analítica el total de los granos de cada una, el resultado se expresó en gramos.

Peso de 1000 granos ($p1000$)

A partir de cada muestra, se contaron y pesaron 1000 granos, utilizando balanza analítica, expresando el resultado en gramos.

Rendimiento

Se determinó peso de grano por cada espiga, para luego con el dato de densidad calcular el rendimiento del cultivo, expresando el resultado en kg ha^{-1} .

Número de granos por metro cuadrado

Se estimó utilizando los valores de peso de 1000 granos y rendimiento y se expresó como n° granos m^{-2} .

Concentración de nutrientes en granos

A partir de los granos obtenidos mediante la cosecha manual en cada parcela experimental, se conformaron tres submuestras de 100 g de granos por tratamiento. Estas fueron conservadas a 4 °C y enviadas al Laboratorio “Suelo Fértil”, ubicado en Pergamino, Bs. As., donde se determinaron las concentraciones de nutrientes de acuerdo con las

metodologías empleadas por el propio laboratorio.

La concentración de nitrógeno (N) se determinó mediante el método de Kjeldahl, que incluye la digestión del material vegetal con ácido sulfúrico (H_2SO_4), seguida de destilación y valoración para cuantificar el N total. Las concentraciones de fósforo (P), azufre (S) y zinc (Zn) se obtuvieron a partir de la digestión de las muestras con una mezcla de ácido nítrico (HNO_3) y ácido perclórico (HClO_4). Posteriormente, las concentraciones de P y S se determinaron por espectrofotometría UV-visible, mientras que el Zn se cuantificó mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS).

Además, se registraron los datos de precipitaciones acontecidas durante los meses de septiembre a abril de cada campaña agrícola. Los mismos se obtuvieron del Servicio de Agrometeorología de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Las figuras se elaboraron utilizando el software Microsoft Excel® (versión 2016, Microsoft Office Professional Plus, E.E. U.U.).

3.5 Análisis estadísticos

Para el análisis comparativo de los valores de rendimiento obtenidos entre las cuatro campañas se utilizó un modelo lineal mixto (MLM), ajustado el método de Máxima Verosimilitud Restringida (REML; Restricted Maximum Likelihood), que incluyó como efectos fijos los Tratamientos, los años de campaña y su interacción, y como efecto aleatorio los bloques anidados dentro del año. Las comparaciones múltiples de medias se realizaron mediante la prueba de Di Rienzo-Guzmán-Casanoves (DGC) ($p < 0,10$) para realizar las comparaciones múltiples de las medias ($p < 0,10$). Las figuras se elaboraron utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0.2.0).

Con el propósito de explorar la estructura multivariada de los datos y reducir la dimensionalidad de las diferentes variables analizadas dentro de cada campaña agrícola en particular, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Este análisis permitió identificar los componentes que explican la mayor proporción de la variabilidad total del conjunto de variables consideradas,

facilitando la interpretación de las relaciones entre tratamientos y variables. Las figuras obtenidas de ACP se realizaron empleando el software InfoStat.

4. Resultados y Discusión

4.1 Respuesta productiva del maíz a lo largo de las campañas agrícolas

La evaluación de la producción agrícola en distintos ambientes y campañas permite comprender la estabilidad productiva y la influencia de factores climáticos sobre la respuesta de los tratamientos. La variabilidad ambiental y su interacción con el manejo o el genotipo suelen explicar gran parte de las diferencias observadas en la productividad (Gauch, 2006; Ogutu *et al.*, 2024). En cultivos extensivos como el maíz, la magnitud de estas interacciones cobra particular relevancia, ya que las variaciones en temperatura, precipitación y disponibilidad de nutrientes entre campañas pueden modificar significativamente la expresión del rendimiento y de otras variables fisiológicas y agronómicas.

En este contexto, y con el propósito de fortalecer el análisis de la interacción Ambiente $\times$ Tratamiento, se implementó un modelo lineal mixto (REML) que incorporó explícitamente el efecto de ambiente a través del factor Año y su interacción con los Tratamientos, considerando además la estructura aleatoria de bloques dentro de cada Ambiente. Este enfoque permitió reflejar de manera adecuada la variabilidad interanual y mejorar la capacidad explicativa del modelo, evidenciando un ajuste robusto.

Los resultados inferenciales del modelo se presentan en la Tabla 11, donde se observa que el efecto de Año fue estadísticamente significativo ($p < 0,0001$), evidenciando un marcado control ambiental sobre el rendimiento del cultivo. Por su parte, el efecto principal de Tratamiento no resultó significativo en forma aislada ($p = 0,0794$), aunque mostró una tendencia a la significancia. En contraste, la interacción Tratamiento $\times$ Año fue altamente significativa ($p = 0,0017$), lo que indica que la respuesta en rendimiento dependió del contexto ambiental en el que se evaluaron los tratamientos.

El análisis estadístico comparativo de las campañas mostró, además, que las medidas de ajuste del modelo presentaron un buen desempeño para explicar la variabilidad del

rendimiento. Se observaron valores elevados de R^2 marginal ($R^2_0 = 0,93$) y R^2 condicional ($R^2_1 = 0,96$), indicando que el modelo explicó el 93% de la variabilidad considerando sólo los efectos fijos y hasta el 96% al incorporar los efectos aleatorios. Asimismo, los valores de Criterio de Información de Akaike ($AIC = 842,90$) y Criterio de Información de Bayesian ($BIC = 884,06$) evidenciaron un modelo parsimonioso y bien especificado.

Tabla 11 Resultados inferenciales del modelo lineal mixto (REML) para el rendimiento de maíz: efectos de Tratamiento, Año y su interacción.

Efecto	gl	F	p-valor
Tratamiento	4, 45	2,24	0,0794
Año (Ambiente)	3, 45	98,15	<0,0001
Tratamiento $\times$ Año	12, 45	3,30	0,0017
<i>Bloques dentro de campaña considerados efecto aleatorio.</i>			

Nota: gl: grados de libertad; F: estadístico de Fisher; p-valor: nivel de significancia asociado. Los efectos corresponden a pruebas marginales (SC tipo III) del modelo lineal mixto.

En lo que respecta al análisis comparativo de los valores de rendimiento obtenidos en este trabajo, se observaron diferencias marcadas entre campañas agrícolas, con rendimientos promedio que oscilaron entre aproximadamente 1830 kg ha^{-1} (2022-23) y 9550 kg ha^{-1} (2023-24), evidenciando una fuerte influencia de las condiciones ambientales sobre la productividad. La evaluación de medias ajustadas indicó que el tratamiento MESZ+Az presentó el mayor rendimiento promedio ($\approx 6387 \text{ kg ha}^{-1}$), diferenciándose del resto de los tratamientos, aunque su superioridad se manifestó principalmente en ambientes favorables, donde alcanzó valores máximos superiores a 11000 kg ha^{-1} . En contraste, en ambientes restrictivos las diferencias entre tratamientos tendieron a disminuir, e incluso a desaparecer, como se evidenció en la campaña 2022-2023, donde no se detectaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

Este comportamiento indica que, bajo condiciones de estrés hídrico severo, la disponibilidad de agua se constituye en el principal factor limitante del rendimiento, enmascarando los efectos de la fertilización y de la inoculación. Sin embargo, es importante destacar que este patrón no es universal. En la región pampeana, se ha reportado que la brecha de rendimiento del maíz puede alcanzar valores del orden del 30 al 50% del rendimiento

potencial, y que prácticas de manejo como la fertilización balanceada con N, P, S y Zn pueden reducir dicha brecha en aproximadamente un 10 al 20%, incluso en ambientes con cierto grado de restricción (Espósito *et al.*, 2015; Espósito *et al.*, 2017; Cerliani *et al.*, 2018a; 2018b). Estas diferencias en la respuesta pueden atribuirse a la intensidad del estrés y al momento de ocurrencia del mismo dentro del ciclo del cultivo. En situaciones de restricción moderada, la mejora en la nutrición puede favorecer la exploración radical, la eficiencia en el uso del agua y la captación de recursos, permitiendo expresar incrementos de rendimiento. En cambio, bajo condiciones de estrés extremo y sostenido, como las registradas en la campaña 2022-2023, la limitación hídrica domina la respuesta del cultivo, reduciendo significativamente la capacidad de respuesta a los insumos aplicados.

En este sentido, los resultados obtenidos ponen de manifiesto un comportamiento dependiente del ambiente, lo cual resulta clave para la interpretación agronómica y la proyección de la tecnología. La respuesta positiva a la inoculación y fertilización con Zn se expresa principalmente cuando las condiciones ambientales permiten al cultivo alcanzar, al menos parcialmente, su potencial productivo. Desde el punto de vista de la escalabilidad comercial, esto implica que la adopción de estas prácticas debería priorizar situaciones con suficiente disponibilidad de agua, donde el retorno esperado es mayor, mientras que en condiciones de mayor limitación hídrica su impacto sería más acotado. En conjunto, la inclusión explícita del ambiente como factor y la evaluación de su interacción con los tratamientos permiten una interpretación más precisa y realista de los resultados, fortaleciendo la validez de las conclusiones y su aplicabilidad en distintos escenarios productivos.

Asimismo, el análisis del rendimiento del maíz a lo largo de las cuatro campañas evaluadas evidenció una marcada variabilidad interanual, asociada a las condiciones ambientales y a la respuesta diferencial de los tratamientos (Tabla 12). Esta variabilidad se reflejó no solo en los valores absolutos de rendimiento, sino también en su relación con los rendimientos promedio departamentales informados para cada campaña (MAGyP, 2025b). En las campañas 2020-2021 y 2021-2022, los rendimientos máximos registrados en los ensayos fueron levemente superiores a los promedios departamentales correspondientes. En particular, durante la campaña 2020-2021 se alcanzaron valores cercanos a 7.000 kg ha^{-1} , superando el rendimiento medio regional de 6.500 kg ha^{-1} , mientras que en la campaña 2021-2022 los

rendimientos máximos se aproximaron a 7.500 kg ha^{-1} , por encima del promedio departamental de 5.500 kg ha^{-1} . No obstante, en ambos ciclos no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, que integraron un mismo grupo estadístico (c). Estos resultados indican que, aun en ausencia de diferencias estadísticas entre tratamientos, las prácticas de manejo implementadas en los ensayos permitieron alcanzar rendimientos iguales o superiores al promedio regional, en un contexto ambiental que limitó parcialmente el potencial productivo del cultivo.

La campaña 2022-2023 se caracterizó por una marcada reducción del rendimiento, con valores comprendidos entre 1.383 y 2.356 kg ha^{-1} , sin detectarse diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (grupo estadístico d). Estos rendimientos resultaron sustancialmente inferiores al promedio departamental registrado para dicha campaña (3.900 kg ha^{-1} ; MAGyP, 2025b), lo que evidencia el fuerte condicionamiento impuesto por las condiciones ambientales, en particular por la escasez de precipitaciones ocurrida a lo largo de todo el ciclo del cultivo. En este sentido, se ha documentado que el cultivo de maíz presenta una elevada sensibilidad al déficit hídrico, con efectos especialmente críticos durante el período de floración, etapa determinante para la fecundación y el establecimiento del número final de granos (Andrade y Sadras, 2002; Irigoyen *et al.*, 2020). Bajo condiciones de disponibilidad hídrica limitada, la imposibilidad de sostener tasas de transpiración acordes a la demanda atmosférica conduce al desarrollo de estrés hídrico y a una marcada reducción del rendimiento (Wang *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2020). Asimismo, la disminución del contenido de agua en el suelo reduce la conductividad hidráulica en la interfase suelo-raíz, incrementa la resistencia al flujo de agua hacia la planta y puede inducir el cierre estomático incluso antes de que se manifiesten alteraciones hídricas a nivel interno (Affortit *et al.*, 2024). Sin embargo, en la región pampeana se han reportado incrementos en el rendimiento del cultivo de maíz asociado a la fertilización con Zn, particularmente cuando este micronutriente se aplica como fertilizante arrancador. En estos estudios se observaron respuestas del orden del 4 al 7 %, con aumentos que pueden superar los 700 kg ha^{-1} e incluso alcanzar valores cercanos a 2000 kg ha^{-1} en situaciones de deficiencia de Zn, especialmente en ambientes de loma (Michiels y Ruffo, 2012; Espósito *et al.*, 2015). Estos antecedentes ponen de manifiesto el potencial del Zn para incrementar el rendimiento del cultivo en contextos donde su disponibilidad resulta limitante, incluso en ambientes con menor oferta hídrica. En este sentido, los resultados obtenidos en la

campaña 2022-2023, caracterizada por un déficit hídrico severo y persistente, aportan evidencia sobre el comportamiento de estas prácticas bajo condiciones de alta restricción hídrica, donde no se registraron respuestas productivas diferenciales.

En contraste con las campañas previas, los resultados de la campaña 2023-2024 evidenciaron un comportamiento marcadamente diferente. En este ciclo se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, con rendimientos que oscilaron entre 7.738 y 11.217 kg ha⁻¹, superando ampliamente el rendimiento promedio departamental informado para la campaña (6.320 kg ha⁻¹; MAGyP, 2025b). Los tratamientos que incluyeron la aplicación de fertilizantes fosfatados con Zn y/o la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 presentaron los mayores valores de rendimiento. En particular, el tratamiento combinado ZnSO₄ +Az alcanzó el valor más alto (11.216,69 kg ha⁻¹), seguido por el tratamiento con ZnSO₄ solo (10.361,72 kg ha⁻¹), ambos agrupados estadísticamente dentro del grupo a. En un segundo nivel de rendimiento (grupo b) se ubicaron los tratamientos FDA+ZnO+Az y FDA, mientras que el tratamiento control presentó el menor rendimiento (7.738,80 kg ha⁻¹; grupo c).

Tabla 12 Rendimiento promedio ajustado por Tratamiento y Año de campaña (kg ha⁻¹ a 13% de humedad). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas dentro de cada año (DGC, $\alpha = 0,10$).

