

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Trabajo final presentado para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo

Respuesta de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) a salinidad por NaCl y
Na₂SO₄ y su regulación por la inoculación
con *Azospirillum brasilense*

Lorena Bricchi
DNI: 30.265-728

Director: Dra. Virginia Luna
Co-Directora: Dr. Fabricio Cassán

Río Cuarto, Córdoba, Argentina
Agosto 2010

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Respuesta de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) a salinidad por NaCl y Na₂SO₄ y su
regulación por la inoculación
con *Azospirillum brasilense*

Autor: Bricchi Lorena

DNI: 30.265.728

Director: Dra. Virginia Luna

Co-Director: Dr. Fabricio Cassán

Aprobado y corregido de acuerdo a las sugerencias del jurado evaluador:

1-Caminos Teresa

2-Exposito Gabriel

3-Luna Virginia

Fecha de presentación:

Aprobado por Secretaría Académica:

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la ayuda de todas y cada una de las personas que a continuación citaré:

- Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.
- Agradecer hoy y siempre a mi familia ya que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles. A mis padres Raúl y Analía y a mis abuelos Santiago, Juana y Paulina que siempre me dieron su cariño y apoyo incondicional.
- De igual manera mi más sincero agradecimiento a la Dra. Virginia Luna por su apoyo, quien con su pensamiento crítico me guió y aportó todas las herramientas básicas necesarias para recorrer el camino científico en la realización de este trabajo.
- Al Dr. Fabricio Cassán por su calidez, sugerencias y confianza necesaria para desarrollar cada punto del trabajo final realizado y de lo que estoy muy profundamente agradecida.
- A mis amigos por haberme brindado su cariño y amistad en esta etapa de la vida y finalmente, a tanta otra gente que forma o formó parte de mi vida, contribuyendo a la persona que hoy en día soy, las cuales sería muy extenso nombrar, a todos sólo me queda decirles GRACIAS!!

INDICE

Certificado de aprobación	II
Agradecimientos	III
Indice	IV
Indice de figuras	V
Indice de Tablas	VI
Resumen	VII
Summary	VIII
Fundamentación	1
Antecedentes Generales	2
Origen e Historia del cultivo	2
El cultivo de Maíz en nuestro país	2
Característica morfofisiológicas.	3
La salinidad de los suelos y el rol de las rizobacterias en respuesta al estrés	3
Papel de ácido abscísico (ABA) en la respuesta de la planta al estrés.	6
Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento de <i>Azospirillum sp</i>	6
Hipótesis	7
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Materiales y Métodos	9
Material Vegetal	9
Inoculante comercial	9
Condiciones generales del ensayo de germinación en cámara	9
Determinación de ABA.	10
Resultados	12
Crecimiento del cultivo. Longitud de la parte aérea	12
Peso fresco y seco aéreo y radical	14
Conclusiones	27
Bibliografías citadas	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Efecto de la salinización sobre la longitud de la parte aérea.	12
Figura 2	Peso fresco aéreo y radical de plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland.	15
Figura 3	Peso fresco aéreo y radical de plántulas de maíz salinizadas e inoculadas con <i>A. brasiliense</i> Az39.	16
Figura 4	Peso seco aéreo y radical de plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland.	18
Figura 5	Peso fresco aéreo y radical de plántulas de maíz salinizadas e inoculadas con <i>A. brasiliense</i> Az39	20
Figura 6	Índice de crecimiento en base al peso fresco de plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland o inoculadas con <i>Azospirillum sp.</i>	22
Figura 7	Índice de crecimiento en base al peso seco de plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland o inoculadas con <i>Azospirillum sp.</i>	23
Figura 8	Respuesta vegetal a la salinización como producción de ácido abscísico (ABA) en plántulas de maíz inoculadas con <i>A. brasilense</i> Az39 o fertilizadas con solución completa de Hoagland.	25

INDICE DE TABLAS

Tabla I Análisis estadístico generado con software PRISM 4.0 con el ajuste de las curvas de crecimiento sigmoideal de cada tratamiento.	12
Tabla II Análisis estadístico de ANOVA a nivel de peso fresco.	17
Tabla III Porcentaje de disminución del Peso Fresco con respecto al control no salinizado en plántulas de maíz fertilizadas o inoculadas con <i>Azospirillum brasilense</i> y sometidas a salinidad.	18
Tabla IV Análisis estadístico de ANOVA a nivel de peso seco.	20
Tabla V Porcentaje de disminución del Peso Seco con respecto al control no salinizado en plántulas de maíz fertilizadas o inoculadas con <i>Azospirillum brasilense</i> y sometidas a salinidad.	21

RESUMEN

RESPUESTA DE PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) A SALINIDAD POR NaCl Y Na₂SO₄ Y SU REGULACIÓN POR LA INOCULACIÓN CON *Azospirillum brasilense*

La generación de nuevas estrategias para mejorar la implantación de cultivos de interés económico, como el maíz (*Zea mays* L.) en condiciones edáficas limitantes (salinidad y déficit hídrico), representa una importante área de investigación y una variante tecnológica para el sector agrícola-ganadero de la región centro del país. Así, la comprensión de la base fisiológica de la respuesta a la salinidad de una especie agrícola como el maíz, se consideraría un tema prioritario de estudio. En tal, sentido, una estrategia para incrementar la respuesta del cultivo en suelos salinos, se relacionaría con la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento, tal como *Azospirillum* sp., la que produciría un eficiente uso de las fuentes minerales e hídricas por un aumento del volumen radical, así como una regulación compartida de la respuesta de la planta al estrés, lo que indefectiblemente induciría a un aumento en el crecimiento y una mejor implantación en condiciones limitantes de crecimiento. A su vez la fitohormona ácido abscísico (ABA) juega un rol importante en la adaptación de las plantas a los distintos tipos de estrés ambiental. En base a esto, la hipótesis de este trabajo sostiene que la salinización con NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isoosmótica en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) podrían afectar de manera diferencial el crecimiento y la respuesta a la condición de estrés salino y que tal respuesta se modificaría positivamente por la inoculación con rizobacterias del genero *Azospirillum*. El modelo experimental utilizado en este trabajo se baso en la evaluación del crecimiento en plántulas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* o sin inocular, en cultivos hidropónicos suplementados con soluciones de 50; 100 y 150 mM de NaCl (para generar potenciales osmóticos -0.37; -0.45 y -0.65 MPa, respectivamente); soluciones equivalentes de Na₂SO₄ o de la mezcla isoosmótica de ambas sales. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron establecer que la salinización de plántulas de maíz afectó su crecimiento independientemente de la sal utilizada; sin embargo, el efecto del Na₂SO₄ fue el de mayor toxicidad en todos los tratamientos evaluados. En contrapartida, la mezcla isosmotica de sales revirtió al menos parcialmente, el efecto individual de cada sal. La inoculación con *Azospirillum* sp. mejoró la respuesta vegetal al estrés abiótico generado por la salinidad y esta reversión alcanzó hasta un 20 % de diferencia con respecto a los tratamientos fertilizados en aquellos tratamientos sometidos al menor potencial osmótico (-0.65 MPa) de Na₂SO₄. Con respecto a la producción de ácido abscísico (ABA), esta molécula tuvo una mayor concentración en aquellas plántulas inoculadas y salinizadas, sobre todo en los tratamientos con Na₂SO₄ y tal condición fue revertida, al menos en parte por la adición de la mezcla isosmótica de sales. Los resultados permitirían proponer la importancia de la inoculación con *Azospirillum* sp.

sobre semillas de maíz (*Zea mays* L.) como una estrategia de bajo costo para mejorar el comportamiento del cultivo en condiciones sub-óptimas de crecimiento, tal como el estrés hídrico, salino u osmótico.

Palabras clave: estrés abiótico; ácido abscísico; fitohormonas; PGPR.

SUMMARY

MAIZE SEEDLINGS RESPONSE TO NaCl AND Na₂SO₄ AND THE REGULATION BY *Azospirillum brasilense* INOCULATION

An interesting area of agronomic research worldwide is that related to the generation of new strategies to improve the implantation and productivity of several crops, as maize (*Zea mays* L.) in water restricted or salinity soil conditions. Understand the physiological basis of the maize response to salinity conditions, would be considered a priority topic of study and this knowledge could be considered an unvalued technological tool for the agriculture and livestock producers located in the central region of Argentina. In this sense, a new strategy to increase crop productivity in saline conditions, would be relate to the use of plant growth promoting rhizobacteria, as *Azospirillum* sp., which would lead to an efficient exploitation of mineral and water sources in soils trough two mechanisms: (1) increasing the root volume and biomass or sharing the regulation of plant response by the production of different compounds, as the abscisic acid (ABA). This phytohormone plays the most important role in the environmental stress adaptation in many plants species worldwide and would be considered a universal physiological stress marker. Hypothesis of this work argues that the NaCl, Na₂SO₄ or isosmotic mixture salinization on maize (*Zea mays* L.) seedlings, could differentially affect their growth and stress response as ABA production and additionally would change positively by the *Azospirillum* sp. inoculation. For that, inoculated or control maize seedlings was cultured in hydroponic solution supplemented with 50; 100 and 150 mm of NaCl (to generate osmotic potentials of -0.37; -0.45 and -0.65 MPa, respectively); equivalent solutions of Na₂SO₄ or the bisaline mixture. Results obtained in this work allowed establishing that the maize seedling salinization affected his growth independently of the kind of salt in the solution; nevertheless, the Na₂SO₄ effect was the most toxic for the plant in all evaluated treatments. In the other hand, the bisaline solution reverted at least partially, the individual effect of every salt added to the plant. Inoculation with *Azospirillum* sp. improved the plant response to the abiotic stress conditions generated by salts and this reversion reached up to 20 % better compared to the treatments fertilized with mineral solutions at osmotic potential minor to -0.65 MPa of Na₂SO₄. About the ABA

production, this molecule had a major concentration in salinized and inoculated seedlings especially the treatments with Na₂SO₄. This condition was reverted; at least partly, due to the addition of the bisaline mixture. Results would allow to propose the importance of the inoculation with *Azospirillum* sp. on maize (*Zea mays* L.) seeds as a low cost strategy to improve the crop productivity in sub-optimal conditions, such as saline or osmotic stress.