Tratamiento	Campaña	Rendimiento promedio	e.s.	g.e.
ZnSO ₄ +Az	2023-24	11216,69	585,97	a
ZnSO ₄	2023-24	10361,72	585,97	a
FDA+ZnO+Az	2023-24	9479,34	585,97	b
FDA	2023-24	8954,40	585,97	b
Control	2023-24	7738,80	585,97	c
FDA+ZnO+Az	2020-21	6906,55	414,34	c
Control	2020-21	6646,71	414,34	c
ZnSO ₄ +Az	2020-21	6467,24	414,34	c
FDA	2021-22	6141,60	414,34	c
FDA	2020-21	6083,22	468,05	c
ZnSO ₄ +Az	2021-22	6075,55	414,34	c
Control	2021-22	5807,43	414,34	c
ZnSO ₄	2020-21	5755,12	468,05	c
ZnSO ₄	2021-22	5556,20	414,34	c
FDA+ZnO+Az	2021-22	5337,18	414,34	c
Control	2022-23	2356,69	414,34	d
FDA	2022-23	2085,46	414,34	d
ZnSO ₄ +Az	2022-23	1786,59	414,34	d
FDA+ZnO+Az	2022-23	1543,94	414,34	d
ZnSO ₄	2022-23	1383,74	414,34	d

Nota: e.s: Error Estándar; g.e.: Grupo estadístico. Tratamientos: C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control); FDA: Fertilización con fosfato di amónico; ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn; FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico; FDA+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización con fosfato di

amónico; ZnSO_4 : Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ; $\text{ZnSO}_4 + \text{Az}$: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ.

Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de fertilizantes de Zn en combinación con inoculantes microbianos puede contribuir a potenciar el rendimiento del cultivo de maíz cuando las condiciones ambientales permiten que el cultivo exprese, al menos parcialmente, su potencial productivo. En este sentido, durante la campaña 2023-2024 las respuestas agronómicas a los tratamientos fueron más evidentes que en campañas previas, lo cual coincide con los mayores rendimientos registrados en ese ciclo productivo.

Diversos estudios han demostrado que la inoculación con cepas de *Azospirillum* en combinación con el suministro de Zn puede mejorar la eficiencia en el uso de este micronutriente y favorecer la acumulación de biomasa y el rendimiento de los cultivos. En un sistema de rotación maíz-trigo, se observaron incrementos de rendimiento del maíz de alrededor del 6 % cuando la inoculación con *A. brasilense* se combinó con la fertilización con Zn, además de mejoras en la eficiencia de uso del micronutriente (Galindo *et al.*, 2021). De manera similar, se ha observado que la inoculación bacteriana en combinación con distintas dosis de Zn puede incrementar la colonización micorrícica y el rendimiento de grano. En particular, se ha reportado que la inoculación con *Azospirillum brasilense*, junto con dosis cercanas a 4 kg Zn ha^{-1} , aumentó la colonización por hongos micorrícicos arbusculares (AMF), registrándose los valores más altos en el rango de $3,5\text{-}4,4 \text{ kg Zn ha}^{-1}$ según la condición de inoculación. Asimismo, el rendimiento de grano y sus componentes se incrementaron bajo dosis intermedias de Zn, evidenciando una relación no lineal entre este micronutriente y la respuesta del cultivo (Silva *et al.*, 2022). En concordancia con estos antecedentes, se ha demostrado que la aplicación foliar de nano-Zn en combinación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal mejora el rendimiento y la nutrición del cultivo de trigo. En particular, la inoculación con *Azospirillum brasilense* junto con 5 kg Zn ha^{-1} , y con *Pseudomonas fluorescens* en combinación con $1,5 \text{ kg Zn ha}^{-1}$, generó los mayores incrementos en el rendimiento de grano. Asimismo, la inoculación con *P. fluorescens* promovió un aumento en la biomasa aérea, evidenciando el efecto positivo de estas interacciones sobre el crecimiento y la productividad del cultivo (Jalal *et al.*, 2023).

Asimismo, en maíz se ha observado que la aplicación de ZnSO_4 en combinación con bacterias solubilizadoras de Zn puede incrementar significativamente el rendimiento del cultivo y mejorar la eficiencia en el uso del agua bajo condiciones de estrés hídrico. En este sentido, se han reportado aumentos de rendimiento comprendidos entre aproximadamente 24 % y 48 % respecto al control, dependiendo del método de aplicación del Zn y de la cepa bacteriana empleada, con las mayores respuestas registradas bajo condiciones de sequía cuando el Zn se combinó con bacterias del género *Pseudomonas* (Khaledi *et al.*, 2025).

Los resultados obtenidos en su conjunto ponen de manifiesto que la respuesta del cultivo de maíz a los tratamientos evaluados estuvo fuertemente condicionada por las características ambientales propias de cada campaña, en particular por la disponibilidad hídrica durante las etapas críticas del ciclo fenológico. En este marco, la interacción significativa entre *Tratamiento* y *Año de campaña* resalta la necesidad de ajustar las estrategias de fertilización e inoculación en función del contexto ambiental, con el propósito de potenciar la eficiencia agronómica y contribuir a la sostenibilidad del sistema de producción. Sin embargo, la evidencia obtenida en este trabajo, indica que la nutrición integrada con Zn y la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Azospirillum argentinense* Az39, pueden manifestar efectos positivos aun cuando las condiciones ambientales no sean óptimas. En escenarios caracterizados por estrés ambiental moderado, estas estrategias contribuyen a atenuar las limitaciones impuestas por el ambiente y a sostener el rendimiento del cultivo. Así, se destaca el potencial de la biofertilización y la nutrición integrada con Zn para mejorar la productividad del cultivo de maíz, especialmente en suelos con deficiencia de este micronutriente.

4.2 Asociación entre variables productivas y morfofisiológicas en las distintas campañas agrícolas

La interpretación de la productividad del maíz requiere considerar tanto las condiciones edafoclimáticas mencionadas previamente como el conjunto de variables morfofisiológicas y de manejo que, en interacción con el ambiente, se asocian con la respuesta del cultivo. Estas variables se relacionan entre sí y con el contexto ambiental, configurando

patrones diferenciales en el crecimiento, el desarrollo y la eficiencia en el uso de recursos (Ljubičić *et al.*, 2023). Con el propósito de evaluar dichas relaciones, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) para los tratamientos evaluados en cada campaña agrícola. Asimismo, se incorporaron en el mismo, los datos de precipitaciones registradas en cada ciclo.

Cabe aclarar que, durante la campaña agrícola 2022-2023, el desarrollo del cultivo de maíz estuvo fuertemente condicionado por las condiciones climáticas. La sequía persistente, registrada a lo largo de gran parte del ciclo, limitó de manera significativa la expresión del potencial productivo. En este contexto, los rendimientos fueron significativamente inferiores a los de campañas previas, reflejando el fuerte impacto de las restricciones ambientales. Asimismo, las variables nutricionales y morfofisiológicas evaluadas mostraron asociaciones débiles y poco consistentes con el rendimiento, lo que indicaría que las condiciones ambientales habrían dominado la respuesta del cultivo, dificultando la identificación de patrones claros vinculados a los tratamientos. En función de esta elevada variabilidad y de la limitada diferenciación entre tratamientos, los datos de esta campaña no fueron incluidos en los análisis multivariados con la finalidad de preservar la consistencia interpretativa.

4.2.1 Campaña agrícola 2020-2021

Durante esta campaña se analizó la asociación entre el rendimiento del cultivo de maíz y las concentraciones de nutrientes en grano (P, N, S y Zn) mediante un ACP.

El análisis permitió reducir la dimensionalidad de los datos conservando una alta proporción de la varianza total (88,6 % acumulada en CP1 y CP2, Fig. 24). El CP1 se asoció positivamente con el rendimiento y con las concentraciones de Zn y N en grano, lo que indica que estas variables tienden a variar conjuntamente y contribuyen a la diferenciación entre tratamientos. Por su parte, el CP2 mostró una asociación positiva con la concentración de S, mientras que el P presentó una contribución menor.

En el biplot, el tratamiento FDA+ZnO+Az se ubicó próximo a las variables rendimiento y concentraciones de N y Zn, lo que indica una asociación positiva con estos atributos. En contraste, el tratamiento control (C) se posicionó en el cuadrante opuesto, evidenciando su asociación con menores valores de estas variables. El tratamiento ZnSO₄+Az

se ubicó cerca del origen, reflejando un comportamiento intermedio. Por su parte, los tratamientos FDA y ZnSO_4 mostraron mayor proximidad a la variable S, sin una asociación marcada con las variables de mayor peso en CP1 (Fig. 24).

En términos generales, el ACP permitió describir patrones de asociación entre el rendimiento y la concentración de ciertos nutrientes en grano. En este marco, el tratamiento FDA+ZnO+Az se presentó como el más próximo a variables productivas y nutricionales relevantes, mientras que el tratamiento control se asoció con los valores más bajos.

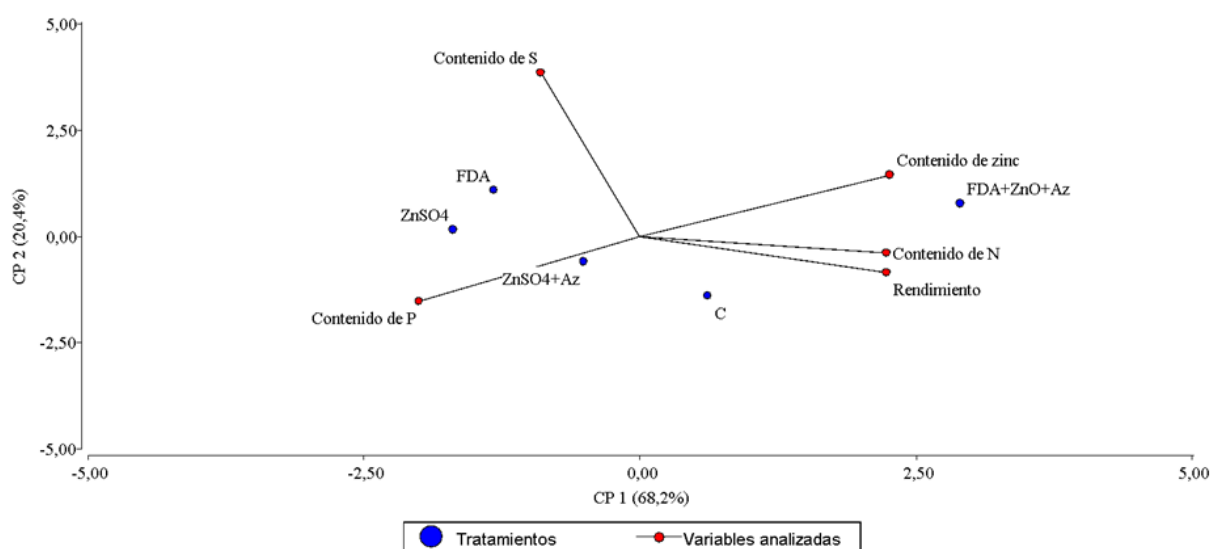


Figura 24 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2020-2021. Tratamientos: C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control); FDA: F fertilización con fosfato di amónico; FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico; ZnSO_4 : Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ; ZnSO_4 +Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ.

Por su parte, el análisis de las precipitaciones durante la campaña agrícola mostró una distribución irregular respecto al promedio histórico regional (Fig. 25). Se observaron déficits hídricos en los meses iniciales del ciclo del cultivo (septiembre-noviembre), con valores por

debajo de la media histórica, lo que pudo haber condicionado la emergencia y el establecimiento inicial del cultivo. En diciembre y enero se registraron eventos puntuales de elevada precipitación, destacándose un registro superior a 90 mm en los últimos días del mes de enero, que superaron ampliamente el promedio histórico mensual. Si bien esta variabilidad en la oferta hídrica pudo haber afectado distintos momentos del desarrollo del cultivo, los resultados productivos indican que dichos efectos no se vieron reducidos. Efectivamente, el rendimiento obtenido durante esta campaña (6.500 kg ha^{-1}) se ubicó dentro del rango esperado para la región y resultó comparable al promedio regional para el ciclo 2020-2021 (MAGyP, 2025b). Esto sugiere que el impacto potencial de las condiciones climáticas desfavorables fue, al menos en parte, atenuado por las estrategias de manejo y nutrición implementadas, lo que permitió sostener niveles productivos adecuados pese a la irregularidad climática registrada.

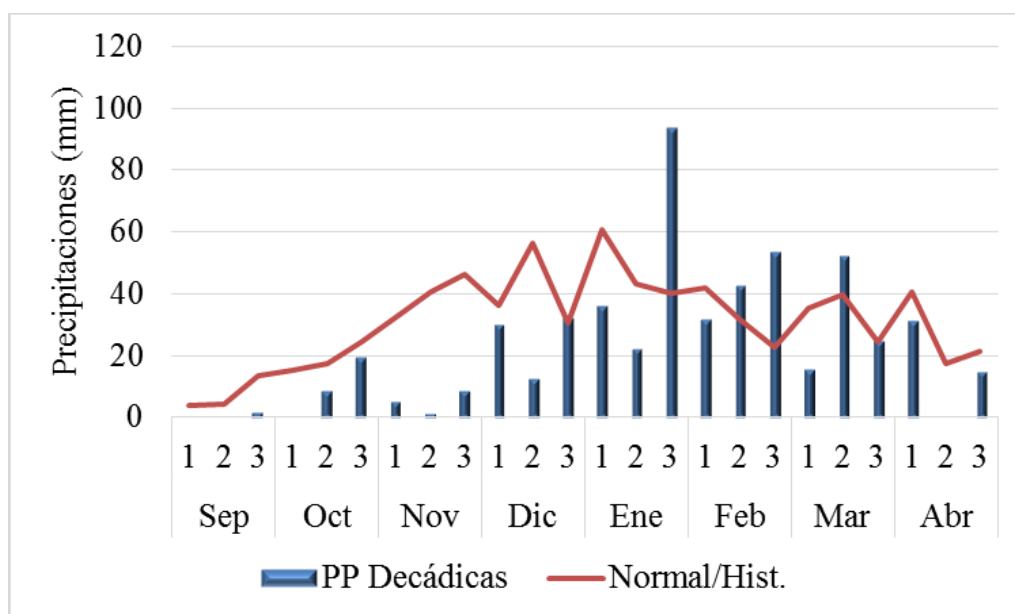


Figura 25 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses de septiembre de 2020 a abril de 2021 en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina. PP Décadas: Precipitaciones decádicas; Normal/Hist.: Precipitaciones normales e históricas de la zona estudiada.