Keywords: abiotic stress; abscisic acid; phytohorm

1. Fundamentación

La generación de nuevas estrategias destinadas a mejorar la implantación de cultivos de interés económico, como el maíz (*Zea mays* L.) y otras especies de alta producción nacional, así como la obtención de alternativas destinadas a incrementar su productividad y rendimiento, aún en condiciones edáficas limitantes (salinidad y déficit hídrico), representa una importante área de investigación y una variante tecnológica para el sector agrícola-ganadero de la región centro del país. La salinidad de los suelos representa la mayor causa de estrés abiótico en plantas cultivables en el mundo. En la actualidad, cerca del 20% de las tierras cultivables y casi la mitad de las tierras irrigadas en todo el planeta están afectadas por salinidad (Rhoades y Loveday, 1990). De esta manera, la búsqueda de poblaciones vegetales más tolerantes, así como la comprensión de la base fisiológica de su respuesta a la salinidad, se considera como un tema prioritario de estudio. En los suelos salinizados del sur de Córdoba, las sales predominantes son NaCl y SO_4Na_2 (Cisneros y *et al.*, 1999). Según Egan y Ungar (1998), muy pocos estudios enfocan los efectos del SO_4Na_2 en el crecimiento vegetal, a pesar de ser de interés creciente la comparación de los mismos con los del NaCl. Por otra parte, el ácido abscísico (ABA) desempeña un papel fundamental en la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés ambiental y se ha probado que adicionalmente a su bien conocida función en el cierre estomático, la tolerancia de los tejidos se ve incrementada significativamente con elevadas concentraciones de esta fitohormona (Hartung y Jesschke, 1999), ya que se considera el compuesto químico de mayor relevancia y jerarquía dentro de los mecanismos de respuesta al estrés hídrico o salino. Una posible alternativa para mejorar la respuesta vegetal en condiciones de salinidad, se basa en la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento o fijadoras de nitrógeno de los géneros *Bradyrhizobium* o *Azospirillum*, con el fin de mejorar la implantación y productividad de los cultivos. Estas bacterias tienen múltiples formas de interactuar con las plantas, dentro de las que se destacan la promoción directa del crecimiento por el aporte de algún nutriente esencial, tal como el nitrógeno o fósforo, o el incremento en la velocidad de germinación y formación de estructuras primarias de crecimiento mediada por la producción de fitohormonas o de otros compuestos reguladores. Otra manera de asociarse, se relaciona con el fortalecimiento de los mecanismos naturales de defensa a condiciones de estrés biótico o abiótico a través de procesos fisiológicos complejos, tal como la resistencia sistémica inducida (RSI) o la osmoregulación en caso de estrés hídrico o salino (Fornasero *et al.*, 2007). En trabajos previos de nuestro laboratorio, evaluamos la respuesta de germinación y crecimiento de plántulas de soja (Ramadú *et al.*, 2007) y maíz (Calcagno *et al.*, 2007), inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* en condiciones hidropónicas de estrés salino generadas por soluciones de NaCl o Na_2SO_4 . De esta manera, pudimos probar que la incorporación de microorganismos en ambas especies, permitía contrarrestar, al menos en

parte el efecto deletéreo de las sales sobre el crecimiento y desarrollo de cada cultivo. En este trabajo, intentamos probar que además del crecimiento, el estado fisiológico de las plantas sometidas a salinidad e inoculadas es diferente al de las no inoculadas, a nivel de la producción de una molécula clave en la respuesta a estrés salino e hídrico en plantas, el ácido abscísico (ABA).

2. Antecedentes generales

2.1. Origen e Historia del cultivo

El maíz pertenece a la familia de las Poáceas (gramíneas), es una de las especies domesticadas de mayor antigüedad en el continente americano. Su origen se estima en 6000-7000 años AC. Fue la base de la alimentación de las antiguas civilizaciones americanas, como Mayas, Aztecas e Incas. Los colonizadores tuvieron contacto con el maíz en 1492 con la llegada de Colón. Los indígenas hicieron la selección para los diferentes ambientes debido a que esta especie no se distribuye por sí misma (la espiga cae y muere por competencia); fueron los aborígenes los encargados de mantener su evolución. Durante este tiempo se obtuvieron variedades de maíces amiláceos dulces, reventones, duros, y dentados. Es una de las bases de la alimentación mundial junto con el trigo y el arroz y sus principales países productores son: EE.UU., China, Brasil, Unión Europea, México, Argentina con una producción mundial de aprox. 776 millones de Tn.año⁻¹ (Agropanorama, 2008). Según cifras del Fondo Monetario Internacional (FMI), desde el año 2005 hasta junio del 2008 el precio de este grano creció un 137%, en un promedio de 34% por año. Lo anterior, a pesar de que determinó un aumento en la producción mundial de 9.5% en el 2008, con 772 millones de toneladas mas que la presentada en 2007 (Medina Cazares, 2007)

2.2. El cultivo de maíz en nuestro país

Se siembra principalmente en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y San Luis, de acuerdo con las diferentes características agroclimáticas de cada región. La superficie sembrada durante la última campaña (2008-2009) fue de 3.360.000 ha, con una producción estimada entre los 12.5 y 13.8 millones de toneladas año⁻¹. Tanto el área sembrada como la producción obtenida, disminuyeron con respecto a la campaña anterior (2007-2008) en la que se obtuvieron 4.240.000 ha y 22.0 millones de toneladas año⁻¹ respectivamente (SAGPYA, 2009). Condiciones hídricas y ambientales inadecuadas generadas por alta temperatura, escasez de lluvias o precipitaciones intermitentes o de cobertura irregular en etapas vegetativas y reproductivas del ciclo, determinaron que cerca de 1 millón de hectáreas no produjeran granos para ingresar al circuito comercial. Tales condiciones, así como otras económicas habrían desplazado unas 865.000 Has de maíz a la soja, por lo que la superficie cultivada disminuyó cerca de un 20,4

% . La merma en la producción sería estimada en un 36,0 %, respecto de la campaña 2007-2008 (BCR, 2009). Con esta menor producción, el saldo exportable de maíz de la Argentina se vio igualmente comprometido, y en este sentido, el USDA (United State Department of Agriculture), proyectó un volumen de exportaciones de 7 millones de toneladas para 2008-2009 y por primera vez en la historia, nuestro país dejaría de ser el segundo exportador mundial. Nuestro lugar será ocupado por nuestro vecino y socio del Mercosur, Brasil, con un saldo exportable proyectado de 10 millones de toneladas.año⁻¹ (La Nación, 2009).

2.3. Características morfofisiológicas

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie de crecimiento anual que alcanza una altura de hasta 3 m. Presenta un tallo simple erecto, de elevada longitud, robusto y sin ramificaciones. El maíz es de inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina, separadas dentro de la misma planta. La masculina en una panoja apical y las femeninas en espigas axilares protegidas por brácteas foliáceas. Tiene hojas largas, de gran tamaño, lanceoladas, alternas, paralelinervadas, abrazadas al tallo y con vellosidades en el haz. Las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje para la planta. En algunos casos sobresalen unos nudos de estos órganos a nivel del suelo y suele ocurrir en raíces secundarias o adventicias (Días Roig, 2001) Requiere climas tropicales, subtropicales y templados, se cultiva en altitudes hasta 4000 msnm. En cuanto a la variación de pH el óptimo se encuentra entre 6 - 7.5 y desde el punto de vista nutricional, los nutrientes que requiere por tonelada de grano son: 25 kg. de Nitrógeno, 4 kg de Fósforo, 19 kg de Potasio, 6 kg de Magnesio y 3 kg de Azufre. Se han conseguido rendimientos potenciales que superan los 20 Tn.Ha⁻¹ (INTA, 1999).

2.4. La salinidad de los suelos y el rol de las rizobacterias en respuesta al estrés

A medida que la población mundial se incrementa, se torna necesario encontrar nuevos modos de mejorar la productividad agrícola y el aprovechamiento de los recursos disponibles. Una manera de lograrlo es desarrollar cultivos tolerantes a diferentes estreses abióticos como sequía, inundación, altas y bajas temperaturas, congelamiento y salinidad, con el fin de que las superficies de tierras desaprovechadas puedan ser convertidas en cultivables. Con los métodos tradicionales de mejoramiento vegetal, llegar a lograr esta meta es laborioso y de largo plazo, y depende de la variabilidad genética existente. Actualmente, la ingeniería genética puede ser utilizada como un medio relativamente rápido y preciso para mejorar la tolerancia a distintos tipos de estrés. Muchos organismos han desarrollado características que les permiten sobrevivir en ambientes extremos, y los genes que confieren esas propiedades pueden ser potencialmente introducidos en plantas superiores, contándose con intentos exitosos en los últimos años (Winicov y Bastola, 1999; Apse *et al.*, 1999) pero,

para que esto sea posible, es necesario conocer primero las bases fisiológicas y bioquímica de la tolerancia de las especies que nos interesa mejorar.

En nuestro país, al menos 34.000.000 de hectáreas están sometidas al exceso de agua y sales minerales y por ello, sujetas a una drástica reducción en su productividad. Desde el punto de vista agrícola, se considera que un suelo es salino cuando su conductividad eléctrica es igual ó superior a 4dS m^{-1} . El lavado de suelos por riego continuo, ha reducido el problema en algunos países del mundo, pero los costos de esta tecnología no siempre están al alcance del productor, por lo que se ha recurrido al empleo de cultivos con mayor tolerancia a la condición (Chan, 2008).

Una cantidad excesiva de las sales en el suelo generan sobre las plantas tres tipos de estrés: osmótico, nutricional y salino. El primero está generado por una disminución del potencial osmótico (ψ_o) del suelo que disminuye la disponibilidad de agua para la planta. En el caso de las alteraciones nutricionales, se producen por la incapacidad de absorber ciertos iones o elementos esenciales (nutrientes) junto con el agua y finalmente el estrés salino, generado por la toxicidad casi siempre inducida por los aniones Cl^- o SO_4^{2-} o el catión Na^+ . La suma de estas condiciones origina una reducción en el crecimiento de la planta, como consecuencia del descenso de la conductividad hidráulica del suelo y la disminución del contenido de oxígeno necesario para la respiración a nivel radical (INTA, 1999). Según Gadallah (1996), además de la reducción del crecimiento, se producen efectos antagónicos o sinérgicos en la absorción de iones que son de interés particular y que están en elevada concentración en la solución externa (por ej. Na^+ Cl^- o Ca^{+2}) que son incorporados a gran velocidad y se acumulan en el tejido, inhibiendo la incorporación de otros iones por la raíz (por ej. K^+). En sistemas naturales, el grado de salinización y el tipo de sales presentes varía en los diferentes tipos de suelo y con la fuente de provisión de agua de los mismos. En la mayoría de los casos, los principales cationes presentes en la solución son Na^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} , mientras que los principales aniones son Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- (Gattan y Grieve, 1999).

Resulta evidente que la exposición de un organismo a estrés, trae aparejadas importantes modificaciones fisiológicas que afectan el normal crecimiento y desarrollo del individuo. La estrategia de las plantas para tolerar esta condición, está direccionada a la activación de múltiples vías metabólicas, tendientes a: (1) facilitar la retención y/o adquisición de agua, (2) proteger la funcionalidad de las células, (3) modificar la estrategia de crecimiento y (4) mantener la homeostasis en general. Frente al estrés salino se observa el aumento de succulencia (Reimann y Breckle, 1995), adaptación desarrollada aparentemente más para la reducción de la pérdida de agua que para el mantenimiento de la actividad fotosintética (Fischer y Turner, 1978; Longstreth y Nobel, 1979). Así, de acuerdo a su capacidad de crecer en un medio salino, las plantas se han clasificado en: (1) halófilas, cuando toleran (facultativas) o requieren (euhalófitas) altas concentraciones de NaCl para

completar su ciclo de vida y (2) glicófilas, cuando presentan una tolerancia moderada o sensibilidad a la condición. De manera similar, se han considerado cuatro niveles de respuesta para diversos cultivos en condiciones agronómicas: tolerantes (T), moderadamente tolerantes (MT), moderadamente sensibles (MS) y sensibles (S). Tal es el caso de la remolacha azucarera, la cebada y el algodón, entre otros considerados tolerantes (T) y que podrían utilizarse para reemplazar cultivos moderadamente sensibles (MS) o sensibles (S) (Shannon, 1997) para los que la salinidad impone una condición limitante en la producción (Xiong y Zhu, 2002).