4.2.2 Campaña agrícola 2021-2022

El ACP realizado para esta campaña, permitió explicar el 66,5 % de la variabilidad total mediante los dos primeros componentes. El CP1 se asoció positivamente con el rendimiento, la concentración de Zn y P, y el peso de mil granos, lo que sugiere que estas variables tienden a variar conjuntamente. El CP2, en cambio, se relacionó con el porcentaje de emergencia y el número de granos m^{-2} (Fig. 26).

En el biplot, el tratamiento $ZnSO_4+Az$ se ubicó próximo a las variables rendimiento, concentración de Zn y P en grano, indicando una asociación positiva con estos atributos. Asimismo, los tratamientos FDA y $ZnSO_4+Az$ mostraron una proximidad relativa entre sí, sugiriendo comportamientos similares en términos de las variables consideradas. Por otro lado, el tratamiento FDA+Az se asoció principalmente con el porcentaje de emergencia, mientras que FDA+ZnO+Az se posicionó alejado de las variables de mayor peso en CP1. El tratamiento control volvió a ubicarse, al igual que en campañas previas, alejado del grupo de variables productivas y nutricionales principales, posicionándose en sentido opuesto a estas en el eje CP1, lo que refleja su asociación con valores relativamente más bajos de rendimiento y calidad nutricional (Fig. 26). En conjunto, estos resultados permiten inferir que el tratamiento $ZnSO_4+Az$ se asoció con un conjunto favorable de variables agronómicas y nutricionales en esta campaña, aunque sin implicar necesariamente una relación causal directa.

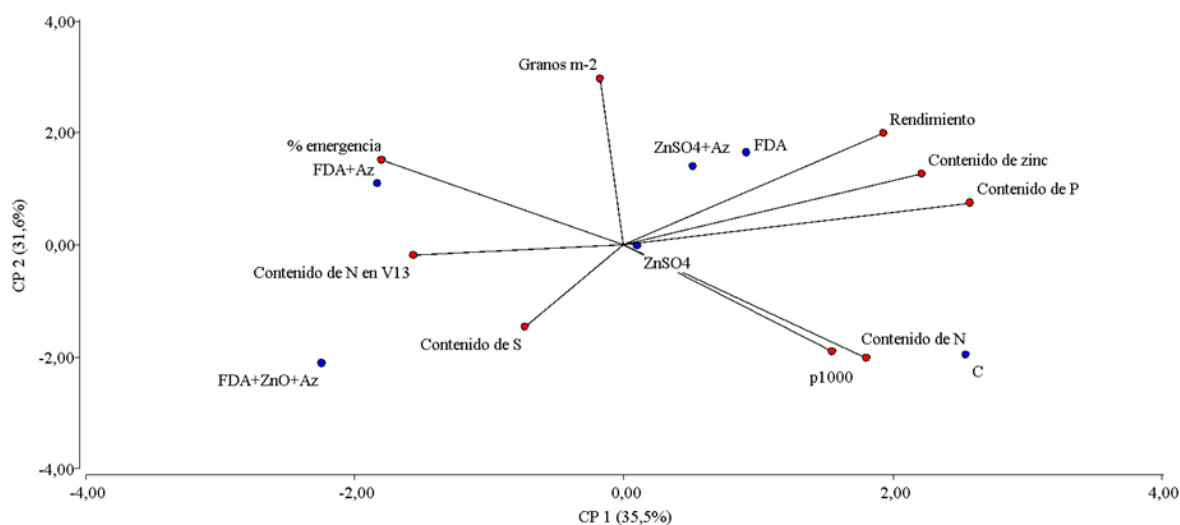


Figura 26 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2021-2022. Tratamientos: C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control); FDA: Fertilización con fosfato di amónico; FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico; FDA+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización con fosfato di amónico; ZnSO₄: Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ; ZnSO₄+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ.

En cuanto a las condiciones climáticas, el análisis de las precipitaciones registradas durante esta campaña muestra un comienzo de ciclo con precipitaciones irregulares (septiembre-diciembre), caracterizado por la alternancia de eventos de alta precipitación con períodos secos (Fig. 27). Durante el mes de enero, las precipitaciones fueron considerablemente inferiores a los valores normales, coincidiendo con la etapa previa al período crítico de floración. Esto podría haber limitado transitoriamente la disponibilidad hídrica para el crecimiento del cultivo y disminuido parcialmente el potencial de fijación de granos. Sin embargo, en el mes de febrero se registraron dos eventos de precipitaciones que superaron ampliamente el promedio histórico, coincidiendo con la floración y los días inmediatamente posteriores. Estas lluvias habrían contribuido a mitigar el estrés hídrico durante la polinización y el cuajado, permitiendo sostener la fecundación y el inicio del llenado de granos. Posteriormente, durante los meses de marzo y abril, las precipitaciones fueron variables y en algunos momentos inferiores a lo normal, aunque sin llegar a generar un estrés hídrico severo.

En este contexto, si bien la irregularidad climática podría haber influenciado en determinados momentos del desarrollo del cultivo, los rendimientos obtenidos durante la campaña 2021-2022 se mantuvieron dentro del rango esperado para la región y fueron comparables con el promedio regional del período (5.500 kg ha⁻¹; MAGyP, 2025b). Esto sugiere que el impacto negativo potencial de las condiciones hídricas desfavorables fue moderado y, probablemente, atenuado por las estrategias de manejo nutricional e inoculación bacteriana implementadas, permitiendo sostener niveles productivos adecuados pese a la variabilidad ambiental registrada.

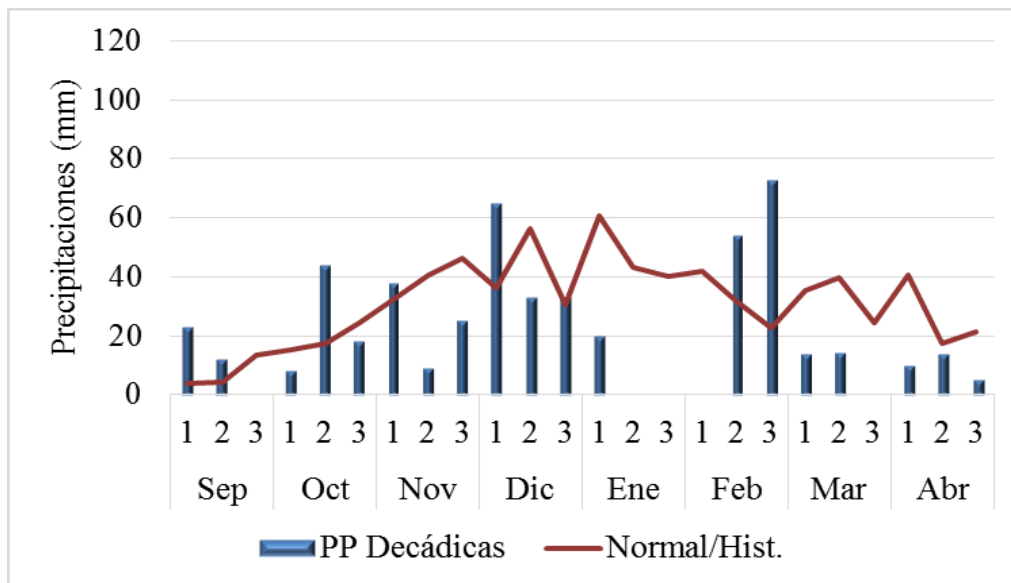


Figura 27 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses de septiembre de 2021 a abril de 2022 en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina. PP Decádicas: Precipitaciones decádicas; Normal/Hist.: Precipitaciones normales e históricas de la zona.

4.2.3 Campaña agrícola 2023-2024

En esta campaña, el ACP explicó el 79,8 % de la variabilidad total mediante los dos primeros componentes, siendo CP1 el principal eje de variación (Fig. 28). Este componente mostró asociación positiva con el rendimiento, el número de granos m^{-2} , el porcentaje de emergencia, el p1000 y el contenido de N en V13, indicando que estas variables tienden a comportarse de manera conjunta en esta campaña.

En cuanto a los tratamientos, $ZnSO_4 + Az$ se ubicó próximo a las variables productivas principales, evidenciando una asociación positiva con las mismas. El tratamiento FDA+Az también mostró proximidad a variables agronómicas relevantes, mientras que otros tratamientos se posicionaron más alejados del eje principal de variación. El tratamiento control

se ubicó en el extremo opuesto a las variables productivas, en línea con su menor desempeño relativo. En este contexto, el ACP sugiere que, bajo condiciones de mayor disponibilidad hídrica, las variables fisiológicas y nutricionales tienden a presentar patrones de asociación más definidos, lo que permite una mejor diferenciación entre tratamientos. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse en términos de asociación y no de causalidad.

Finalmente, la mayor disponibilidad hídrica registrada durante esta campaña, en relación a las ya descritas anteriormente, habría generado un contexto en el cual las diferencias entre tratamientos pudieron expresarse con mayor claridad. En este sentido, la proximidad observada entre ciertos tratamientos (como $\text{ZnSO}_4 + \text{Az}$) y variables productivas indicaría una asociación favorable en este ambiente, sin que ello implique una relación causal directa.

En cuanto a la ubicación de los tratamientos, $\text{ZnSO}_4 + \text{Az}$ se posicionó en estrecha asociación con las variables rendimiento, n° de granos m^{-2} , y porcentaje de emergencia, indicando un efecto positivo general sobre la productividad del cultivo. El tratamiento $\text{FDA} + \text{Az}$ también mostró una asociación con variables agronómicas claves, confirmando que la combinación de fertilización fosfatada e inoculación bacteriana resulta beneficiosa bajo condiciones hídricas menos restrictivas respecto a campañas previas. Los tratamientos $\text{ZnO} + \text{Az}$ y FDA se posicionaron más alejados del centro, con influencia limitada sobre las variables de mayor peso en CP1, lo que sugiere una respuesta más modesta en términos de rendimiento. El tratamiento control (C) se ubicó en el extremo izquierdo del gráfico, cercano a la variable concentración de Zn, pero claramente separado de los ejes de mayor influencia productiva, reafirmando su bajo rendimiento y menor eficiencia fisiológica (Fig. 28).

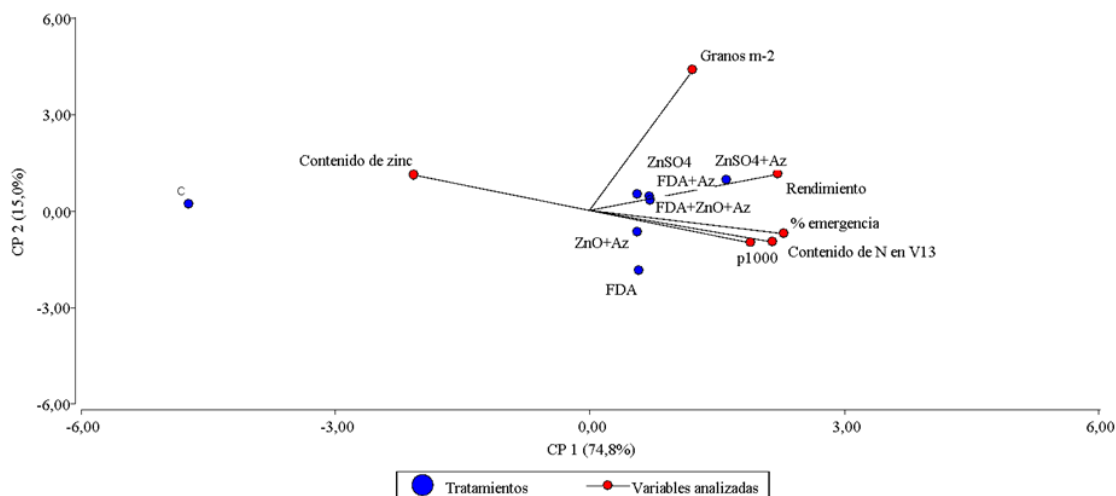


Figura 28 Análisis de componentes principales - Campaña agrícola 2023-2024. Tratamientos: C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control); FDA: Fertilización con fosfato di amónico; FDA+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización con fosfato di amónico; FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico; ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn; ZnSO₄: Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ; ZnSO₄+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESZ.

En relación a los datos registrados de precipitaciones ocurridas durante esta campaña permitieron observar que, en el período de los meses de noviembre 2023 y febrero 2024 se registró una mayor disponibilidad de agua respecto a las campañas anteriores, presentando varios picos de precipitaciones (Fig. 29). Si bien se registró cierta irregularidad en los meses de febrero y marzo, las lluvias no llegaron a ser tan limitantes, lo que permitió que el cultivo no enfrentara un estrés hídrico severo en floración. Ello habría favorecido que los factores nutricionales y de manejo tengan un efecto mayor en la determinación del rendimiento. Como ya se mencionó anteriormente, este contexto promovió que tratamientos combinados como Zn y Az39 se asociaran estrechamente con el rendimiento, número de granos por m² y emergencia, evidenciando así un efecto positivo integral en escenarios caracterizados por una adecuada provisión de agua durante el ciclo del cultivo.