En nuestro país existen poblaciones vegetales exitosamente adaptadas a suelos con baja disponibilidad hídrica o salinidad elevada y diferenciadas evolutivamente en la estrategia de tolerancia a tales condiciones. Estas poblaciones, poseen diversos mecanismos fisiológicos y bioquímicos que le permiten un crecimiento óptimo en condiciones de salinidad elevada y quizás parte de su éxito adaptativo podría depender de la capacidad de establecer y mantener efectivas asociaciones con rizobacterias promotoras del crecimiento, que resultaría en una eficiente explotación de las fuentes minerales e hídricas por un aumento del volumen radical, así como de una regulación compartida de la respuesta de la planta al estrés, lo que indefectiblemente inducirá un aumento en el crecimiento y una mejor implantación en condiciones limitantes de crecimiento (Creus *et al.*, 1998). Si bien la interacción con bacterias del género *Azospirillum* sp., ha sido extensamente estudiada, fundamentalmente desde la perspectiva de la promoción del crecimiento vegetal en condiciones no restrictivas, la asociación del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) con rizobacterias promotoras del crecimiento en condiciones de salinidad, se presenta como un área de trabajo poco estudiada, sobre todo desde la perspectiva de la capacidad de estos microorganismos de mejorar el crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico. En tal sentido, sabemos que la colonización por rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas o PGPRs, del inglés plant growth promoting rhizobacteria, modifica la tolerancia a la sequía de plántulas de trigo (Creus *et al.*, 1998). No se describen hasta el momento ensayos que permitan comparar la respuesta a la inoculación de *Zea mays* L. con rizobacterias del género *Azospirillum* sp. en condiciones de salinidad. En numerosas especies, la inoculación con *Azospirillum* sp. ha determinado una mejor implantación así como un consecuente aumento de su productividad (Okon y Labandera Gonzalez, 1994). En tal sentido, se considera que la capacidad de este microorganismo para promover el crecimiento vegetal, tanto en condiciones óptimas como restrictivas, dependería de al menos dos mecanismos fisiológicos primarios, la fijación biológica de nitrógeno y la producción o metabolismo de fitohormonas y reguladores del crecimiento, dentro de las que se destacan las auxinas (AIA), citocininas (Z), giberelinas (GAs), poliaminas (PAs), Etileno (E) y ácido abscísico (ABA) (Cassán *et al.*, 2003, Perrig *et al.*, 2007).

2.5. Papel de ácido abscísico (ABA) en la respuesta de la planta al estrés.

La fitohormona ácido abscísico (ABA) juega un rol importante en la adaptación de las plantas a los distintos tipos de estrés ambiental. La concentración endógena de ABA en las plantas varía en función de los cambios ambientales, principalmente frente a situaciones de estrés hídrico y salino. Se ha visto que adicionalmente a su conocida función en el cierre estomático, la tolerancia de los tejidos se ve incrementada significativamente con elevadas concentraciones de esta hormona (Hartung y Jeschke, 1999).

Ello es debido a que se ha identificado al ABA como una de las principales señales químicas que controlan la regulación de la expresión génica durante un estrés. Para la expresión de genes específicos en respuesta a estrés hídrico y salino, se ha postulado la existencia de dos tipos de cadenas de transducción de señales, una dependiente de ABA y otra independiente de esta hormona (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bray, 1997). Dentro de los ABA-dependientes se encuentran transcritos productos proteicos relacionados con protección celular como las dehidrinases, los tres grupos de proteínas LEA, enzimas de síntesis de osmorreguladores como prolina, glicina-betaína y alcohol-azúcares (pinitol), también proteasas y enzimas antioxidantes (Bray, 1997). Es decir, una gran batería de compuestos de defensa para el estrés, ya sea como reguladores osmóticos o secuestradores del exceso de iones, o del exceso de radicales libres, son regulados por la concentración y regulación de los niveles endógenos de ABA en los tejidos.

2.6. Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento de *Azospirillum* sp.

La bibliografía en general considera a *Azospirillum* sp. como uno de los géneros bacterianos responsable de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo así como el rendimiento de numerosas especies cultivables (Okon, 1985; Baldani *et al.*, 1987). Inicialmente, estas bacterias llamaron la atención de los investigadores por dos características distintivas: (a) la capacidad de colonizar de manera endofítica los tejidos de ciertas gramíneas y otras especies ocupando nichos ambientales protegidos y (b) la capacidad de aumentar significativamente el crecimiento radical y aéreo de plantas inoculadas. Las propiedades de esta bacteria para estimular el crecimiento de plantas inoculadas han sido comprobadas en decenas de experimentos en condiciones sumamente contrastantes. Los mecanismos por los que *Azospirillum* sp. modifica el desarrollo y la productividad vegetal y aún son motivo de debate dentro de la comunidad científica; sin embargo, entre los más destacados se han postulado dos mecanismos: 1) directos, en los que el efecto promotor depende del aporte bacteriano de compuestos capaces de regular el crecimiento, 2) indirectos, en los que el efecto depende de la capacidad del microorganismo para impedir el crecimiento de bacterias u hongos fitopatogénicos. Dentro de los mecanismos directos se destacan: la fijación biológica del nitrógeno (FBN), actividad nitrato

reductasa (NR), mineralización de nutrientes esenciales y producción o metabolismo de fitohormonas y compuestos reguladores del crecimiento tales como auxinas (Patten y Glick, 1996), citocininas (Tien *et al.*, 1979) y giberelinas (Cassan *et al.*, 2003), además de ciertas poliaminas como la cadaverina (Cassán *et al.*, 2008), con capacidad de regular el crecimiento o la respuesta de una planta a situaciones desfavorables. Dentro de los mecanismos indirectos, se destacan: la capacidad biocontroladora sobre otras bacterias o sobre hongos fitopatogénicos por medio de la biosíntesis de antibióticos y antifúngicos, o por competencia directa con los patógenos de la rizósfera. En la actualidad, la comunidad científica ha considerado su aplicación tecnológica dentro de un modelo de agricultura sustentable, basado en la utilización de éste y otros microorganismos como estrategia para incrementar la productividad de cultivos de interés económico o ecológico (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994) aún en condiciones desfavorables (Barassi *et al.*, 2006).

En base a los antecedentes presentados en esta sección, se proponen las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo.

3. Hipótesis

1-En la especie glicófita (*Zea mays* L.), tratamientos con NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla isoosmótica en condiciones semi-controladas de cultivo hidropónico, pueden afectar de manera diferencial el crecimiento y los niveles endógenos de ABA.

2-La inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*, en semillas de maíz (*Zea mays* L.) tratadas con NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isoosmótica de ambas sales, determinará una respuesta diferencial sobre el crecimiento y los niveles endógenos de ABA en plantas inoculadas y sin inocular.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar el crecimiento y la respuesta a la salinidad como producción de ácido abscísico (ABA) en plántulas de maíz (*Zea mays* L.), sometidas a estrés salino por diferentes concentraciones de NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isoosmótica en condiciones semi-controladas de cultivo hidropónico.

4.2. Objetivos específicos

1-Evaluar parámetros de crecimiento: longitud del tallo, peso fresco y seco de parte aérea y radical de plántulas de maíz mantenidas en condiciones semi-controladas de

crecimiento, en cultivos hidropónicos suplementados con soluciones 0, 50, 100 y 150 mM de NaCl; concentraciones equivalentes de Na₂SO₄ y la mezcla isoosmótica de ambas.

2-Evaluar la producción endógena de ácido abscísico (ABA) en las plántulas de maíz tratadas como se describe en el primer objetivo.

3-Correlacionar el efecto de la inoculación con *Azospirillum* a nivel del crecimiento y la producción de ABA en plántulas sometidas a salinidad por NaCl; Na₂SO₄ o la mezcla isoosmótica de ambas sales.

5. Materiales y Métodos

5.1. Material Vegetal

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) BT, Morgan, correspondiente a un grupo de ciclo de crecimiento intermedio, cuya pureza fue mayor al 95 %. Antes del comienzo del ensayo se evaluó su energía y poder germinativo de acuerdo a normas de la International Seed Test Association (ISTA) para la especie.

5.2. Inoculante comercial

Las semillas se inocularon al momento de la siembra con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense*, recomendada por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, IMYZA-INTA Castelar y registrada nacionalmente ante el SENASA para la formulación de inoculantes para gramíneas en la República Argentina. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del marbete del producto BONUS® para maíz, de la empresa Nitragin Argentina SA. (1ml.kg⁻¹ semillas). Esta cepa fue recientemente testada por Perrig *et al.* (2007) sobre su capacidad de promover el crecimiento vegetal en medio definido.

5.3. Condiciones generales del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en el invernáculo de la Universidad nacional de Río Cuarto, que se encuentra emplazada sobre la ruta nacional n° 36 Km 6001, Las Higueras, Córdoba (33° 07' Latitud Sur, 64° 14' Longitud Oeste, 421 m.s.n.m), en la campaña 2007-2008. Seis semillas de la especie, luego de ser inoculadas, fueron colocadas en soportes plásticos flexibles de 20 cm de diámetro x 20 cm de longitud, conteniendo como soporte inerte vermiculita de granulometría media, previamente esterilizada y estabilizada a pH fisiológico, según Somasagen y Hoben. (1994). A partir de la emergencia, se permitió el establecimiento de tres (3) plántulas de crecimiento uniforme por maceta, que recibieron alternativamente solución nutritiva de Hoagland 25% (sin N) en los casos de inoculación con *Azospirillum brasilense* o completa en los casos de tratamiento con N mineral. En todos los casos la adición de las soluciones nutritivas se realizó por vía capilar y se renovó cada 2 días hasta la finalización del ensayo. La salinización comenzó a los 15 días después de la siembra y consistió en la suplementación de la solución nutritiva con: (a) 50, 100 y 150 mM de NaCl para generar potenciales osmóticos (ψ_o) de -0.37; -0.47 y -0.65 MPa respectivamente (b) concentraciones de Na₂SO₄ para generar potenciales osmóticos equivalentes y (c) mezclas isoosmóticas de ambas sales. Se utilizaron tales concentraciones, en base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (Ramadú, 2007) y debido a que en general, se considera que la tolerancia a salinidad en especies glicófitas oscila entre los 50 y 150 mM de NaCl, si

bien en casos excepcionales de algunos cultivares de alfalfa puede llegar a casi 400 mM (Munns, 2005). El esquema general de los tratamientos se resume a continuación:

- 1-Semillas sin inocular
- 2-Semillas inoculadas con *Azospirillum brasilense*
- 3-Semillas sin inocular y salinizadas con NaCl
- 4-Semillas sin inocular y salinizadas con Na₂SO₄.
- 5-Semillas sin inocular y salinizadas con NaCl y Na₂SO₄
- 6-Semillas inoculadas con *Azospirillum brasilense* y salinizadas con NaCl
- 7-Semillas inoculadas con *Azospirillum brasilense* y salinizadas con Na₂SO₄.
- 8-Semillas inoculadas con *Azospirillum brasilense* y salinizadas con NaCl y Na₂SO₄

El experimento se desarrolló en el invernáculo de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la UNRC en condiciones semi-controladas de temperatura entre los meses de septiembre y noviembre del 2007. Cada 7 días, se consideró la evaluación del crecimiento longitudinal de la parte aérea (cm) para la construcción de la correspondiente curva de crecimiento sigmoide, en todos los tratamientos. La experiencia completa finalizó cuando las plantas alcanzaron el estado fenológico correspondiente a V6-V7 según la escala de Ritchie-Hanway. (1982), evaluándose los siguientes parámetros de crecimiento: (a) longitud aérea, (b) peso seco y peso fresco aéreo y radical, ambos parámetros se relacionaron a través del índice de crecimiento en peso fresco y seco. Al finalizar el ensayo se colectaron muestras de aproximadamente 1 g de material vegetal (PF) para la identificación y cuantificación de ácido abscísico (ABA) endógeno. Las mismas fueron congeladas en nitrógeno líquido, liofilizadas y luego almacenadas en presencia de BHT como antioxidante a - 20 °C hasta su procesamiento definitivo. Cada tratamiento se llevó a cabo con un diseño aleatorio, tres réplicas por tratamiento y los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) generado con el software PRISM 4.0, seguido por un test de Tukey *a posteriori* con $p < 0.05$.