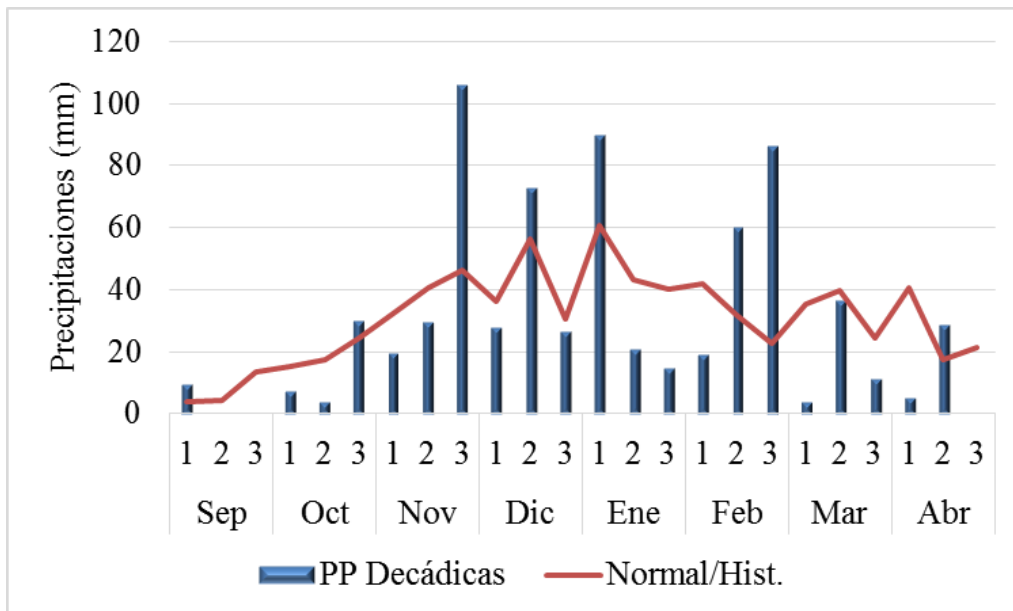


Figura 29 Precipitaciones (mm) ocurridas en los meses desde septiembre de 2023 a abril de 2024 en la localidad de La Aguada, Córdoba, Argentina. PP Decádicas: Precipitaciones decádicas; Normal/Hist.: Precipitaciones normales e históricas de la zona.

4.3 Efecto de los tratamientos sobre la concentración de zinc en el grano de maíz

El análisis conjunto de las campañas agrícolas evidenció una estabilidad en la concentración de Zn en grano entre tratamientos, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas. Este resultado adquiere particular relevancia considerando que, en sistemas agrícolas intensificados, los incrementos en el rendimiento suelen asociarse a un efecto de dilución de micronutrientes en los granos (Miner *et al.*, 2022). En este sentido, en la Figura 30 se observa la relación entre el rendimiento del cultivo (kg ha^{-1}) respecto a la concentración de Zn en grano (mg kg^{-1}) determinado a madurez de cosecha. Los datos obtenidos indican que, aun en situaciones con aumentos significativos en la productividad, especialmente durante la

campaña 2023-2024, la concentración de Zn en grano se habría mantenido estable entre tratamientos. Desde una perspectiva agronómica, estos resultados sugieren que el incremento en el rendimiento no habría implicado un deterioro detectable en la calidad nutricional del grano en términos de su concentración de Zn. No obstante, es importante señalar que los datos disponibles no permiten inferir de manera directa los mecanismos responsables de este comportamiento. En este marco, la estabilidad observada en la concentración de Zn en grano podría estar asociada, en términos potenciales, tanto a la disponibilidad del nutriente en el sistema como a procesos fisiológicos de absorción, transporte y redistribución dentro de la planta. En este sentido, se ha demostrado que el Zn absorbido es translocado hacia los órganos reproductivos mediante mecanismos de transporte y homeostasis específicos (Mutambu *et al.*, 2023). Asimismo, diversos estudios han informado que incrementos en el rendimiento no necesariamente se traducen en cambios en la concentración de Zn en grano, lo que sugiere la existencia de cierto grado de desacople entre productividad y acumulación de este micronutriente (Martínez-Cuesta *et al.*, 2020).

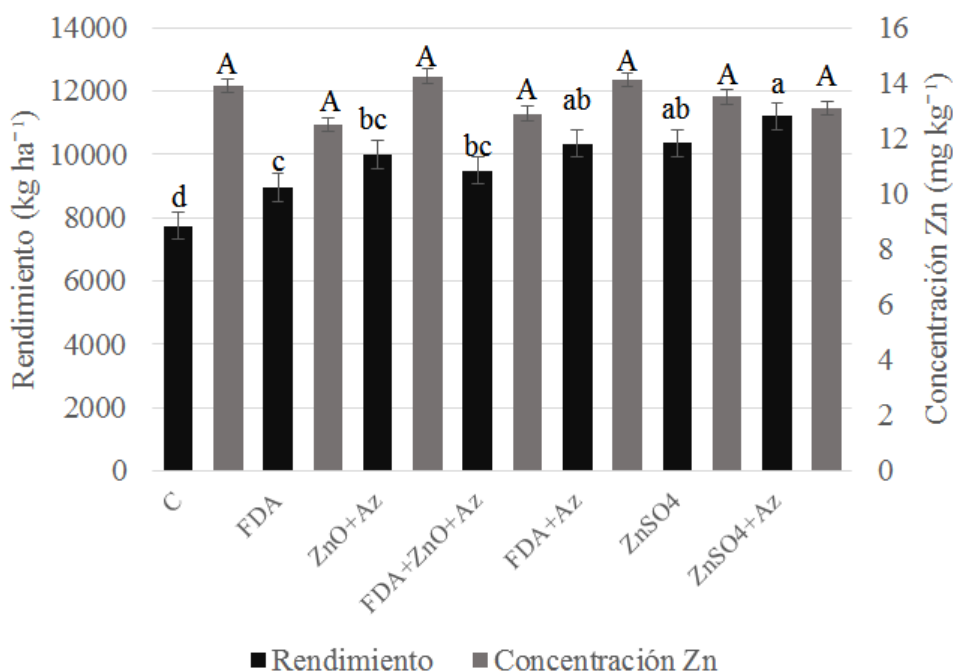


Figura 30 Rendimiento (kg ha^{-1}) y concentración de Zn en grano (mg kg^{-1}) en los distintos tratamientos durante la campaña 2023-24. El eje izquierdo corresponde al rendimiento y el eje derecho la concentración de Zn en grano. Letras diferentes sobre las barras del mismo color indican diferencias significativas entre tratamientos (DGC, $\alpha = 0,10$). Tratamientos: C: Semillas sin inocular y sin fertilizar (control); FDA: Fertilización con fosfato di amónico; FDA+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización con fosfato di amónico; FDA+ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn, además de fertilización con fosfato di amónico; ZnO+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 e impregnadas con óxido de Zn; ZnSO₄: Fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESz; ZnSO₄+Az: Semillas de maíz inoculadas con Az39 y fertilización del suelo con el fertilizante arrancador MESz.

4.4 Integración de procesos morfofisiológicos, nutricionales y su interacción con el ambiente en la determinación del rendimiento del cultivo

A partir de los ensayos a campo realizados durante las tres campañas analizadas (2020-21, 2021-22 y 2023-24), el análisis de componentes principales (ACP) permitió identificar de manera consistente que los tratamientos que combinaron fertilización con Zn e inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 (en particular, ZnSO_4 +Az y FDA+Az) se asociaron con variables clave de la nutrición del cultivo, como las concentraciones de Zn, N y P en grano, así como con parámetros agronómicos relevantes como el porcentaje de emergencia y el número de granos por m^2 . La elevada contribución de estas variables al CP1 en cada campaña sugiere que dichos tratamientos promovieron una respuesta integrada, en la cual los procesos nutricionales y morfofisiológicos actuaron de manera coordinada. En este sentido, la expresión de la respuesta del cultivo estuvo estrechamente vinculada a las condiciones ambientales, particularmente a la disponibilidad hídrica y su sincronía con etapas críticas. En las campañas 2020-21 y 2021-22, caracterizadas por déficits hídricos en torno a la floración, se observaron limitaciones en procesos clave del desarrollo reproductivo, en línea con antecedentes que destacan la alta sensibilidad de este período al estrés hídrico (Borrás y Vitantonio-Mazzini, 2018; Dong *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). En contraste, durante la campaña 2023-24, con una mayor disponibilidad hídrica relativa, se evidenció una mayor expresión de los efectos de los tratamientos, asociada a una mayor eficiencia en el uso de recursos y al desarrollo de estructuras reproductivas. Estos resultados ponen de manifiesto la interacción entre procesos nutricionales, morfofisiológicos y ambientales. A partir de este enfoque, es posible avanzar hacia una interpretación mecanicista de los resultados obtenidos en los distintos capítulos experimentales. A nivel inicial, se demostró que la cepa Az39 mantiene su viabilidad en semillas tratadas con Zn y es capaz de colonizar eficientemente la planta, lo que garantiza su funcionalidad en condiciones productivas (Cassán *et al.*, 2009; Bashan y de-Bashan, 2010). Asimismo, los ensayos de germinación y crecimiento temprano evidenciaron que la combinación de la cepa Az39 y Zn mejora la velocidad y uniformidad de la emergencia, así como el desarrollo inicial de raíces y parte aérea. En particular, se observaron incrementos relevantes en longitud radical y biomasa, lo que sugiere una mayor capacidad de exploración

del suelo. Este mayor desarrollo radical constituye un mecanismo clave para interpretar los resultados a campo, ya que una arquitectura radical más extensa y funcional mejora la captación de agua y nutrientes, especialmente en condiciones de disponibilidad heterogénea. En este sentido, la arquitectura radical ha sido señalada como un determinante central de la eficiencia en la adquisición de recursos, particularmente bajo condiciones de estrés (Lynch, 2013). A su vez, los incrementos observados en pigmentos fotosintéticos indicarían una mayor capacidad potencial de asimilación de carbono, lo que contribuye a sostener el crecimiento y la generación de biomasa (Hafeez *et al.*, 2013). No obstante, los resultados a campo muestran que esta mejora en la eficiencia fisiológica no siempre se traduce en incrementos de rendimiento, particularmente bajo condiciones de estrés hídrico severo. En la campaña 2022-23, caracterizada por rendimientos extremadamente bajos ($\sim 1.800 \text{ kg ha}^{-1}$), no se detectaron diferencias entre tratamientos, lo que indica que, bajo condiciones de mayor limitación sostenida, la disponibilidad de agua se convierte en el principal factor limitante, anulando la capacidad de respuesta a los insumos aplicados. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la literatura, donde se reconoce que, bajo estrés severo, los factores abióticos dominan la respuesta del cultivo por sobre el manejo nutricional (Passioura, 2007). En cambio, en ambientes con restricciones moderadas o con adecuada disponibilidad de recursos, los beneficios asociados a una mejor implantación, nutrición y funcionamiento fisiológico pueden expresarse en incrementos productivos. En este sentido, trabajos realizados en la región pampeana muestran que la respuesta a la fertilización balanceada (incluyendo micronutrientes como Zn) depende fuertemente del nivel de limitación ambiental, registrándose respuestas incluso en condiciones restrictivas cuando estas no son extremas (Espósito *et al.*, 2014). Asimismo, estudios experimentales indican que la fertilización con Zn puede mejorar la eficiencia de uso de otros nutrientes y contribuir a incrementos de rendimiento en maíz bajo distintos escenarios productivos (Alloway, 2008; Cakmak, 2008). Este comportamiento diferencial permite interpretar que la discrepancia entre campañas, y entre estudios, se explica principalmente por la intensidad y el momento de ocurrencia del estrés, más que por la ausencia de respuesta intrínseca del cultivo. En términos agronómicos, los resultados indican que la co-aplicación de Zn y la cepa Az39 actúan como una tecnología que mejoraría la eficiencia fisiológica y la capacidad de captación de recursos del cultivo, pero cuya expresión en rendimiento depende de la interacción con el ambiente. En este sentido, la mayor

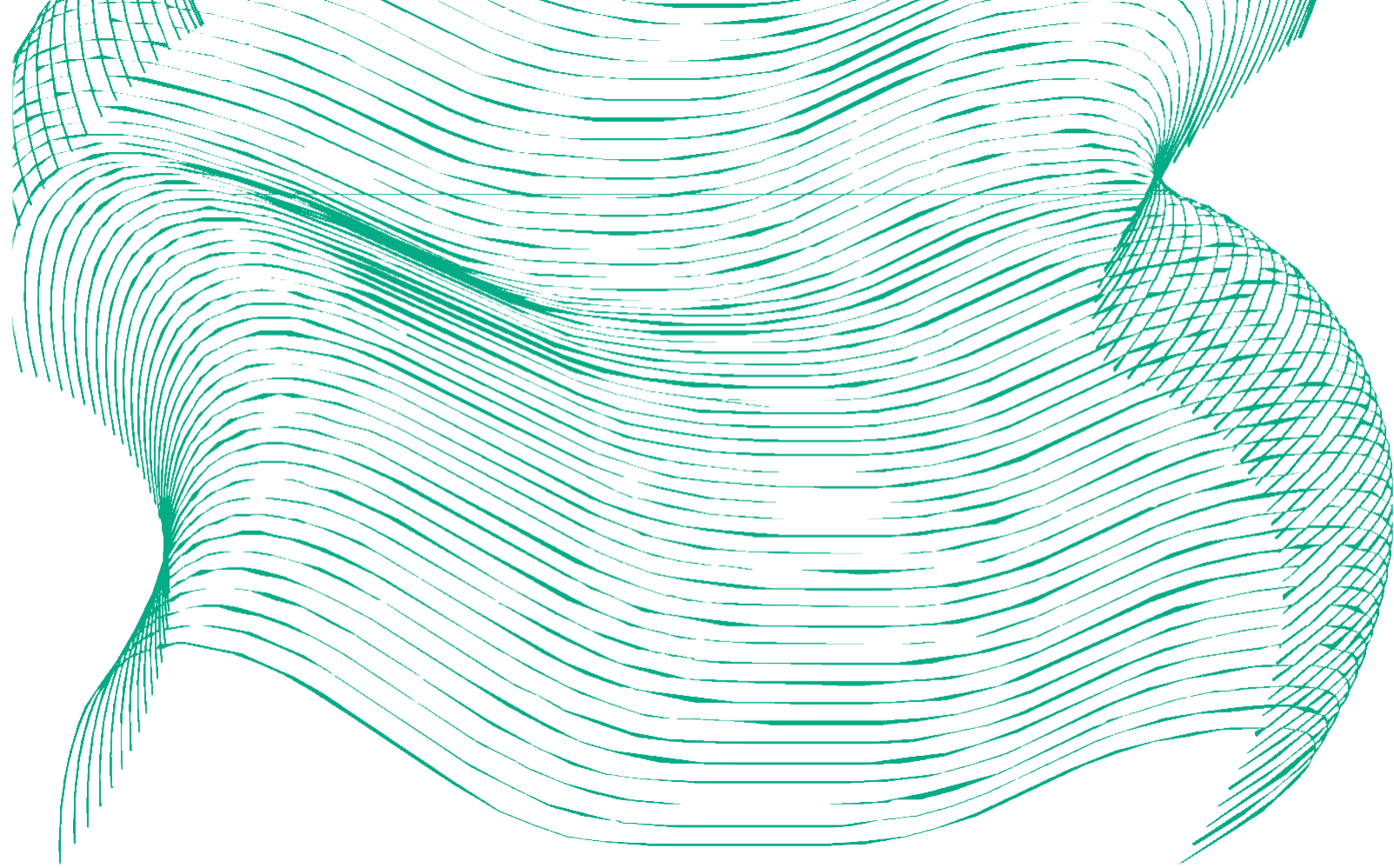
consistencia de respuesta observada en ambientes favorables o de productividad media-alta coincide con lo reportado en estudios de brecha de rendimiento, donde la reducción de limitantes permite una mayor expresión del potencial productivo (van Ittersum *et al.*, 2013).