5.4. Determinación de ABA

El material vegetal congelado y liofilizado, se homogeneizó con mortero y se resuspendió en una solución de metanol: agua (4:1, v/v) a 4°C. por 24 hs. Luego el homogeneizado se filtró y se ajustó a pH 2,5 con ácido acético glacial (1%) y se adicionó 50 mg de [²H₆]-ABA (J.D. Chen, USDA-ARS of Beltsville, Maryland, USA) como estándar interno. Después de centrifugar y evaporar la fase metanol, se purificó la fase acuosa mediante columnas de NH₄, lavando con acetonitrilo, hexano y acetato de etilo. El ABA retenido se eluyó con metanol-acético (95:5, v/v) para luego ser particionado isocráticamente

por HPLC-UV, mediante columna corta de C₁₈ corrida con una mezcla de solventes de metanol: agua: ácido acético (30:70:1, v/v), a 1 ml/min. Las fracciones que mostraron absorbancia a 262 nm fueron reunidas y derivatizadas con diazometano etéreo y MSTFA (mono-silil-trifluoroacetamida), evaporadas y retomadas con acetato de etilo (2µl) para luego ser inyectadas en un GC acoplado a un MS (espectrómetro de masas) en donde se procedió a la identificación y cuantificación de esta hormona mediante GC-SIM (monitoreo selectivo de iones). Los datos fueron expresados como ng ABA.g⁻¹ PF de muestra y representaron la valoración obtenida a partir del material vegetal combinado de tres individuos de cada tratamiento.

6. Resultados

6.1. Crecimiento del cultivo. Longitud de la parte aérea.

La **Figura 1** muestra el crecimiento de plántulas de maíz, fertilizadas por la adición de nitrógeno mineral a través de la solución de Hoagland (25%) o inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 como bacteria promotora del crecimiento.

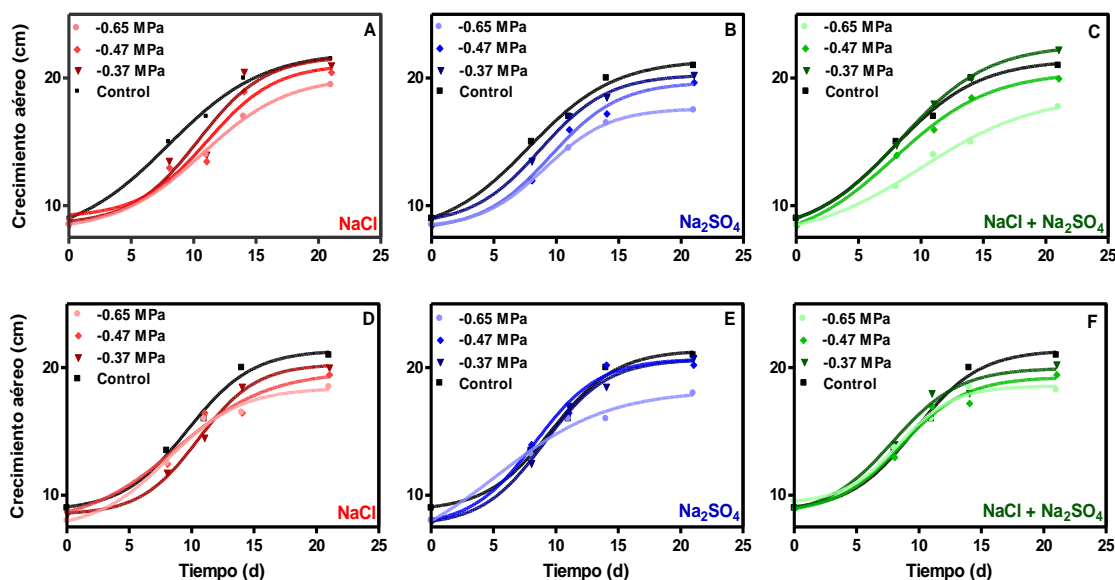


Figura 1: Efecto de la exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa, generadas por NaCl, Na_2SO_4 o la mezcla isosmótica de ambas. Se observa el efecto de la salinización sobre la longitud de la parte aérea en función del tiempo. Los valores fueron agrupados de acuerdo al tratamiento y ajustados para obtener una curva sigmoide (r^2 : 0.95). Las gráficas A, B y C, representan las plantas fertilizadas con solución completa de Hoagland (25 %) y las D, E y F aquellas inoculadas con *A. brasilense* Az39.

Para simplificar estos resultados, se presenta un resumen del análisis estadístico generado con software PRISM 4.0 con el ajuste de las curvas de crecimiento sigmoide (pendiente variable) de cada tratamiento. En las tablas, además se presentan los valores máximos y mínimos generados en cada curva de manera comparativa.

Tabla I: Resultados comparativos del análisis estadístico generado con el software (Prism® 4.0).

NaCl-A	Bottom	Top	R ²	Na ₂ SO ₄ -B	Bottom	Top	R ²	Bisalina-C	Bottom	Top	R ²
Control	7,419	22,07	0,9947	Control	7,771	21,43	0,993	Control	7,771	21,43	0,993
-0.37 MPa	8,51	21,72	0,9334	-0.37 MPa	8,516	20,27	0,9976	-0.37 MPa	7,699	22,62	0,9996
-0.47 MPa	9,07	21,09	0,9512	-0.47 MPa	8,091	19,7	0,9902	-0.47 MPa	6,967	20,5	0,9972
-0.65 MPa	8,03	20,12	0,9972	-0.65 MPa	8,237	17,63	0,9996	-0.65 MPa	7,342	18,66	0,9934
NaCl-D	Bottom	Top	R ²	Na ₂ SO ₄ -E	Bottom	Top	R ²	Bisalina-F	Bottom	Top	R ²
Control	8,771	21,38	0,9894	Control	8,771	21,38	0,9894	Control	8,771	21,38	0,9894
-0.37 MPa	8,466	20,28	0,9945	-0.37 MPa	7,614	20,65	0,9938	-0.37 MPa	8,388	19,97	0,979
-0.47 MPa	7,692	19,71	0,9685	-0.47 MPa	7,548	20,7	0,9853	-0.47 MPa	8,568	19,26	0,9786
-0.65 MPa	7,326	18,42	0,9877	-0.65 MPa	4,874	18,24	0,9854	-0.65 MPa	9,315	18,57	0,9882

Equation: Sigmoidal dose-response (variable slope).
 $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})})$

Como se observa en la **Figura 1** (A, B y C) y en la **Tabla 1**, en los tratamientos salinizados con NaCl o Na₂SO₄, el control tuvo un crecimiento mayor hasta la fase exponencial de la curva, mientras que en la fase estacionaria este comportamiento fue igualado por las plántulas tratadas con -0.37 MPa de NaCl. Esta respuesta parecería indicar que el Na₂SO₄ sería más inhibitorio sobre el desarrollo temprano de la especie, como fuera mencionado recientemente por Calcagno *et al.* (2007) para maíz, así como Ramadú (2008) para soja. En el caso de la mezcla isosmótica de sales, el tratamiento con -0.37 MPa tuvo una respuesta similar al control durante la fase exponencial de crecimiento y tal respuesta fue superior desde el comienzo de la fase estacionaria, lo que permitiría pensar sobre un posible rol detoxificante de la mezcla de sales. Todos los tratamientos salinizados con NaCl tuvieron una respuesta comparable entre sí, desde los 7 días de cultivo, momento en el que se diferenció el efecto de las tres concentraciones salinas adicionadas, siendo más inhibitorio para la mayor concentración del osmolito en el potencial de -0.65 MPa. En el caso de los tratamientos sometidos a Na₂SO₄ la respuesta fue similar a la obtenida con NaCl; sin embargo, para la mayor concentración de esta sal (-0.65 MPa), pudo observarse una fuerte inhibición y el consecuente adelantamiento de la fase estacionaria de crecimiento, que solo fue comparable al efecto obtenido de la mezcla isosmótica de sales para el mismo potencial. Esto indicaría que el desarrollo temprano en plántulas de maíz sería afectado por el componente salino de la adición de Na₂SO₄ a la solución nutritiva y que este efecto se alcanzaría solo en máximas concentraciones de la sal; es decir, al principio el crecimiento estaría afectado por el efecto osmótico de la sal, y el efecto iónico específico se manifestaría a concentraciones elevadas. Al respecto, Lone (1988) determinó la mayor toxicidad del ión SO₄²⁻ a nivel del crecimiento y desarrollo de embriones de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y similares resultados fueron informados por Warne *et al.* (1990) en la halófito *Chenopodium rubrum*, en la que el Na₂SO₄ fue más inhibitorio sobre el crecimiento y más tóxico en los tejidos que el NaCl. Por su parte, Shi y Sheng (2005), determinaron una respuesta similar para girasol (*Helianthus annuus* L.) tanto por la salinización con SO₄Na₂, como por la alcalinización del medio con el consecuente aumento de pH. En el caso de la evaluación de la germinación de la leguminosa halófito *Prosopis strombulifera*, se demostró que la toxicidad ocasionada por el sulfato de sodio fue parcialmente revertida cuando la sal era combinada con el cloruro en soluciones isosmóticas bisalinas (Sosa *et al.*, 2005). Para resumir los resultados de esta sección, podemos mencionar que el crecimiento como longitud aérea (cm) fue afectado en cada tratamiento de manera particular, teniendo el efecto más inhibitorio en el caso del Na₂SO₄, luego para el NaCl y finalmente para la mezcla isosmótica de sales, que hasta determinó cierta reversión a la toxicidad generada por el sulfato. A nivel de la concentración de cada sal adicionada a la solución nutritiva, podemos destacar que el efecto más inhibitorio fue obtenido por el tratamientos de las semillas con soluciones de

potencial osmótico -0.65 MPa de cada sal o de la mezcla isosmótica y que tal comportamiento fue igualmente determinado en las soluciones de -0.47 MPa, pero con menor intensidad, lo que determinaría además un posible efecto osmótico de las sales en solución nutritiva.

Como se observa en la **Figura 1** (D, E y F) y en y en la **Tabla 1**, en los tratamientos inoculados con *Azospirillum brasilense* Az39 y salinizados con NaCl o con la mezcla isosmótica de sales, el comportamiento de las plántulas fue similar entre sí hasta los 15 días de cultivo, lo que se correspondió con la fase estacionaria de la curva. En el caso particular de los tratamientos inoculados y tratados con soluciones de Na₂SO₄ el crecimiento, tanto para el control como para la menor concentración y concentración intermedia de la sal (-0.37 y -0.47 MPa) fue similar entre sí, observándose solo diferencias significativas con el tratamiento de mayor concentración (-0.65 MPa), para el que se obtuvo el menor crecimiento con respecto a los demás tratamientos. A diferencia de lo que ocurrió en las plántulas fertilizadas, esta respuesta permitiría especular sobre la capacidad de *Azospirillum brasilense* Az39 para reducir el efecto de toxicidad de ésta sal, al menos hasta concentraciones intermedias de la misma (-0.47 MPa). Resultados similares se obtuvieron con plántulas de trigo (Alvarez *et al.*, 1996; Creus *et al.*, 1998) y maíz (Casanovas *et al.*, 2002), donde la inoculación con *Azospirillum* Sp245 aliviaba los efectos del estrés salino. También, esto se comprobó en condiciones extensivas de cultivo (Casanovas *et al.*, 2003; Creus *et al.*, 2004). Esta diferencia se explicaría desde la capacidad de *A. brasilense* para biosintetizar compuestos relacionados potencialmente con la tolerancia vegetal al estrés abiótico, tales como ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007) y poliaminas (Cassán *et al.*, 2003). Para resumir los resultados de esta sección, podemos mencionar que en los tratamientos inoculados y salinizados, se mantuvo una respuesta dependiente de la concentración del osmolito y la inhibición en las mayores concentraciones de las sales solo fue significativa en el tratamiento con Na₂SO₄; mientras que en el caso del NaCl y la mezcla isosmótica tal diferencia fue inferior, incluso a la obtenida en los tratamientos fertilizados.

6.2. Peso fresco y seco aéreo y radical

La **Figura 2** muestra el peso fresco aéreo y radical (en V6-V7) de plántulas de maíz, fertilizadas por la adición de nitrógeno mineral en la solución de Hoagland (25%) y sometidas a condiciones de salinidad por diferentes concentraciones de Na₂SO₄, NaCl o la mezcla isosmótica de sales, en sistema de cultivo semi-controlado (invernáculo).