Desde una perspectiva de escalabilidad comercial, los resultados obtenidos permitieron considerar la viabilidad de la co-aplicación de Zn y *Azospirillum argentinense* Az39 como una estrategia compatible con sistemas productivos reales. En primer lugar, se trata de tecnologías ya disponibles en el mercado, tanto en forma de fertilizantes con Zn como de inoculantes bacterianos, lo que facilita su adopción sin requerir modificaciones sustanciales en las prácticas habituales de manejo. Asimismo, la aplicación en semilla o como fertilizante arrancador resulta operativamente sencilla y se integra fácilmente a los esquemas de siembra directa predominantes en la región. En términos productivos, si bien la magnitud de la respuesta mostró variabilidad entre campañas, los resultados evidencian que, en condiciones de disponibilidad hídrica suficiente a favorable, estas prácticas pueden contribuir a la mejora del comportamiento agronómico del cultivo, lo que sugiere un potencial retorno positivo. En este sentido, la relación costo-beneficio dependerá del contexto ambiental y del nivel de respuesta alcanzado, siendo esperable una mayor eficiencia en ambientes donde el cultivo pueda expresar su potencial productivo. Cabe destacar que la evidencia generada en este trabajo se sustenta en un enfoque multiescala, que incluyó ensayos *in vitro*, en laboratorio, en cámaras de germinación y crecimiento, y a campo, así como en la evaluación durante cuatro campañas agrícolas consecutivas. Esta aproximación permitió validar los efectos observados en distintos niveles de organización y bajo condiciones ambientales contrastantes, fortaleciendo la consistencia de los resultados y su potencial extrapolación a sistemas productivos reales. En este marco, si bien algunas evaluaciones experimentales a nivel de semilla implicaron condiciones controladas propias del ámbito experimental, los ensayos a campo se realizaron utilizando semillas en condiciones equivalentes a las empleadas en la práctica productiva, lo que refuerza la pertinencia agronómica de los resultados obtenidos. Por otra parte, el uso combinado de fertilización con micronutrientes e inoculación microbiana se alinea con enfoques de intensificación sustentable, orientados a mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes y a reducir la dependencia de insumos de mayor impacto ambiental. No obstante, la variabilidad observada entre campañas pone de manifiesto la necesidad de continuar

generando información en distintos ambientes y condiciones productivas, a fin de ajustar recomendaciones y fortalecer la robustez de estas tecnologías a escala comercial.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo, se concluye que la respuesta productiva y nutricional del cultivo de maíz estaría fuertemente influenciada por la variabilidad ambiental entre campañas agrícolas, particularmente por la disponibilidad hídrica durante los períodos críticos del ciclo. La interacción significativa entre Tratamiento y Campaña pone de manifiesto que la eficacia de la fertilización con Zn y de la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 se expresa en estrecha relación con el contexto ambiental, lo que resalta la importancia de un manejo ajustado a las condiciones de cada campaña. En condiciones de mayor disponibilidad hídrica o con restricciones moderadas, las mejores respuestas productivas se observan con los tratamientos que incluyen el aporte de Zn, especialmente en combinación con la inoculación con la cepa Az39. Estos resultados reflejan el potencial de estas estrategias para mejorar el desempeño del cultivo cuando las condiciones permiten una adecuada expresión de su crecimiento y desarrollo. Aun en escenarios más restrictivos, las prácticas evaluadas aportan información valiosa sobre el comportamiento del cultivo frente a condiciones adversas. En este sentido, los resultados respaldan que la co-aplicación de Zn y *A. argentinense* Az39 contribuye a promover una respuesta integrada del cultivo, asociada a mejoras en la nutrición y en procesos morfofisiológicos claves, lo que constituye una base sólida para su incorporación en esquemas de manejo agronómico. Asimismo, se destaca que los incrementos de rendimiento observados se acompañaron del mantenimiento de la calidad nutricional del grano, evaluada a través de su concentración de Zn. Este resultado refuerza la relevancia agronómica de las prácticas analizadas, al evidenciar que es posible incrementar la productividad del cultivo sin comprometer su calidad nutricional en términos de este micronutriente, bajo las condiciones experimentales evaluadas.



CAPÍTULO 5:

Conclusiones finales



Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten confirmar la hipótesis planteada y ponen de manifiesto que, la inoculación con *Azospirillum argentinense* Az39 en combinación con la fertilización con Zn, constituye una estrategia efectiva para mejorar el comportamiento germinativo, el crecimiento, el rendimiento y la calidad nutricional del cultivo de maíz.

La evidencia generada se sustenta en un enfoque multiescala que integró ensayos *in vitro*, en laboratorio, en cámaras de germinación y crecimiento, y a campo. Este abordaje permitió analizar de manera consistente la respuesta del cultivo en distintos niveles de organización y bajo diversas condiciones ambientales, consolidando la solidez de los resultados alcanzados.

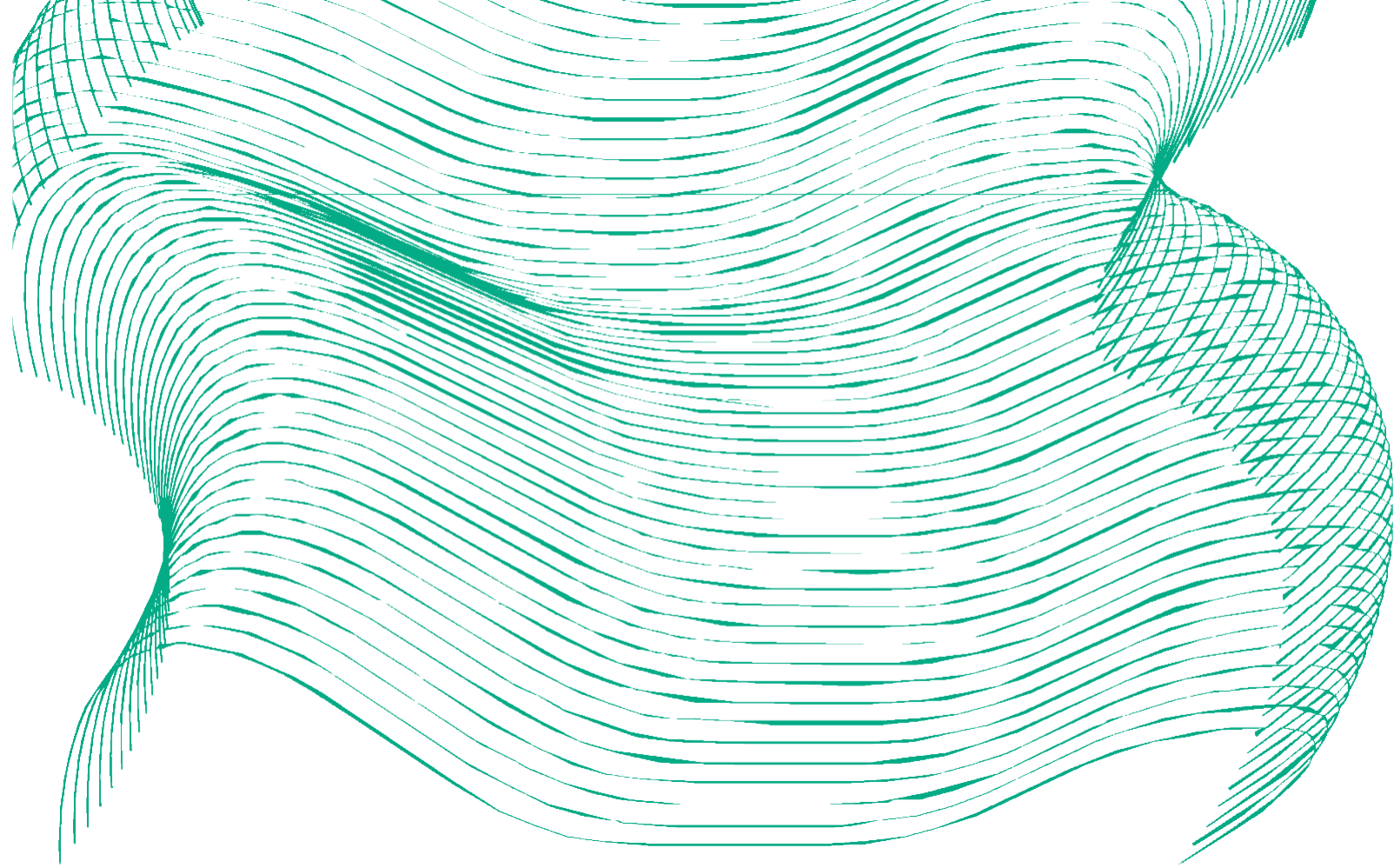
En este contexto, los ensayos iniciales demostraron la compatibilidad fisiológica entre la cepa Az39 y diferentes fuentes de Zn. La bacteria tiene la capacidad de crecer en presencia de ambos compuestos dentro de rangos de 0,02 a 0,4 g L⁻¹. Con un crecimiento comparable al control, alcanzando valores del orden de 10⁷ UFC mL⁻¹ con ZnO y de 10⁸ UFC mL⁻¹ con ZnSO₄, con reducciones en el crecimiento conforme aumentan las concentraciones. Esto evidencia un umbral fisiológico de tolerancia dependiente de la fuente y la dosis del micronutriente. Es así que, estos resultados confirman la factibilidad de su uso conjunto en tratamientos de semillas, sin efectos antagónicos en las etapas iniciales del cultivo.

Durante el estadio V3 del maíz, la inoculación con la cepa Az39 junto con el aporte de Zn, especialmente en aplicación combinada, promueve una emergencia más rápida y uniforme y un mayor desarrollo inicial. En este sentido, la interacción entre Az39 y Zn acelera la germinación, destacándose la combinación con ZnSO₄, que supera el 70 % a las 48 h. Estos efectos se reflejan en una respuesta morfofisiológica integrada, con mayor expansión del sistema radical, incremento de la biomasa aérea y mejoras en el estado fotosintético. En particular, la combinación de sulfato de Zn + Az39 incrementa aproximadamente un 20-25 % el peso seco de la parte aérea, mientras que los pigmentos fotosintéticos muestran aumentos significativos, con incrementos cercanos al 70-75 % en clorofila *a*, superiores al 100 % en clorofila *b* y alrededor de 80-85 % en carotenoides. De manera complementaria, tanto la combinación de ZnSO₄ + Az39 como la de ZnO + Az39 incrementan el peso seco de la parte radical en un 40-45 % respecto al control, mientras que el tratamiento con óxido de Zn + Az39 promueve aumentos en la longitud de la raíz primaria del orden del 35-40 %. Estos resultados,

estadísticamente superiores al control y a las aplicaciones individuales, evidencian una interacción sinérgica entre la inoculación microbiana y la nutrición con Zn, favoreciendo una mayor eficiencia en la exploración del suelo y en la captación de recursos.

En condiciones de campo, la magnitud de las respuestas está asociada a la disponibilidad hídrica. En campañas con restricción hídrica durante el período crítico del cultivo no se observan diferencias entre los tratamientos. Mientras que, con menor restricción, las estrategias combinadas de Az39 y Zn incrementan en un 40-50% el rendimiento del cultivo. En particular, se destaca el tratamiento combinado de ZnSO_4 + Az39, con valores de $11.200 \text{ kg ha}^{-1}$ significativamente superiores al control con un promedio de 7.700 kg ha^{-1} . Aun en este contexto de variabilidad, los incrementos productivos logrados no implican detrimentos en la calidad nutricional del grano, lo que demuestra que es posible incrementar la productividad sin comprometer la calidad nutricional, reforzando el valor de esta estrategia en el marco de enfoques de biofortificación.

Desde una perspectiva integradora, los resultados indican que la combinación de la inoculación con la cepa Az39 y fertilización con Zn promueve una respuesta coordinada del cultivo, en la que los procesos nutricionales, morfofisiológicos y productivos interactúan de manera sinérgica. Esta articulación se traduce en una mayor eficiencia en el uso de recursos y en una mejor expresión del rendimiento cuando las condiciones ambientales son menos restrictivas. En este sentido, el uso combinado de fertilización con micronutrientes e inoculación microbiana se presenta como una alternativa alineada con los principios de intensificación sustentable, orientada a mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes y a promover el uso de insumos ambientalmente sostenibles. En función de estos resultados obtenidos, se confirma el potencial de estas estrategias, además de delinear un camino claro para su profundización. La variabilidad observada entre ambientes resalta la importancia de continuar avanzando en la optimización de dosis, formulaciones y modalidades de aplicación, así como en su evaluación en distintos contextos productivos. Este proceso será clave para fortalecer su transferencia y consolidar su adopción, contribuyendo al desarrollo de sistemas agrícolas más eficientes, resilientes y sustentables, capaces de integrar productividad y calidad nutricional de manera equilibrada.