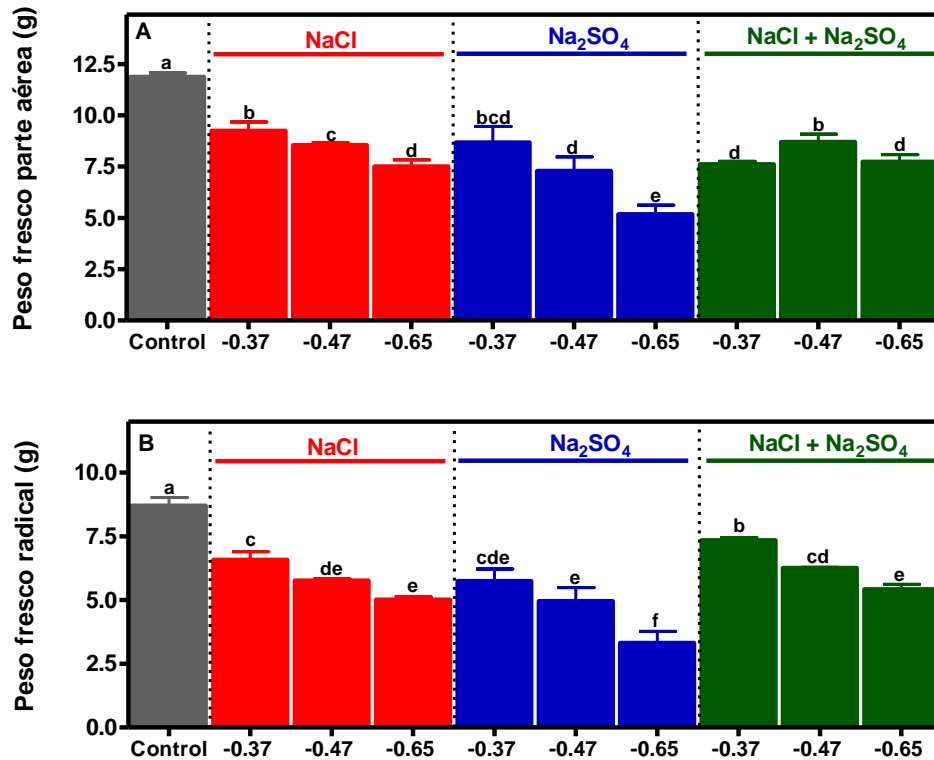


Figura 2: Exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica (barras verdes). Efecto sobre el peso fresco de la parte aérea (A) y radical (B) en de plantas fertilizadas con solución Hoagland (completa). Letras diferentes representan diferencias significativas por Test de Tuckey ($p < 0.05$).

De acuerdo con Bashan y de-Bashan (2005), la determinación de crecimiento a través del peso fresco (PF) es inadecuada como una medida del desarrollo de la planta; sin embargo, en condiciones de estrés osmótico o salino, podría considerarse indirectamente para conocer el estado hídrico de la planta. En nuestros resultados, a medida que la concentración salina aumentó en la solución nutritiva, el peso fresco de la parte aérea disminuyó proporcionalmente (A) y esta diferencia fue mayor en los tratamientos con Na₂SO₄, con respecto a los de NaCl para los que se comprobó una tendencia inhibitoria similar pero de menor magnitud, mostrando que el componente osmótico de cada sal determinaría una menor acumulación de agua en los tejidos de la parte aérea por la disminución del potencial osmótico de las soluciones, situación que se asemeja a lo sucedido con el peso seco aéreo. De acuerdo con Shannon *et al.* (1999), este efecto sería el responsable de reducir la tasa de crecimiento, principalmente en los estadios de germinación y crecimiento temprano. Adicionalmente se puede observar un efecto iónico aditivo para el caso del Na₂SO₄ que afectaría la captación de agua y su acumulación en los tejidos. En la mezcla isosmótica de sales, en cambio, por algún mecanismo desconocido de aliviación de la

toxicidad iónica, no se determinó una disminución significativa de este parámetro para las tres concentraciones ensayadas.

Con respecto al peso fresco radical (B), podemos observar una respuesta inhibitoria similar a la obtenida para la parte aérea en todos los tratamientos. No obstante, en este órgano se hace más notoria la inhibición dependiente de la concentración de sal. También resulta más evidente la inhibición por sulfato, y la tendencia a revertir esa toxicidad cuando ambos aniones están presentes en la mezcla de sales.

La **Figura 3** muestra el peso fresco aéreo y radical de plántulas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y sometidas a condiciones de salinidad por diferentes concentraciones de Na₂SO₄, NaCl o la mezcla isosmótica de sales.

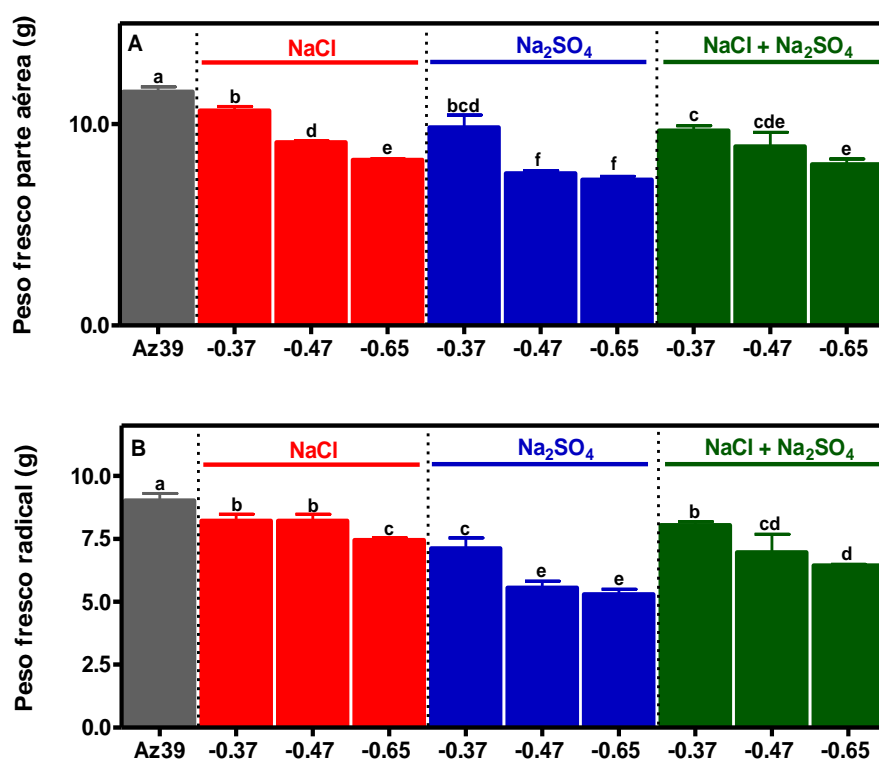


Figura 3: Efecto de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica (barras verdes). Efecto sobre el peso fresco de la parte aérea (A) y radical (B) de plantas inoculadas con *A. brasilense* Az39. Letras diferentes representan diferencias significativas por Test de Tuckey ($p < 0.05$).

La salinización tuvo efecto inhibitorio sobre el peso fresco de la parte aérea (A), fundamentalmente las plántulas tratadas con la solución de Na₂SO₄, con respecto al control inoculado y sin salinizar y a los tratamientos con NaCl y con la mezcla isosmótica en la que particularmente se registró una respuesta dependiente de la concentración (-0.65 MPa) con

respecto a la concentración media e inferior de la mezcla. No obstante, el efecto inhibitorio del Na₂SO₄ en su mayor concentración, fue menor casi en un 20 % en los tratamientos inoculados, es decir que la inoculación con *Azospirillum* sp. tuvo un efecto protector sobre la planta (Tabla III). En lo que respecta al peso fresco radical (B), se observó una leve tendencia a favorecer el crecimiento en condiciones de salinidad por parte de la bacteria. Los resultados parecen indicar que *Azospirillum* sp. podría revertir levemente el efecto de toxicidad generado por el Na₂SO₄ en las concentraciones intermedias y altas y en la mayor concentración de la mezcla isosmótica, pero dicha diferencia no es significativa (Tabla III).

Para simplificar estos resultados, se presenta un resumen del análisis estadístico de ANOVA generado con software PRISM 4.0 para todos los tratamientos, a nivel del peso fresco.

Tabla II: Resultados comparativos del análisis estadístico generado con el software (Prism® 4.0).

Peso Fresco PA-Fertilizado		Peso Fresco PA-Inoculado	
<i>One-way analysis of variance</i>		<i>One-way analysis of variance</i>	
P value	P<0.0001	P value	P<0.0001
P value summary	***	P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	10	Number of groups	10
F	14,96	F	17,04
R squared	0,8707	R squared	0,8846
Peso Fresco R-Fertilizado		Peso Fresco R-Inoculado	
<i>One-way analysis of variance</i>		<i>One-way analysis of variance</i>	
P value	P<0.0001	P value	P<0.0001
P value summary	***	P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	10	Number of groups	10
F	21,27	F	13,56
R squared	0,9054	R squared	0,8392

De manera general y como se observa en la Tabla III, podemos mencionar que cuando las plántulas inoculadas se sometieron a salinidad con NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla de ambas, tuvieron un menor porcentaje de disminución del peso fresco, tanto a nivel aéreo como radical en comparación con el control inoculado y no salinizado. El efecto de la salinización fue más atenuado que aquel observado en los tratamientos fertilizados sin inocular. En tal sentido, resultados similares se obtuvieron con plántulas de trigo (Alvarez *et al.*, 1996; Creus *et al.*, 1998) y maíz (Casanovas *et al.*, 2002), donde la inoculación con *Azospirillum* Sp245 revirtió los efectos negativos del estrés osmótico y salino.

Tabla III: Porcentaje de disminución del PF con respecto al control no salinizado en plántulas de maíz fertilizadas o inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y sometidas a salinidad por NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla de ambas.

Tratamientos	NaCl			Na ₂ SO ₄			Bisalina		
	-0,37	-0,45	-0,65	-0,37	-0,45	-0,65	-0,37	-0,45	-0,65
PFPA-F	22,19	28,04	36,84	26,95	38,61	56,34	35,83	26,74	34,82
PFPA-I	8,02	21,69	29,26	15,20	34,88	37,63	16,58	23,39	31,01
PFR-F	24,35	33,75	42,39	34,00	43,10	61,86	15,62	28,09	37,74
PFR-I	8,87	8,87	17,35	21,06	38,47	41,24	10,81	22,78	28,60

PFPA: Peso fresco parte aérea; PFR: Peso Fresco Radical; F: Fertilizado; I: Inoculado.

La **Figura 4** muestra el peso seco aéreo y radical de plántulas de maíz fertilizadas por la adición de nitrógeno mineral en la solución Hoagland (25%) y sometidas a condiciones de salinidad por diferentes concentraciones de Na₂SO₄, NaCl o la mezcla isosmótica de sales.