CAPÍTULO 6:

Bibliografía

—

1. Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., y Kloepper, J. W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Ecol.* 58 (4): 921-929. DOI <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9531-y>
2. Affortit, P., Ali Ahmed, M., Grondin, A., Delzon, S., Carminati, A. y Laplaze, L. 2024. Keep in touch: the soil-root hydraulic continuum and its role in drought resistance in crops, *Journal of Experimental Botany*, Volume 75, Issue 2, Pages 584-593, <https://doi.org/10.1093/jxb/erad312>
3. Ahsan, A. K., Tebha, S. S., Sangi, R., Kamran, A., Zaidi, Z. A., Haque, T. y Ali Hamza, M. S. 2021. Zinc micronutrient deficiency and its prevalence in malnourished pediatric children as compared to well-nourished children: a nutritional emergency. *Global Pediatric Health*, 8, 2333794X211050316. <https://doi.org/10.1177/2333794X211050316>
4. Alloway, B. 2008. Zinc in soils and crop nutrition (2nd ed.). Brussels: International Zinc Association; Paris: International Fertilizer Industry Association.
5. Alzate Zuluaga, M.Y., Fattorini, R., Cesco, S. y Pii, Y. 2024 Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2024.1440978.
6. Andrade, F. H., Vega, C., Uhart, S., Cirilo, A., Cantarero, M., y Valentinuz, O. 1999. Kernel number determination in maize. *Crop Science*, 39(2), 453-459. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X0039000200026x>
7. Andrade F., y V. Sadras. 2002. Bases para el Manejo del Maíz, el Girasol y la Soja, INTA Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMP, Buenos Aires, Argentina. 450 pp.
8. Ansabayeva, A., Makhambetov, M., Rebouh, N.Y., Abdelkader, M., Saudy, H.S., Hassan, K.M., Nasser, M.A., Ali, M.A.A. y Ebrahim, M. 2025. Plant Growth-Promoting Microbes for Resilient Farming Systems: Mitigating Environmental Stressors and Boosting Crops Productivity-A Review. *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030260>
9. Ardakani, M. y Mafakheri, S. 2011. Diseño de un agroecosistema sostenible para la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 1, 401-413
10. Aslam, T. 2023. Agronomic Bio-Fortification of Wheat to Combat Zinc Deficiency in Developing Countries. *Pakistan Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.17582/JOURNAL.PJAR/2021/34.1.201.217>

11. Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. y Smith, D. L. 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9, 1473. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
12. Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., y Döbereiner, J. 2015. *Azospirillum*. En W. B. Whitman, F. Rainey, F. A. Kämpfer, B. P. Hedlund, P. DeVos, S. Dedysh y M. E. Trujillo (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-35). John Wiley y Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608>
13. Barbieri, P., H.R. Sainz Rozas, N. Wyngaard, M. Eyherabide, N. Reussi Calvo, F. Salvagiotti, A. Correndo, P.A. Barbagelata, G. Espósito Goya, J.C. Colazo, y Echeverría, H.E. 2017. Can edaphic variables improve DTPA-based zinc diagnosis in corn? *Soil Sci. Soc. A. J.* <https://doi.org/10.2136/sssaj2016.09.0316>
14. Barik, S.R., Pandit, E., Sanghamitra, P., Mohanty, S.P., Behera, A., Mishra, J., Nayak, D.K., Bastia, R., Moharana, A., Sahoo, A. y Pradhan, S.K. 2022. Unraveling the genomic regions controlling the seed vigour index, root growth parameters and germination per cent in rice. *PLoS One*. 17(7):e0267303. doi: 10.1371/journal.pone.0267303
15. Bashan, Y. y De-Bashan, L. E. 2010. How the plant growth- promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: A critical assessment. *Advances in Agronomy* 108, 77-136.
16. Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S. y El Enshasy, H. 2021. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* 13(3), 140. DOI: <https://doi.org/10.3390/su13031140>
17. Beckie, H.J., Friesen, L.F., Nawolsky, K.M. y Morrison, I.N. 1990. A rapid bioassay to detect trifluralin-resistant green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Technology* 4, 505-508.
18. Beijerinck, M. W. 1925. Über ein Spirillum, welches frei en Stickstoff binden kann? *Zentralblatt für Bakteriologie*, 63, 353-359.
19. Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293 300.
20. Borrás, L. y Vitantonio-Mazzini, L. N. 2018. Maize reproductive development and kernel set

- under limited plant growth environments. *Journal of Experimental Botany*, 69(13), 3235-3243.
21. Bottini, R., Cassán, F. y Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 497-503.
 22. Bouis, H.E. y Welch, R.M. 2010. Biofortification-A sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *Crop Sci.* 50:S-20-S-32. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0531>
 23. Bouis, H., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J. y Pfeiffer, W. 2011. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin* 32: 31S-40S.
 24. Bruins, M.R., Kapil, S. y Oehme, F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 45(3):198-207. doi: 10.1006/eesa.1999.1860.
 25. Cakmak, I. 2008. Enrichment of cereal grains with Zn: Agronomic or genetic biofortification?. *Plant Soil* 302, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3>
 26. Cakmak, I., Kalayci, M., Kaya, Y., Torun, A. A., Aydin, N., Wang, Y., Arisoy, Z., Erdem, H., Yazici, A. y Gokmen, O. 2010. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (16): 9092-9102. DOI <https://doi.org/10.1021/jf101197h>
 27. Cakmak, I. 2011. Actas Simposio Fertilidad 2011, IPNI-Fertilizar. Rosario, Santa Fe.
 28. Cakmak, I. 2015. Zinc para la producción global sustentable de cultivos y mejores dietas nutricionales. Curso Internacional de Nutrición de Cultivos. Argentina: Intagri.
 29. Cakmak, I. y Kutman, U. B. 2017. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *Soil Science Volume* 69, Issue 1. <https://doi.org/10.1111/ejss.12437>
 30. Cárcova, J., Borrás L y Otegui, M.E. 2003. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. (8):133-163
 31. Cassán, F., Perrig, D., Sgroi, S., Masciarelli, O., Penna, C. y Luna, V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.*, 45, pp. 28-35, 10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
 32. Cassán, F. V., Perrig, D., Sgroi, V. y Luna, V. 2011. Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. En Maheshwari, D. K. (Ed.), *Bacteria in agrobiología: Plant nutrient*

management (pp. 141-182). New York, USA: Springer.

33. Cassán, F. D., Okon, Y. y Creus, C. M. 2015. Protocol for the quality control of *Azospirillum* spp. inoculants. En Cassán, F. D., Okon, Y. y Creus, C. M. (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical issues and protocols* (Vol. 1, pp. 487-499). Cham, Suiza: Springer.
34. Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C.L.N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F.O., de Souza, E., Zorita, M.D., de-Bashan, L. y Mora, V. 2020. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol Fertil Soils*. 56:461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.
35. Cerliani, C., Espósito, G., Morla, F., Balboa, G. y Naville, G. 2018a. Relación entre la densidad óptima agronómica y el número de granos por planta en maíz (*Zea mays* L.). *European Scientific Journal*. 14 (9):29-45.
36. Cerliani, C., Espósito, G., Morla, F. y Naville, R. 2018b. Generación de prescripciones de densidad variable a escala de lote en el sur de la provincia de Córdoba (Argentina). Primer Congreso Latinoamericano de Agricultura de Precisión. 11 al 13 de abril. Santiago, Chile
37. Chattaraj, S., Samantaray, A., Ganguly, A. y Thatoi, H. 2025. Employing plant growth-promoting rhizobacteria for abiotic stress mitigation in plants: With a focus on drought stress. *Discover Applied Sciences* 7, 68. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-025-06468-6>
38. Chandrangu, P., Rensing, C. y Helmann, J. 2017. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15, 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
39. Chieb, M. y Gachomo, E.W. 2023. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC Plant Biol* 23, 407. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>
40. Choukri, M., Abouabdillah, A., Bouabid, R., Abd-Elkader, O. H., Pacioglu, O., Boufahja, F. y Bouriou, M. 2022. Zn application through seed priming improves productivity and grain nutritional quality of silage corn. *Saudi J. Biol. Sci.* 29 (12): 103456. DOI <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103456>
41. Ciampitti, I.A. y Vyn, T.J. 2012 Physiological Perspectives of Changes over Time in Maize Yield Dependency on Nitrogen Uptake and Associated Nitrogen Efficiencies: A Review. *Field Crops Research*, 133, 48-67. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.03.008>
42. Cohen, A.C., Bottini, R. y Piccoli, P.N. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA

- in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation*: 54(2): 97-103.
43. Condori, T., Alarcón, S., Huasasquiche, L., García-Blásquez, C., Padilla-Castro, C., Velásquez, J., y Solórzano, R. 2024. Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a Strategy to Reduce Nitrogen Fertilization in Cultivating Purple Maize (*Zea mays* L.) in the Inter-Andean Valleys of Peru. *Microorganisms*, 12(10), 2107. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102107>
 44. Contardi, M., Rozadilla, B. y Ferrari, B. 2025. Maíz 2023/24: la tercer mejor campaña exportadora de la historia. Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). AÑO XLII - Edición N° 2185. Recuperado del sitio web de la BCR <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/maiz-202324-la>
 45. de Francisco, M., Romeiro, A., Durães, L., Álvarez-Torrellas, S., Ibañez, M.A. y Almendros, P. 2024. Environmental behaviour of synthesized and commercial agricultural zinc products: Leaching, migration, and availability in soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 24, 5293-5308. DOI <https://doi.org/10.1007/s42729-024-01908-5>
 46. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). 2025. Foreign Agricultural Service. Production Corn. Consultado en diciembre de 2025. <https://www.fas.usda.gov/data/production/commodity/0440000>
 47. Dhaliwal, S.S., Sharma, V., Shukla, A.K., Verma, V., Kaur, M., Shivay, Y.S., Nisar, S., Gaber, A., Brestic, M., Barek, V., Skalicky, M., Ondrisik, P. y Hossain, A. 2022 Biofortification-A Frontier Novel Approach to Enrich Micronutrients in Field Crops to Encounter the Nutritional Security. *Molecules*. 27(4):1340. doi: 10.3390/molecules27041340.
 48. Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. 2020. Infostat (Versión 2020) [programa de computadora]. Centro de Transferencia InfoStat. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=pageid=15>
 49. Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., Boyanov, M. I., y Anderson, A. J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1125. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>
 50. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J., Kapulnik, Y., Berner, S.,

- Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. y Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 871-879.
51. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y. y Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *A. brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils* 36(4), 284-297.
52. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. y Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(2), 107-149. DOI: <https://doi.org/10.1080/713610853>
53. Domingues, C. R. S., Barbosa, J. Z., Consalter, R., Santos, M., Adam, W. M., y Motta, A. C. V. 2016. Influence of zinc deficiency on the mineral composition of maize plants in contrasting soils. *Biosci. J.* 32 (5): 1234-1245. DOI <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n5a2016-32993>
54. Dong, X., Guan, L., Zhang, P. H., Liu, X. L., Li, S. J. y Fu, Z. J. 2021. Responses of maize with different growth periods to heat stress around flowering and early grain filling. *Agr. For. Meteorol.* 303, 108378. doi: 10.1016/j.agrformet.2021.108378
55. Dourado Neto, D., Martin, T. N., Pavinato, P. S., Nunes, U. R., Escobar, O. S. y Monçon Fipke, G. 2015. El tratamiento de semillas de maíz con micronutrientes aumenta el rendimiento de grano. *Revista Caatinga* 28 (3): 86-92.
56. dos Santos Ferreira, N., Coniglio, A., Puente, M., Sant'Anna, F. H., Maroniche, G., García, J., Molina, R., Nievas, S., Gazolla Volpiano, C., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P., Pedraza, R. O., Reis, V. M., Zilli, J. É., y Cassán, F. 2022. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(8), 005475. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005475>
57. Dubey, D. y Pathak, G. C. 2024. Zinc: A critical micronutrient for growth and development of plants. *J. Appl. Biosci.* 50 (2): 95-102. DOI: 10.61081/joab/50v2i104
58. Echeverría, H. E. y F. O. García. 2015. 2ª edición. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. INTA, Buenos Aires, Argentina. págs. 229-264.
59. El-Ballat, E. M., Elsilik, S. E., Ali, H. M., Ali, H. E., Hano, C. y El-Esawi, M. A. 2023. Metal-Resistant PGPR Strain *Azospirillum brasilense* EMCC1454 Enhances Growth and Chromium

- Stress Tolerance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) by Modulating Redox Potential, Osmolytes, Antioxidants, and Stress-Related Gene Expression. *Plants* (Basel). 26;12(11):2110. doi: 10.3390/plants12112110.
- 60.Erenstein, O., Jaleta, M., Sonder, K., Mottaleb, K. y Prasanna, B.M. 2022 Global maize production, consumption and trade: trends and RyD implications. *Food Sec.* 14, 1295-1319. <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>
- 61.Espindula, E., Sperb, E.R., Mor, B., Pankiewicz, V.C.S., Tuleski, T.R., Tadra-Sfeir, M.Z., Bonato, P., Scheid, C., Merib, J., Souza, E.M. y Passaglia, L.M.P. 2023. Effects on gene expression during maize-*Azospirillum* interaction in the presence of a plant-specific inhibitor of indole-3-acetic acid production. *Genet Mol Biol.*46(3 Supl. 1) doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2023-0100.
- 62.Espósito, G., Balboa, G., Castillo, C y Balboa, R. 2010. Disponibilidad de zinc y respuesta a la fertilización del maíz en el sur de Córdoba. XXII Congreso Argentino de las Ciencias del Suelo. Rosario, Argentina.
- 63.Espósito, G., Balboa, G., Cerliani, C. y Balboa, R. 2014. Eficiencia agronomica del fosforo en maiz afectada por la fertilizacion con zinc. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo II Reunión Nacional “Materia Orgánica y Sustancias Húmicas”. Bahía Blanca, Argentina.
- 64.Espósito, G., Balboa, G., Cerliani, C., Balboa, R. y Castillo, C. 2015. Rendimiento potencial de maíz. En: El cultivo de maíz en san Luis. Ed. Juan Cruz Colazo Jorge Alberto Garay y Hugo Veneciano. Ediciones INTA Centro Regional La Pampa - San Luis. INTA Anguil. Argentina.:32-52
- 65.Espósito, G., Cerliani, C., Naville, R. y Balboa, G. 2017. Impacts of crop management practices on corn yield gap. *Proceedings 7th World Congress on Conservation Agriculture.* Rosario. 1 - 4 de August 2017.: 162.
- 66.Espósito, G., Balboa, G., Cerliani, C., Balboa, R., y Castillo, C. 2021. *Fertilización con Zn en cultivos de maíz y trigo.* Fertilizar Asociación Civil. https://fertilizar.org.ar/publicaciones_y_eventos/fertilizacion-con-zinc-en-maiz-y-trigo
- 67.Ferraris G. N. y Faggioli V. 2008. Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento (PGPM) en Trigo. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. En: https://aws.agroconsultasonline.com/documento.html?op=dydocumento_id=1088

68. Finch-Savage, W.E. y Bassel, G.W. 2016. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation, *Journal of Experimental Botany*, Volume 67, Issue 3, Pages 567-591, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>
69. Francioli, D., Kampouris, I.D., Kuhl-Nagel, T., Babin, D., Sommermann, L., Behr, J. H., Chowdhury, S. P., Zrenner, R., Moradtalab, N., Schlöter, M., Geistlinger, J., Ludewig, U., Neumann, G., Smalla, K., y Grosch, R. 2025. Microbial inoculants modulate the rhizosphere microbiome, alleviate plant stress responses, and enhance maize growth at field scale. *Genome Biol* 26, 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-025-03621-7>
70. Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M. y Hungria, M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7(1), 153. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
71. Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (FADA). 2025. El rol del maíz argentino en el comercio internacional. Recuperado de <https://fundacionfada.org/informes/>
72. Gadd, G. M. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156 (3): 609-643. DOI <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
73. Galindo, F.S., Bellotte, J.L.M., Santini, J.M.K., Buzetti, S., Rosa, P.A.L., Jalal, A. y Teixeira Filho, M.C.M. 2021. Zinc use efficiency of maize-wheat cropping after inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Nutr Cycl Agroecosyst* 120, 205-221. <https://doi.org/10.1007/s10705-021-10149-2>
74. Gauch, H. G. 2006. Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Science*, 46(4), 1488-1500. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.07-0193>
75. Glick, B. R. 2012. Plant growth- promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 963401, 1-15. DOI <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
76. Glick, B. R. 2014. *Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world*. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
77. Gobierno de la Provincia de Córdoba, Ministerio de Bioagroindustria. 2024. Rindes agrícolas de la campaña 2024-2025 en un nuevo mapa abierto. Recuperado de: <https://bioagroindustria.cba.gov.ar/index.php/rindes-agricolas-de-la-campana-24-25-en-un->

nuevo-mapa-abierto/

78. Gonçalves Júnior, A. C., Trautmann, R. R., Marengoni, N. G., Ribeiro, O. L. y Dos Santos, A. L. 2007. Produtividade do milho em resposta à adubação com NPK e Zn em Argissolo Vermelho-amarelo eutrófico e Latossolo Vermelho eutroférico. *Ciência Agrotécnica* 31 (4): 1231-1236
79. González Hernández, A., da Silva, E. P., Avelar Ferreira, P. A., Lovato, P. E., Oliveira, G. P. y Soares, C. R. F. 2024. Inoculation methods and agronomic efficiency of *Azospirillum brasilense* strain Az39 for corn crop under different edaphoclimatic conditions. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 19(1), e3609. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v19i1a3609>
80. Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J. y Nain, L. 2021 PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:618230. doi: 10.3389/fsufs.2020.618230
81. Gureeva, M. V. y Gureev, A. P. 2023. Molecular Mechanisms Determining the Role of Bacteria from the Genus *Azospirillum* in Plant Adaptation to Damaging Environmental Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9122. <https://doi.org/10.3390/ijms24119122>
82. Hafeez, B., Khanif, Y. y Saleem, M. 2013. Role of zinc in plant nutrition: A review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3, 374-391.
83. Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M., y Khan, N. 2024. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Plant Growth Enhancer for Sustainable Agriculture: A Review. *Bacteria*, 3(2), 59-75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>
84. Haque, J. 2024. Effect of Seed Priming on Germination Behavior and Emergence of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agric. Ecol. Res. Int.*, vol. 25, no. 2, pp. 53-61 DOI: 10.9734/JAERI/2024/v25i2584
85. Herigstad, B., Hamilton, M. y Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 1;44(2):121-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00241-4.
86. Hess, S.Y. 2017. National Risk of Zinc Deficiency as Estimated by National Surveys. *Food and Nutrition Bulletin*. 38(1):3-17. doi:10.1177/0379572116689000
87. Housh, A. B., Benoit, M., Wilder, S. L., Scott, S., Powell, G., Schueller, M. J. y Ferrieri, R. A. 2021. Plant-Growth-Promoting Bacteria Can Impact Zn Uptake in Zea mays: An Examination

- of the Mechanisms of Action Using Functional Mutants of *Azospirillum brasilense*. *Microorganisms*, 9(5):1002. DOI: 10.3390/microorganisms9051002
- 88.Hussain, A., Jiang, W., Wang, X., Shahid, S., Saba, N., Ahmad, M., Dar, Abubakar., Masood, S.U., Imran, M. y Mustafa, A. 2022. Mechanistic Impact of Zinc Deficiency in Human Development. *Frontiers in Nutrition*, Vol 922. DOI=10.3389/fnut.2022.717064
- 89.Impa, S. M., Morete, M. J., Ismail, A. M., Schulin, R. y Johnson- Beebout, S. E. 2013. Zn uptake, translocation, and grain Zn loading in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes selected for Zn deficiency tolerance and high grain Zn. *Journal of Experimental Botany* 64 (10): 2739- 2751. DOI <https://doi.org/10.1093/jxb/ert118>
- 90.Irigoyen, A., Panunzio Moscoso, M.P., Cambareri, M.A., Holzman, M.E. y Echarte, L. 2020. Agua en el suelo durante el período crítico para la definición de rendimiento de maíz en el centro-sudeste bonaerense; Asociación Argentina de Agrometeorología; Revista Argentina de Agrometeorologia; XI; 17-32
- 91.ISTA. 1999. Internacional Rules for Seed Testing. 335
- 92.ISTA. 2019. Internacional Rules for Seed Testing.
- 93.Jalal, A., Oliveira, C.E.da S., Fernandes, G.C., da Silva, E.C., da Costa, K.N., de Souza, J.S., Leite, G.da S., Biagini, A.L.C., Galindo, F.S. y Teixeira Filho, M.C.M. 2023. Integrated use of plant growth-promoting bacteria and nano-zinc foliar spray is a sustainable approach for wheat biofortification, yield, and zinc use efficiency. *Frontiers in Plant Science*. Volume 14. DOI=10.3389/fpls.2023.1146808
- 94.Jalal A., Júnior E.F. y Teixeira Filho, M.C.M. 2024. Interaction of Zinc Mineral Nutrition and Plant Growth-Promoting Bacteria in Tropical Agricultural Systems: A Review. *Plants (Basel)*. 13(5):571. doi: 10.3390/plants13050571.
95. Jamami, N., Büll, L. T., Corulli Corrêa, J. y Domingos Rodrigues, J. 2006. Resposta da cultura do milho (*Zea mays* L.) à aplicação de boro e de zinco no solo. *Acta Scientiarum. Agronomy* 28 (1): 99-105.
- 96.José, J. F. B. de S., Hernandez, M. A. S., Lisboa, B. B., Volpiano, C. G., Schlindwein, G., Trindade, J. K. da., Lattuada, D. S., Beneduzi, A., yVargas, L. K. 2024. Seed size and *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 inoculation influences germination and early seedling vigor of *Acacia mearnsii*. *Ciência Florestal*, 34(4), e85546. <https://doi.org/10.5902/1980509885546>

- 97.Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., y Mehnaz, S. 2017. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2593. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02593>
- 98.Kaur, M., y Karnwal, A. 2023. Screening of endophytic Bacteria from stresstolerating plants for abiotic stress tolerance and plant growth-promoting properties: Identification of potential strains for bioremediation and crop enhancement. *Journal of Agricultural and Food Research*, 14, 100723. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100723>
- 99.Kaushal, P. y Pati, A.M. 2025. Unleashing rhizobacteria for sustainable soil remediation: PGPR roles in heavy metal tolerance, detoxification, and plant productivity. *Front Microbiol.* 9; 16:1662000. doi: 10.3389/fmicb.2025.1662000.
- 100.Khaledi, F., Balouchi, H., Dehnavi, M.M. y Salehi, A. 2025. Enhancing maize yield, water use efficiency, and Zn content under drought stress by applying Zn-solubilizing bacteria. *Agricultural Water Management* 308(2):109313 DOI: 10.1016/j.agwat.2025.109313
- 101.Khan, S. T., Malik, A., Alwarthan, A. y Shaik, M. R. 2022. The enormity of the zinc deficiency problem and available solutions; an overview. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103668. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103668>
- 102.Kihara, J., Sileshi, G. W., Bolo, P., Mutambu, D., Senthilkumar, K., Sila, A., Devkota, M. y Saito, K. 2024. Maize-grain zinc and iron concentrations as influenced by agronomic management and biophysical factors: a meta-analysis. *Food Security* 16, 1147–1173. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-024-01478-5>
- 103.Koevoets, I.T., Venema, J.H., Elzenga, J.T.M. y Testerink, C. 2016. Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Front. Plant Sci.* 7:1335. doi: 10.3389/fpls.2016.01335
- 104.Köhler, F. E. 1897. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte (Vol. 2). Gera-Untermhaus, Germany: Franz Eugen Köhler.
- 105.Khoso, M.A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, Q., Poudel, T.R., Manghwar, H. y Liu, F. 2024. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 11, 100341. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341>
- 106.Kjeldahl, J. 1883. A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01338151>

- 107.Koritschoner, J. J., Whitworth-Hulse, J. I., Cuchietti, A. y Arrieta, E. M. 2023. Spatial patterns of nutrients balance of major crops in Argentina. *Science of the Total Environment*, 858, 159863. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159863>
- 108.Kumar, R., Swapnil, P., Meena, M., Selpair, S. y Yadav, B. G. 2022. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Approaches to alleviate abiotic stresses for enhancement of growth and development of medicinal plants. *Sustainability* 14(23), 15514. DOI: <https://doi.org/10.3390/su142315514>
- 109.Lamichhane, S., Shrestha, S., Bogati, S., Sharma, S. y Shrestha, A. 2024. Effect of Micronutrient Seed Priming on Maize (*Zea Mays* L.) Germination and Seedling Growth. i *TECH MAG*, Vol 6:92.95. DOI: <http://doi.org/10.26480/itechmag.06.2024.92.95>
- 110.Lemire, J.A., Harrison, J.J. y Turner, R.J. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 11(6):371-84. doi: 10.1038/nrmicro3028.
- 111.Lindenmayer, R. 2007. Zinc fertilization: a review of scientific literature. Colorado State University, Fort Collins. www.kronoslp.com/Editor/assets/zinc_fertilization.doc.pdf
- 112.Liu, D. Y., Liu, Y. M., Zhang, W., Chen, X. P. y Zou, C. Q. 2019. Zinc uptake, translocation, and remobilization in winter wheat as affected by soil application of Zn fertilizer. *Frontiers in Plant Science* 10: 426. DOI <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00426>
- 113.Liu, X. W., Yu, Y. H., Huang, S. B., Xu, C. C., Wang, X. Y. y Gao, J. 2022. The impact of drought and heat stress at flowering on maize kernel filling: Insights from the field and laboratory. *Agr. For. Meteorol.* 312, 108733. doi: 10.1016/j.agrformet.2021.108733
- 114.Ljubičić, N., Popović, V., Kostić, M., Pajić, M., Buđen, M., Gligorević, K., Dražić, M., Bižić, M., y Crnojević, V. 2023. Multivariate Interaction Analysis of *Zea mays* L. Genotypes Growth Productivity in Different Environmental Conditions. *Plants*, 12(11), 2165. <https://doi.org/10.3390/plants12112165>
- 115.Lynch, J.P. 2007. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany.* 55:1-20.
- 116.Lynch, J.P. 2013. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Ann Bot.*112(2):347-57. doi: 10.1093/aob/mcs293.

- 117.Ma, M., Jiang, X., Wang, Q., Guan, D., Li, L., Ongena, M. y Li, J. 2018. Isolation and identification of PGPR strain and its effect on soybean growth and soil bacterial community composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 20(6), 1289-1297.
- 118.Manjeet, P.K., Verma, V.P.S., Sangwan, M. y Nisha. 2019. Assessment of genetic variability for seed germination per cent and seedling vigour traits in sesame (*Sesamum indicum* L.). *J Pharmacogn Phytochem.* 8(6):328-331.
- 119.Maroniche, G. A., Puente, M. L., García, J. E., Mongiardini, E., Coniglio, A., Nievas, S., Labarthe, M. M., Wisniewski-Dyé, F., Rodríguez Cáceres, E., Díaz-Zorita, M., y Cassán, F. 2024. Phenogenetic profile and agronomic contribution of *Azospirillum argentinense* Az39^T, a reference strain for the South American inoculant industry. *Microbiological Research*, 283, 127650.<https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127650>
- 120.Marques, D.M., Magalhães, P.C., Marriel, I.E., Gomes Júnior, C.C., da Silva, A.B. y de Souza, T.C. 2021. Gas Exchange, Root Morphology and Nutrients in Maize Plants Inoculated with *Azospirillum brasilense* Cultivated under Two Water Conditions. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 64, e21190580. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021190580>
- 121.Marschner, H. 2011. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. DOI <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- 122.Marschner, P. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (3rd ed.). Academic Press.
- 123.Marschner, H. y Marschner, P. 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>
- 124.Martínez-Cuesta, N., Carciochi, W., Sainz-Rozas, H., Salvagiotti, F., Colazo, J. C., Wyngaard, N., Eyherabide, M., Ferraris, G. y Barbieri, P. 2020. Effect of zinc application strategies on maize grain yield and zinc concentration in mollisols. *Journal of Plant Nutrition* 43: 1-12. DOI <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1844754>
- 125.Michiels, C. L., y Ruffo, M. L. 2012. El zinc limita el rendimiento del maíz en la región pampeana argentina. En *Actas del XIX Congreso Latinoamericano y XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (CD-ROM)*. Mar del Plata, Argentina.