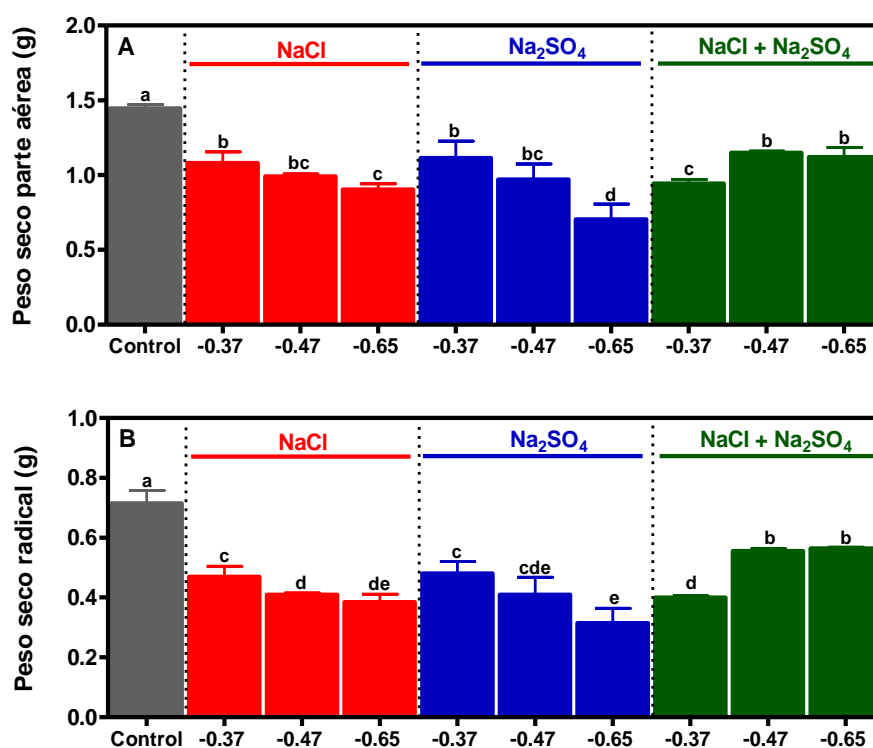


Figura 4: Exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica (barras verdes). Efecto sobre el peso seco de la parte aérea (A) y radical (B) de plantas fertilizadas con solución Hoagland (completa). Letras diferentes representan diferencias significativas por Test de Tuckey ($p < 0.05$).

Podemos mencionar que en todos los tratamientos salinizados, las plántulas tuvieron una respuesta de producción de biomasa menor que los controles sin salinizar, tanto a nivel aéreo como radical. A nivel del peso seco aéreo (A) se puede observar que el crecimiento de las plántulas tratadas con NaCl y Na₂SO₄ disminuyó a medida que la concentración salina aumentó con una respuesta dependiente de la concentración y máxima para la mayor concentración de sal adicionada. A nivel de las plántulas tratadas con la mezcla isosmótica de sales, tal relación fue revertida y las plántulas no fueron afectadas por las mayores concentraciones de la mezcla de sales.

A nivel de la biomasa radical (B) podemos observar que la diferencia con respecto al tratamiento no salinizado fue mayor que para el caso de la parte aérea, pero con un patrón similar a éste último caso. En tal sentido, el tratamiento con la mezcla isosmótica de ambas sales fue el que menos afectó el crecimiento radical, mientras que en el caso de las sales adicionadas de manera individual se determinó una respuesta dependiente de la concentración y similar entre sí. En tales casos, el tratamiento de las plántulas con la menor concentración (-0.37 MPa) de cada sal, determinó un peso seco radical superior, mientras que en las concentraciones intermedia y superior (-0.47 y -0.65 MPa) las plántulas tuvieron un peso similar pero menor que la primera y mucho menor que el control sin salinizar.

Para resumir, podemos decir que a medida que la concentración de Na₂SO₄ aumentó en la solución nutritiva, su efecto sobre el crecimiento de la parte aérea y radical de las plántulas de maíz fue más perjudicial que el NaCl y a la mezcla isosmótica respectivamente. En tal sentido, Lone (1988), determinó la mayor toxicidad del éste ión a nivel del crecimiento y desarrollo de cebada. De manera similar, Bie *et al.* (2004) determinaron que el Na₂SO₄ podía disminuir y afectar considerablemente el crecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) al igual que Shi y Sheng (2005), quienes determinaron una respuesta similar para girasol (*Helianthus annuus* L.). Por otro lado, Reinoso *et al.* (2004), demostraron una notable tolerancia de la leguminosa halófila *Prosopis strombulifera* a NaCl pero no a Na₂SO₄ en condiciones de cultivo controlada.

La **Figura 5** muestra el peso seco aéreo y radical de plántulas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y sometidas a condiciones de salinidad por diferentes concentraciones de Na₂SO₄, NaCl, así como de la mezcla isosmótica de sales, en sistemas de cultivo semicontrolados (invernáculo).

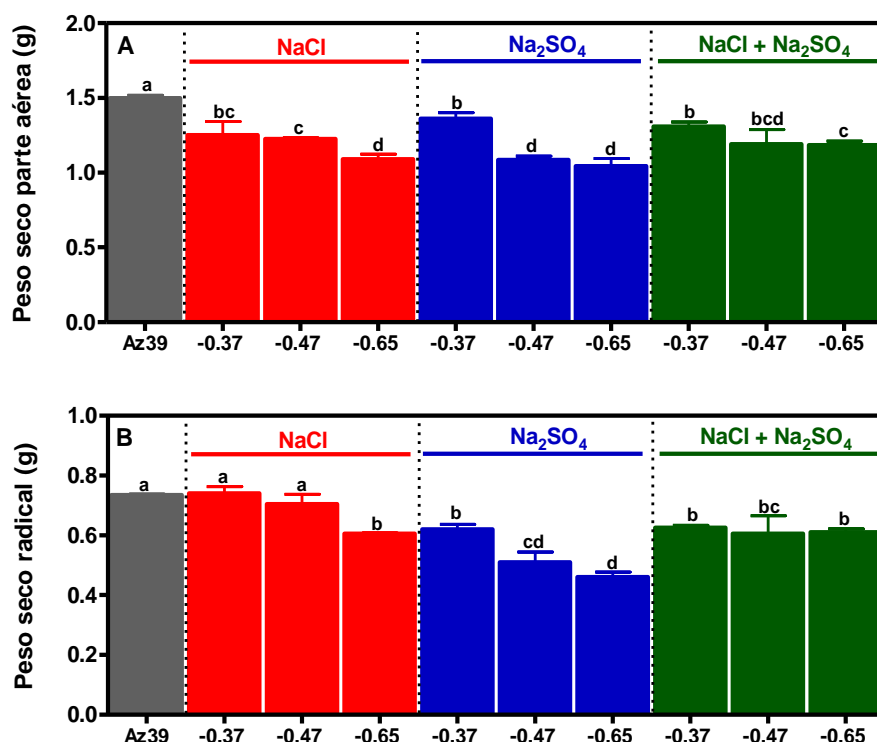


Figura 5: Efecto de la exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). Efecto sobre el peso seco de la parte aérea (A) y radical (B) de plantas inoculadas con *A. brasilense* Az39. Letras diferentes representan diferencias significativas por Test de Tuckey ($p < 0.05$).

Tabla IV: Resultados comparativos del análisis estadístico generado con el software (Prism® 4.0).

Peso Seco PA-Fertilizado		Peso Seco PA-Inoculado	
<i>One-way analysis of variance</i>		<i>One-way analysis of variance</i>	
P value	P<0.0001	P value	P<0.0001
P value summary	***	P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	10	Number of groups	10
F	8,009	F	7,477
R squared	0,7828	R squared	0,7709
Peso Seco R-Fertilizado		Peso Seco R-Inoculado	
<i>One-way analysis of variance</i>		<i>One-way analysis of variance</i>	
<i>One-way analysis of variance</i>		<i>One-way analysis of variance</i>	
P value	P<0.0001	P value	P<0.0001
P value summary	***	P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	10	Number of groups	10
F	11,8	F	11,22
R squared	0,8415	R squared	0,8346

En todos los tratamientos salinizados, las plántulas tuvieron una respuesta de producción de biomasa menor que los controles sin salinizar, tanto a nivel aéreo como radical; sin embargo esta respuesta tuvo una diferencia menor al control que en el caso de las

plantas fertilizadas. Esto se debería al menos en parte a la capacidad de *Azospirillum* sp. de promover y regular el crecimiento, aún en condiciones de estrés abiótico. Particularmente sobre el peso seco de la parte aérea (A) las plántulas tratadas con NaCl no presentaron diferencia significativa en ninguna de las concentraciones adicionadas en la solución nutritiva, aunque parece haber una tendencia relativa a la concentración en la solución de potencial osmótico -0.65 MPa. Una respuesta similar fue determinada en el caso de la mezcla isosmótica de sales para la que se determinó una respuesta similar en el caso de las soluciones de -0.37 y -0.47 MPa pero inferior significativamente para el caso de -0.65 MPa.

Para el tratamiento con Na₂SO₄ la mayor producción de biomasa se determinó en el potencial de -0.37 MPa; mientras que en los de -0.47 y -0.65 MPa se observó una disminución significativa. De la misma manera que para el peso fresco (Figura 3) la inoculación mejoró de manera general la respuesta del cultivo a la salinización, fue superior significativamente para el caso del NaCl, pero no pudo revertirse en el caso de las mayores concentraciones de Na₂SO₄, lo que además confirma la toxicidad de esta sal para la especie vegetal y probablemente también para la bacteria. A nivel de la producción de biomasa radical (B), podemos mencionar que se mantuvo una respuesta similar a la de la parte aérea, solo que en el caso de los tratamientos con NaCl se comprobó una diferencia significativa para la máxima concentración de sal adicionada a la solución nutritiva.

A manera de resumen y como se observa en la Tabla V, podemos mencionar que los cambios negativos generados por la salinización entre las distintas concentraciones, son atenuados por la inoculación con *Azospirillum brasilense* Az39. Así, comparando entre tratamientos fertilizados o inoculados, vemos que los últimos tuvieron una mayor peso tanto de la parte aérea como radical en comparación con los controles sin salinizar. Por tal motivo, podemos considerar que la colonización efectiva de las plántulas con *Azospirillum* sp. incrementó la producción de biomasa, fundamentalmente a nivel radical, aún en condiciones de estrés por salinidad.

Tabla V: Porcentaje de disminución del PF con respecto al control no salinizado en plántulas de maíz fertilizadas o inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y sometidas a salinidad por NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla de ambas.

Tratamientos	NaCl			Na ₂ SO ₄			Bisalina		
	-0,37	-0,45	-0,65	-0,37	-0,45	-0,65	-0,37	-0,45	-0,65
PFPA-F	22,19	28,04	36,84	26,95	38,61	56,34	35,83	26,74	34,82
PFPA-I	8,02	21,69	29,26	15,20	34,88	37,63	16,58	23,39	31,01
PFR-F	24,35	33,75	42,39	34,00	43,10	61,86	15,62	28,09	37,74
PFR-I	8,87	8,87	17,35	21,06	38,47	41,24	10,81	22,78	28,60

PFPA: Peso fresco parte aérea; PFR: Peso Fresco Radical; F: Fertilizado; I: Inoculado.

La **Figura 6** muestra el índice de crecimiento (Raiz/Parte Aérea-R.PA⁻¹) en base al peso fresco de las plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland o inoculadas con *Azospirillum* sp. en sistemas de cultivo hidropónico.