126. Miner, G. S., Delgado, J. A., Ippolito, J. A., Johnson, J. J., Kluth, D. y Stewart, C. E. 2022. Wheat grain micronutrients and relationships with yield and protein in the U.S. Central Great Plains. *Field Crops Research*, 279, 108453. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108453>
127. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). 2025a. Estimaciones agrícolas. Informe mensual 20 de marzo de 2025. Recuperado el: 20 de noviembre de 2025. https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/_archivos/estimaciones/250000_2025/250300_Marzo/250320_Informe%20mensual%20al%2003_2025.pdf
128. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP). 2025b. Resultado campaña maíz 2023/24. Recuperado de https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/cierre/_archivos/Resultado-Campana-Maiz-2023-24.pdf
129. Mirakhorli, T., Ardebili, Z.O., Ladan-Moghadam, A. y Danaee, E. 2021. Bulk and nanoparticles of Zn oxide exerted their beneficial effects by conferring modifications in transcription factors, histone deacetylase, carbon and nitrogen assimilation, antioxidant biomarkers, and secondary metabolism in soybean. *PLoS ONE*. 16(9): e0256905
130. Mumtaz, M. Z., Ahmad, M., Jamil, M., y Hussain, T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological Research*, 202, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>
131. Mutambu, D., Kihara, J., Mucheru-Muna, M., Bolo, P. y Kinyua, M. 2023. Maize grain yield and grain zinc concentration response to zinc fertilization: A meta-analysis. *Heliyon*, Volume 9, Issue 5. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2023.e16040
132. Nautiyal, N. y Shukla, K. 2013. Evaluation of seed priming zinc treatments in chickpea for seedling establishment under zinc deficient conditions. *J Plant Nutri* 36:2 (251-258). <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.739245>
133. Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 27(2-3):313-39. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2.
134. Nieves, S., Coniglio, A., Takahashi, W. Y., López, G. A., Larama, G., Torres, D., Rosas, S., Etto, R. M., Galvão, C. W., Mora, V. y Cassán, F. 2023. Unraveling *Azospirillum*'s colonization ability through microbiological and molecular evidence. *Journal of Applied Microbiology*, 134, lxad071. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad071>

- 135.Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. y Babalola, O. O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(197).
- 136.Ogutu, E. A., Madahana, S. L., Bhavani, S. y Macharia, G. 2024. Genotype $\times$ environment interaction: Trade-offs between agronomic performance and stability of durum wheat (*Triticum turgidum*) to stem rust resistance in Kenya. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1427483. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1427483>
- 137.Okon, Y. y Labandera-Gonzalez, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years' worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1591-1601. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)
- 138.Oliveira, F.E.L., Medeiros, J.F., Cunha, R.C., Souza, M.W.L. y Lima, L.A. 2016. Uso de bioestimulante como agente para aliviar el estrés salino en cultivos de palomitas de maíz. *Revista de Ciencias Agrícolas*. v.47, p.307-315
- 139.Palacios-Rojas, N., McCulley, L., Kaeppler, M., Titcomb, T.J., Gunaratna, N.S., Lopez-Ridaura, S. y Tanumihardjo, S.A. 2020. Mining maize diversity and improving its nutritional aspects within agro-food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*.19(4):1809-1834. doi: 10.1111/1541-4337.12552.
- 140.Paolilli, M.C., Cabrini, S.M., Fillat, F.A. y Pagliaricci, L.O. 2021 Evolución de la cadena de maíz en Argentina. Informe Técnico N°6, Centro Regional Buenos Aires Norte, INTA. Recuperado de Repositorio INTA.
- 141.Passioura, J. 2007. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *J Exp Bot*. 58(2):113-7. doi: 10.1093/jxb/erl212.
- 142.Passarelli, S., Free, C. M., Shepon, Al., Beal, T., Batis, C. y Golden, C. D. 2024.Global estimation of dietary micronutrient inadequacies: a modelling analysis. *The Lancet Global Health*, Volume 12, Issue 10. DOI: 10.1016/S2214-109X(24)00276-6
- 143.Pfennig, N. y Trüper, H. G. 1971. Higher taxa of the phototrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21, 17-18. <https://doi.org/10.1099/00207713-21-1-17>
- 144.Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., y Bakker, P.A.H.M. 2014. *Induced systemic resistance by beneficial microbes*. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

- 145.Praharaj, S., Skalicky, M., Maitra, S., Bhadra, P., Shankar, T., Brestic, M., Hejnak, V., Vachova, P., y Hossain, A. 2021. Zinc Biofortification in Food Crops Could Alleviate the Zinc Malnutrition in Human Health. *Molecules*, 26(12), 3509. <https://doi.org/10.3390/molecules26123509>
- 146.Raklami, A., Babalola, O.O., Jemo, M. y Nafis, A. 2024. Unlocking the plant growth-promoting potential of yeast spp.: exploring species from the Moroccan extremophilic environment for enhanced plant growth and sustainable farming. *FEMS Microbiol Lett* 371: fnae015 <https://doi.org/10.1093/femsle/fnae015>
- 147.Ratto, S., Fatta, N. y Lamas, M. 1991. Análisis foliar de cultivo. II. Microelementos. *Rev. Facultad de Agronomía*. 12: (1) 31 38.
- 148.Ratto, S. y Miguez, F. 2005. Zinc en el cultivo de maíz, deficiencia de oportunidad. [https://www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/\\$webindex/3D2EF1F58D7E213805257268004D56B5/\\$file/Zinc+en+el+Cultivo+de+Ma%C3%ADz,+Deficiencia+de+Oportunidad.pdf](https://www.ipni.net/ppiweb/iaecu.nsf/$webindex/3D2EF1F58D7E213805257268004D56B5/$file/Zinc+en+el+Cultivo+de+Ma%C3%ADz,+Deficiencia+de+Oportunidad.pdf)
- 149.Reed, R.C., Bradford, K.J. y Khanday, I. 2022. Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. *Heredity (Edinb)*. 128(6):450-459. doi: 10.1038/s41437-022-00497-2.
- 150.Rehman, A., Farooq, M., Ozturk, L., Asif, M. y Siddique, K. H. 2017. Zn nutrition in wheat-based cropping systems. *Plant and Soil*, 422, 283-315. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3507-3>
- 151.Rengel, Z. y Graham, R.D., 1995. Importance of seed Zn content for wheat growth on Zn deficient soil. *Plant Soil* 173, 259-266.
- 152.Rengel, Z., 2002. Genetic control of root exudation. *Plant Soil* 245, 59-70.
- 153.Richardson, A.E., Barea, JM., McNeill, A.M. y Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305-339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- 154.Ritchie, S.W., y Hanway, J.J. 1982. How a corn plant develops. Spec. Rep. 48. Iowa State Univ. Coop. Ext. Serv., Ames.
- 155.Rodríguez Cáceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- 156.Sadeghzadeh, B. 2013. A review of zinc nutrition and plant breeding. *Journal of Soil Science*

- and Plant Nutrition, 13(4). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000072>
- 157.Sahoo, R.K., Ansari, M.W., Pradhan, M., Dangar, T.K., Mohanty, S. y Tuteja, N. 2014. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma*: 251(4): 943-953.
 - 158.Sainz Rozas, H., Reussi Calvo, N., Eyherabide, M., Angelini, H., González San Juan, M. F., Ciarlo, E., D'Elia, M., Zarza, S., y Pereyra, N. 2025. *Impacto de la agricultura sobre la fertilidad de los suelos de la región pampeana*. Simposio Fertilidad 2025.
 - 159.Santos, M.P., Martínez, S.J., Yarte, M.E., Carletti, S.G. y Larraburu, E.E. 2022 Effect of *Azospirillum brasilense* on the *in vitro* germination of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Schinn. (*Gentianaceae*), Scientia Horticulturae, Volume 299. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111041>.
 - 160.Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. C. y Glick, B. R. 2021. Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
 - 161.Savin, R. 2003. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. ISBN 950-29-0713-2. Pp.146151.
 - 162.Scudeletti, D., Costa Crusciol, C.A., Momesso, L., Bossolani, J.W., Moretti, L.G., De Oliveira, E.F., Servaz Tubaña, B., de Almeida Silva, M., Quassi de Castro, S.G. y Hungria, M. 2023 Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential.European Journal of Agronomy, 144, 126749, ISSN 1161-0301, <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>
 - 163.Sharma, S. K., Sharma, M. P., Ramesh, A. y Joshi, O. P. 2012. Characterization of zinc-solubilizing *Bacillus* isolates and their potential to influence zinc assimilation in soybean seeds. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 352-359. <https://doi.org/10.4014/jmb.1106.05063>
 - 164.Sharma, S., Kumar, V., Shukla, S. y Ramesh, D. 2022. Diazotrophic Bacteria Is an Alternative Strategy for Increasing Grain Biofortification, Yield and Zn Use Efficiency of Maize. *Plants*, 11(9):1125. DOI: 10.3390/plants11091125
 - 165.Siddiqi, K.S., Rahman, U., Tajuddin, A. y Husen, A. 2018. Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Res Lett.* 8;13(1):141. doi: 10.1186/s11671-018-2532-3.

- 166.Silva, P. S. T., Cassiolato, A. M. R., Galindo, F. S., Jalal, A., Nogueira, T. A. R., Oliveira, C. E. d. S. y Filho, M. C. M. T. 2022. *Azospirillum brasilense* and Zinc Rates Effect on Fungal Root Colonization and Yield of Wheat-Maize in Tropical Savannah Conditions. *Plants*, 11(22), 3154. <https://doi.org/10.3390/plants11223154>
- 167.Singh, S.K., Wu, X., Shao, C. y Zhang, H. 2022. Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biol.* 2022 Jan 10;2(1):3. doi: 10.1007/s44154-021-00027-w.
- 168.Sivasakthivelan, P., Saranraj, P., Al-Tawaha, A. R., Amala, K., Imran, Amanullah, Al-Tawaha, A. R., Thangadurai, D., Sangeetha, J., Rauf, A., Khalid, S., Alsultan, W., y Alwedyan, M. 2021. Adaptation of *Azospirillum* to stress conditions: A review. *Advances in Environmental Biology*, 15(4), 1-5. <https://doi.org/10.22587/aeb.2021.15.4.1>
- 169.Sixto, H., Escorial, C., García-Baudín, J.M. y Chueca, M.C., 1997. Efecto del herbicida glifosato sobre la germinación de semillas de cereales. Método rápido de selección. *Actas Congreso SEMh Valencia*. 93-96
- 170.Somasegaran, P. y Hoben, H.J. 1994 *Handbook for Rhizobia: Methods in Legumes-Rhizobium Technology*. Springer-Verlag, New York, Inc., 450. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- 171.Song, X., Lyu, S. y Wen, X. 2020. Limitation of soil moisture on the response of transpiration to vapor pressure deficit in a subtropical coniferous plantation subjected to seasonal drought. *Journal of Hydrology*, 591-125301. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125301>
- 172.Spaepen, S. y Vanderleyden, J. 2015. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis. *Biological nitrogen fixation*: 937-940.
- 173.Strzelczyk, E., Kampert, M. y Li, C.Y. 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*: 149(1): 55-60.
- 174.Suganya, A., Saravanan, A. y Manivannan, N. 2020. Role of zinc nutrition for increasing zinc availability, uptake, yield, and quality of maize (*Zea mays* L.) grains: an overview. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*51, 2001-2021. doi: 10.1080/00103624.2020.1820030
- 175.Takahashi, W. Y., Galvão, C., Cassán, F., Urrea-Valencia, S., Stremel, A., Stets, M.I., Kremer, M.A.S, Jesus, E.C. y Etto, R.M. 2024. Tracking maize colonization and growth promotion by *Azospirillum* reveals strain-specific behavior and the influence of inoculation

- method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 215, 108979. DOI <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108979>
176. Tarrand, J., Krieg, N. y Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, 967-980. <https://doi.org/10.1139/m78-160>
 177. Taylor, K.R., Staggenborg, S.A., Godsey, C.B., Schlegel, A.J. y Kochenower, R.D. 2014. A method to evaluate seeder performance. *GSTF Journal on Agricultural Engineering*. 1(1):38-42. doi.org/10.5176/2345-7848_1.1.5
 178. Tittabutra, P., Payakaponga, W., Teaumroong, N., Singleton, P. W. y Boonkerd, N. 2007. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *ScienceAsia* 33: 69-76. DOI <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.06>
 179. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F. y Prigent-Combaret, C. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4: 356.
 180. van Ittersum, M. K., Cassman, K. G., Grassini, P., Wolf, J., Titttonell, P. y Hochman, Z. 2013. Yield gap analysis with local to global relevance—A review. *Field Crops Research*, 143, 4-17. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.09.009>
 181. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
 182. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
 183. Volmer, E. y Ratto, S. 2005. Disponibilidad de cinc, cobre, hierro y manganeso extraíble con DTPA en suelos de Córdoba (Argentina) y variables edáficas que la condicionan. *Ci. Suelo* 23 (2): 107-114.
 184. Wankhade, A., Wilkinson, E., Britt, D. W. y Kaundal, A. 2025. A Review of Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Role of Root Exudates in Microbiome Engineering. *Applied Sciences*, 15(13), 7127. <https://doi.org/10.3390/app15137127>
 185. Wang, Y., Thorup-Kristensen, K., Jensen, L.S. y Magid, J. 2016. Vigorous root growth is a

- better indicator of early nutrient uptake than root hair traits in spring wheat grown under low fertility. *Front. Plant Sci.*, 7, p. 865, 10.3389/fpls.2016.00865
186. Wang, C., Fu, B., Zhang, L. y Xu, Z. 2019. Soil moisture-plant interactions: an ecohydrological review. *J Soils Sediments* 19, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2167-0>
 187. Yilmaz, A., Ekiz, H., Gültekin, I., Torun, B., Barut, H., Karanlik, S. y Cakmak, I. 1998. Effect of seed Zn content on grain yield and Zn concentration of wheat grown in Zn-deficient calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 21, 2257-2264.
 188. Younas, N., Fatima, I., Ali Ahmad, I. y Khubaib Ayyaz, M. 2023. Alleviation of zinc deficiency in plants and humans through an effective technique; biofortification: A detailed review. *Acta Ecologica Sinica*, Volume 43, Issue 3. Pages 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.07.008>.
 189. Zhang, T., Shuxiang, Fan., Xiang, Y., Zhang, S., Wang, J. y Sun, Q. 2020. Non-destructive analysis of germination percentage, germination energy and simple vigour index on wheat seeds during storage by Vis/NIR and SWIR hyperspectral imaging, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 239, 118488, ISSN 1386-1425, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118488>.