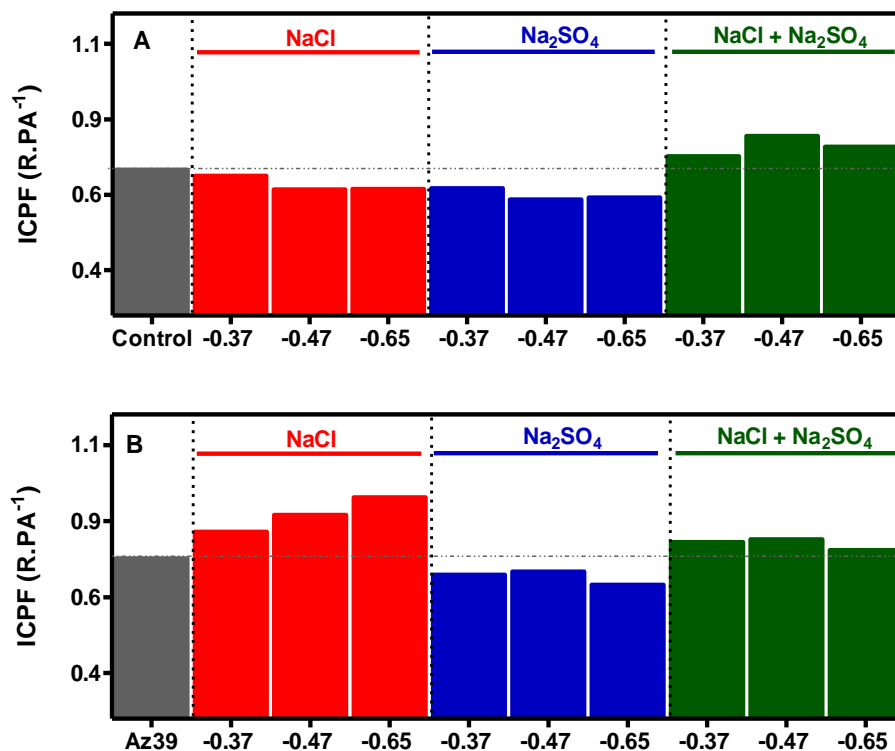


Figura 6: Efecto de la exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na₂SO₄ (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). Efecto sobre el índice de crecimiento, a nivel del peso fresco (R.PA⁻¹). (A) representa las plantas fertilizadas con solución completa de Hoagland (1956); mientras que (B) representa aquellas inoculadas con *A. brasilense* Az39.

Desde el punto de vista fisiológico, el índice de crecimiento de la raíz sobre la parte aérea determina la tendencia de acumulación de agua hacia la fracción aérea o radical de una planta. Como se observa en la **Figura 6** los tratamientos sometidos a salinidad por NaCl e inoculados con *Azospirillum* sp., mostraron un mayor índice de crecimiento de peso fresco y por lo tanto una mayor tendencia de acumulación de agua a nivel radical que en el caso de las plantas solo fertilizadas con la solución nutritiva de Hoagland 25 %. En tal sentido, es necesario mencionar que una de las respuestas fisiológicas de las plantas a condiciones de estrés osmótico se relacionaría con la acumulación de agua en los tejidos como consecuencia de la disminución de la transpiración debida a la producción de ácido abscísico (ABA) y al consecuente cierre estomático en las hojas (Hartung y Jesschke, 1999). Por otro lado, recientemente Perrig *et al.* (2007) y Cohen *et al.* (2008) determinaron la capacidad de

Azospirillum sp. de producir esta molécula en medio químicamente definido o en plántulas de *Arabidopsis thaliana* respectivamente.

La **Figura 7** muestra el índice de crecimiento ($R.PA^{-1}$) en base al peso seco de las plántulas de maíz salinizadas y fertilizadas con solución de Hoagland o inoculadas con *Azospirillum* sp. en sistemas de cultivo hidropónico.

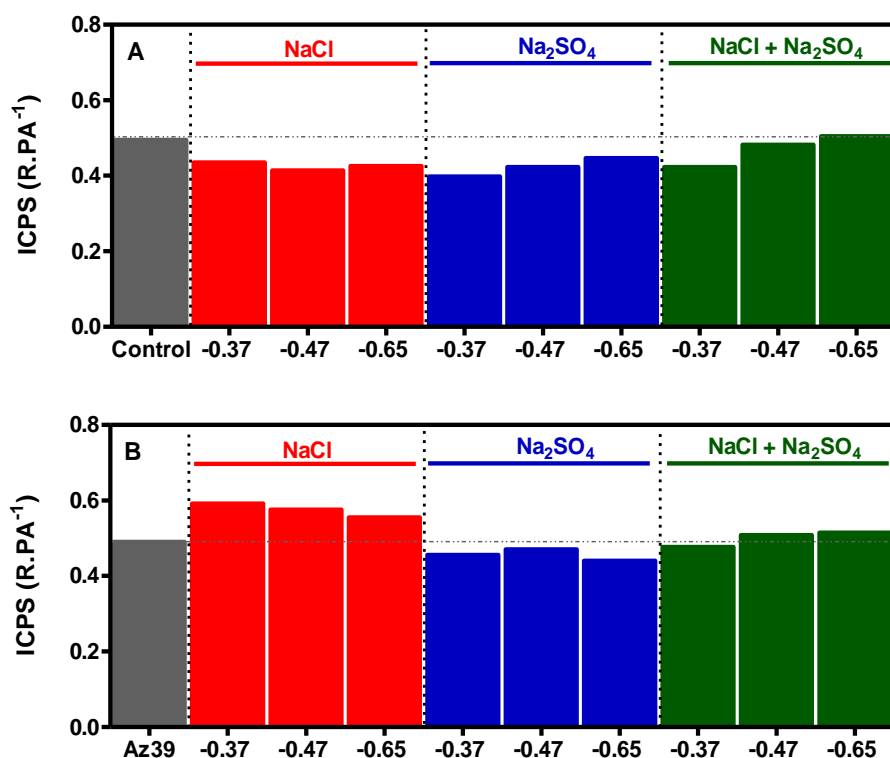


Figura 7: Efecto de la exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37; -0.47 y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na_2SO_4 (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). Efecto sobre el índice de crecimiento, a nivel del peso fresco ($R.PA^{-1}$). (A) representa las plantas fertilizadas con solución completa de Hoagland (1956); mientras que (B) representa aquellas inoculadas con *A. brasilense* Az39.

La **Figura 7** muestra el índice de crecimiento en base al peso seco de las plántulas tratadas con solución completa de Hoagland al 25% o inoculadas con *A. brasilense* cepa Az39. Sobre el tratamiento de plántulas con NaCl se determinó una respuesta similar que en el caso del peso fresco para las plantas inoculadas (Figura 6), en las que se determinaron valores superiores al control inoculado, en todas las concentraciones evaluadas; sin embargo, a concentraciones más elevadas se determinaron menores valores del índice de crecimiento y esto permitiría especular sobre el efecto de la inoculación a nivel del comportamiento de las plántulas de maíz en condiciones de salinidad, en las que se determinaría una tendencia a

incrementar el crecimiento aéreo en presencia del microorganismo y esto se relacionaría con un mejor estado fisiológico de las plántulas que no necesitan priorizar el crecimiento radical para captar agua o nutrientes, como ocurrió en el caso de las plántulas fertilizadas. En el tratamiento con Na_2SO_4 ocurre algo similar pero fisiológicamente inverso ya que la tendencia de acumulación de biomasa en las plantas no inoculadas se relacionó con el aumento de la biomasa radical por encima de la biomasa aérea, mientras que en el caso de las plantas inoculadas, la acumulación una vez más tuvo una respuesta dirigida a la acumulación de biomasa a nivel aéreo. Con la solución bisalina, se observó una respuesta independiente a la inoculación con *Azospirillum* sp. dada por la acumulación de biomasa a nivel radical por encima de la parte aérea a mayores concentraciones de la sal adicionada en la solución nutritiva y tal efecto no fue modificado por la presencia del microorganismo.

La **Figura 8** muestra la respuesta vegetal a la salinización, como producción de ácido abscísico (ABA) ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) en plántulas de maíz inoculadas con *A. brasilense* Az39 o fertilizadas con solución completa de Hoagland al 25 %.

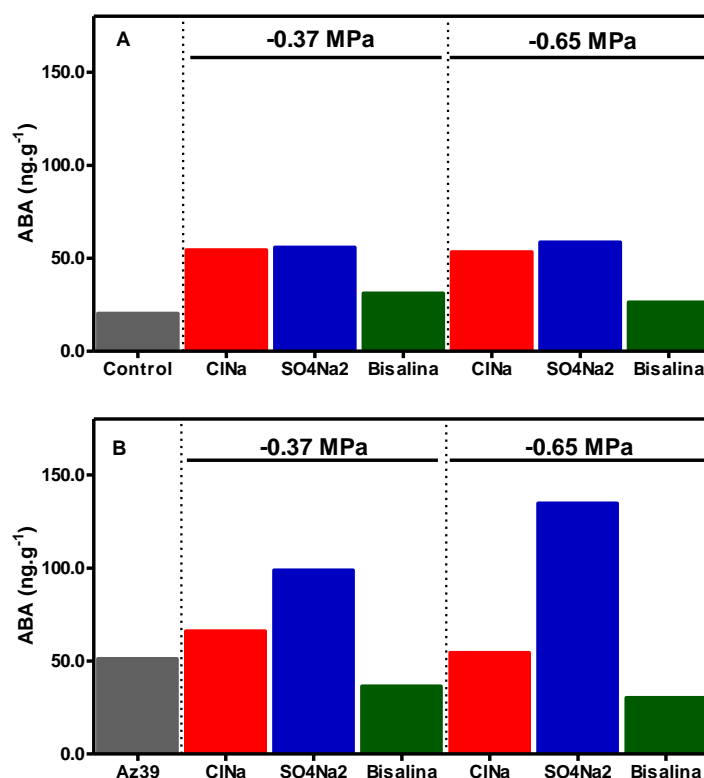


Figura 8: Efecto de la exposición de plántulas de maíz a soluciones de potencial osmótico (ψ_o) -0.37 MPa y -0.65 MPa de NaCl (barras rojas), Na_2SO_4 (barras azules) y la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). Efecto sobre la producción endógena de ácido abscísico (ABA) ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ PF). (A) representa las plantas tratadas con solución completa de Hoagland (1956); mientras que (B) representa las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39.

Sobre este parámetro en particular, es necesario destacar que el ácido abscísico (ABA) es la molécula clave de la respuesta vegetal a condiciones de estrés abiótico y quizás sea considerado el compuesto químico de mayor relevancia y jerarquía dentro de los mecanismos de respuesta al estrés hídrico o salino en plantas. Esta molécula desencadena el estado de alerta en tejidos vegetales, como una señal química al estrés y comanda la respuesta de la planta en tal condición (Bray, 1997), por ello remarcamos la importancia de determinar sus niveles endógenos en respuesta a la salinidad generada por Na_2SO_4 y NaCl así como su mezcla isosmótica en plántulas de maíz.

La **Figura 8** muestra que el control inoculado con *Azospirillum brasilense* Az39 generó más ácido abscísico (ABA) endógeno que el control sin inocular y esto podría deberse a que las condiciones de cultivo hidropónico serían limitantes para el desarrollo de la especie, cuando la planta recibe un estímulo para crecer en menos tiempo relativo o bien que la bacteria es capaz de aportar exógenamente la hormona tal como lo menciona Cohen *et al.* (2008) para el caso de *Arabidopsis thaliana*. En tal sentido, es necesario mencionar que Perrig *et al.* (2007) probaron la capacidad de esta cepa de producir la molécula en condiciones de cultivo químicamente definido. En el caso de las plantas fertilizadas (A), las plántulas sometidas a salinización produjeron, como era esperado, mayor cantidad de ABA que el control no salinizado y esta tendencia fue parcialmente revertida por el tratamiento de las mismas con la solución bisalina, lo que en cierta manera fue determinado a nivel de diferentes parámetros del crecimiento. Es decir, si tomamos a la producción de ABA como señal de estrés, estas plantas estarían menos estresadas que las sometidas a soluciones monosalinas. Adicionalmente, podemos mencionar que no se observó una diferencia importante a nivel de la concentración de cada sal utilizada para generar la condición de estrés ya que la magnitud de la respuesta fue similar en ambos casos. A nivel de las plántulas inoculadas, los resultados fueron de una interpretación más compleja, debido a que en el caso de las plántulas sometidas a Na_2SO_4 , se determinó una mayor producción de la hormona que en los tejidos de las plantas fertilizadas y no inoculadas y adicionalmente, esta respuesta tuvo una relación directa con la concentración de la sal presente en la solución hidropónica. En tal sentido, este resultado podría relacionarse con la incapacidad del microorganismo de revertir el efecto tóxico del Na_2SO_4 como fuera presentado previamente sobre otros parámetros de crecimiento, tal como el peso fresco o seco y sería agravado por la estimulación de la bacteria para sostener un crecimiento acelerado en condiciones de toxicidad. En contrapartida, en el caso del NaCl se determinó la respuesta positiva por la inoculación con este microorganismo en condiciones de salinidad ya que en ambas concentraciones de la sal adicionada en el medio de cultivo, los niveles de la hormona mantuvieron valores similares al control. Se podría considerar que aún en condiciones de

estrés abiótico generadas por NaCl, la planta inoculada sería capaz de sostener su crecimiento sin que esto determine una condición de estrés adicional para ella. Resultados similares han llevado a muchos autores a proponer el rol benéfico de este microorganismo para aliviar el efecto del estrés osmótico y salino (generado por NaCl) en varias especies vegetales.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer la importancia de la inoculación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) como una estrategia de bajo costo para mejorar el comportamiento del cultivo en condiciones sub-óptimas de crecimiento, tal como estrés hídrico, salino u osmótico. La magnitud de la respuesta fue variable de acuerdo al tratamiento y a la condición de estrés generada, pero podemos mencionar que la diferencia con respecto a los tratamientos fertilizados estuvo comprendida entre un 5 y un 20 % para nuestras condiciones de trabajo. Así, a partir de este trabajo, podemos resumir que:

- La salinización de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) con soluciones osmóticamente similares de NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas, afectó considerablemente el crecimiento de esta especie.
- La salinización con Na₂SO₄ tuvo un efecto de mayor toxicidad en todas las situaciones evaluadas. Por contrapartida, la salinización con la mezcla isosmótica de sales (NaCl + Na₂SO₄), revertió el efecto individual de cada sal en altas concentraciones.
- La salinización con la mezcla isosmótica de sales determinó una menor producción de ABA con respecto al tratamiento con cada sal de manera individual. Por otro lado, las plántulas inoculadas produjeron mas ABA en los tratamientos con Na₂SO₄ y esta respuesta tuvo una relación directa con la concentración de la sal presente en la solución hidropónica.
- La inoculación de maíz (*Zea mays* L.) con *Azospirillum brasilense* Az39 modificó significativamente la respuesta de la planta a la salinización y revirtió parcialmente la condición de estrés impuesta.
- La inoculación con *Azospirillum* sp. mejoró la respuesta vegetal a estrés salino, por lo que la cepa utilizada en este ensayo podría ser considerada dentro el grupo de las rizobacterias reguladoras de la homeostasis vegetal en condiciones de estrés abiótico o PHRR o del inglés Plant Homeostasis Regulator Rhizobacteria.

Cabe destacar que si bien los resultados obtenidos son preliminares, deberán extrapolarse a condiciones ambientales menos controladas, en el mismo sistema experimental (invernáculo) o incluso en condiciones no controladas (*a campo*) para considerar su posible aplicación como una práctica recomendable para el cultivo.

8. Bibliografía citada:

1. AGROPANORAMA, 2008. Producción Mundial de maíz 2008. En: www.agropanorama.com. Consultado: 16-11-09
2. ALVAREZ, M., R. SUELDO y C. BARASSI. 1996. Effect of *Azospirillum* on coleoptiles' growth seedling under water stress. **Cereal Research Communications**. 24:101-107.
3. APSE, M., G. AHARON, W. SNEDDEN y W. BLUMWALD. 1999. Sodium transport in plant cells. **Biochemical and Biophysical Acta** 1465: 140-151.
4. BALDANI, V., J. BALDANI y J. DOBEREINER. 1987. Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum sp.* Brazil. **Biol. Fertil. Soils** 4: 37-40.
5. BARASSI, C., G. AYRAULT, C. CREUS, R. SUELDO y M. SOBRERO. 2006. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. **Scientia Horticulture**. 109: 8-14.
6. BASHAN Y. y L. DE-BASHAN. 2005. Fresh- weight measurements of roots provide inaccurate of the effects of plants growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. **Soil Biology and Biochemistry**. 37: 1795-1804.
7. BCR, 2009. Guía estratégica para el agro. En: <http://www.bcr.com.ar>. Consultado: 04-03-09.
8. BIE Z., T. ITO. y Y. SHINOHARA. 2004. Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas Exchange and mineral composition of lettuce. **Scientia Horticulture**. 99: 215-224.
9. BRAY E. 1997. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**. 2: 48-54.
10. CALCAGNO, M., D. MOLINA, F. CASSAN, V. LUNA. 2007. respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a salinidad por ClNa y SO_4Na_2 , mediada por la inoculación con PGPRs o la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA). **VI REBIOS**. CD- ROM; ISBN: 978-950-665-438-2.
11. CASANOVAS, E., C. BARASSI, F. ANDRADE, y R. SUELDO. 2003. *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. **Cereal Res Comm**. 31: 395-402.
12. CASANOVAS, E., C. BARASSI, y R. SUELDO. 2002. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress in maize seedlings. **Cereal Research Communications**. 30:343-350.
13. CASSAN, F., D. PERRIG, V. SGROY, O. MASCIARELLI, C. PENNA, y V. LUNA. 2008. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-

- inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology** 45:178-184.
14. CASSAN, F., P. PICCOLI, y R. BOTTINI. 2003. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. through gibberellins production. An alternative model to increase crop yield? En: Albanesi A. (Ed). **Microbiología Agrícola**. pp: 143-158. ISBN: 987-99083-5-1. Ed. UNSE.
 15. CHAN, R. (2008). Plant transcriptional factors as biotechnological tools. XIII Reunión Latinoamericana y XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Libro de Resúmenes pp 23. Rosario. Argentina.
 16. CISNEROS, J., J. CANTERO y A. CANTERO. 1999. Vegetation soil hydrophysical proprieties and grazing relationships in saline-sodic of Central Argentina. **Canadian Journal of Soil Science**. 1-11.
 17. COHEN, A., R. BOTTINI y P. PICCOLI. 2008. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. **Plant Growth Regul** (2008) 54:97-103.
 18. CREUS, C., R. SUELDO y C. BARASSI. 1998. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. **Can J Bot**. 76:238-244.
 19. CREUS, C., R. SUELDO, y C. BARASSI. 2004. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Can J Bot**. 82:273-281.
 20. DIAS ROIG, M. 2001. El maíz. En: <http://aeiagro.galeoncom>. Consultado: 13-04-09.
 21. EGAN, T., y I. UNGAR. 1998. Effects of different salts of sodium and potassium on the growth of *Atriplex prostrata* (*Chenopodiaceae*). **Journal of Plant Nutrition**. 21(10): 2193-2205.
 22. FISCHER, R. y N. TURNER. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. **Annual Review of Plant Physiology**. 29:277-317.
 23. FORNASERO, L.V., M. TONIUTTI, S.P. GAMBAUDOY y H.A. MICHELOUD. 2007. Fertilización Biológica. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. AUTOR: Cátedra de Diagnostico y Tecnología de Tierras, FCA, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Argentina.
 24. GADALLAH, M. 1996. Abscisic acid, temperature and salinity interactions on growth and some mineral elements in *Carthamus* plants. **Plants Growth Regulator**. 20: 225-236.

25. GRATTAN, S y C. GRIEVE. 1999. Mineral Nutrients Acquisition and Response by plants. Grown in Saline Environments. **In Handbook of Plant and Crop Stress**. Ed. Mohammad Pessaraki. New York. Cap 9: 203-229.
26. HARTUNG, W. y W. JESSCHKE. 1999. Abscisic Acid: A long-Distance Stress Signal in Salt-Stressed Plants. En: Lerner H. (ed.) **Plant responses to Environmental Stresses**. Marcel Dekker, Inc. New York.
27. INTA, 1999. El cultivo de maíz. En: www.inta.gov.ar/actual/noticias.html. Consultado: 12-07-2008.
28. ISTA (International Seed Test Association). 2007. **International Rules for Seed Testing**. ISTA Editorial. USA.
29. LA NACION, 2009. Actualizaciones del maíz. En: <http://www.lanacion.com.ar>. Consultado: 13-04-09.
30. LONE, M. 1988. Ionic relations of barley embryos response to equimolar salts. **Managing Soil Resources**. Proceedings of First National Congress of soil Science.
31. LONGSTRETH, D., y P. NOBEL. 1979. Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. **Plant Physiology**. 63: 700-703.
32. MEDINA CAZARES, L. 2007. Situación mundial del Maíz. Revista del Comité Ciudadano de Evaluación Estadística y Economía (CEEES) pp: 1-3.
33. OKON, Y. 1985. *Azospirillum* as potential inoculant for agriculture. **Trends Biotechnol.** 3: 223-228.
34. OKON, Y. y LABANDERA-GONZALEZ. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.** 26: 1591-1601.
35. PATTEN, C., y B. GLICK. 1996. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. **Can J. Microbiol.** 42: 207-220.
36. PERRIG, D., L. BOIERO, O. MASCIARELLI, C. PENNA, R. RUIZ, F. CASSAN, y V. LUNA. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomical important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculants formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 75: 1143-1150.
37. PERRIG, D., O. MASCIARELLI, A. PERTICARI, F. CASSAN y V. LUNA. 2007. Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasilense* az39, la cepa mas utilizada en la formulación de inoculantes para gramíneas en Argentina. **V Reunión Nacional de Biología de Suelos**: CD ROM-PGPR; ISBN 950-721-237-1. San Salvador de Jujuy, Argentina.

38. PRISM version 4.0. 2009. GraphPad Software Inc. San Diego California. USA.
En: www.graphpad.com. Consultado: 25-02-09.
39. RAMADU, M. 2008. *Respuesta del cultivo de soja (Glycine max L.) a salinidad mediada por la inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)*. Tesis de grado. Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UNRC. pp. 35.
40. RAMADU, M., L. LEPORE, F. CASSAN y V. LUNA. 2007. Respuesta de la soja (*Glycine max* L.) a salinidad por ClNa y Na₂SO₄ mediada por la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento o la aplicación exógena de ABA. **VI REBIOS**. ISBN: 978-950-665-438-2. Río Cuarto. Argentina.
41. REGINATO, M. 2003. *Efectos de NaCl y Na₂SO₄ sobre el crecimiento, contenido de iones y pigmentos de plántulas de Prosopis strombilifera*. Trabajo final para optar al grado de lic. en Ciencias Biológicas. Biblioteca UNRC.
42. REIMANN, C., y S. BRECKLE. 1995. Salt tolerant and ion relations of *Salsola kali* L.: differences between ssp. *tragus* (L.) Nyman and ssp. *ruthenica* (Iljin). **The New Phytologist**. 130: 37-45.
43. REINOSO, H. L. SOSA, L. RAMIREZ y V. LUNA. 2004. Salt induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (*Leguminosae*). **Canadian Journal of Botany**. 82: 618-628.
44. RHOADES, J. y J. LOVEDAY. 1990. Sanity in irrigated agriculture. En: Stewars, B, and Nielsen, D. (Eds.). **Irrigation of Agricultural Crops**. ASA-CSAA-SSSA, Madison, WI.
45. RITCHIE, S., y J. HANDWAY. 1982 **How a corn plant develops**. Iowa state University of Science and Technology, Ames, Iowa.
46. SAGPYA, 2009. Estimaciones agrícolas. En:
http://www.sagpya.gov.ar/SAGPyA/areas/estimaciones_agricolas. Consultado: 25-02-09.
47. SHANNON, M. 1997. Adaptation of plants to salinity. **Advances in Agronomy**. 60: 75-120.
48. SHANNON, M., C. GRIEVE y L. FRANCOIS. 1999. Whole plant response to salinity. En: Shannon, M. (ed.) **Plant responses to environmental stress**. Editorial Marcel Dekker. New York.
49. SHI, D. y B. SHENG. 2005. Effect of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environmental and Experimental Botany*. 54: 8-21.

50. SHINOSAKI, K., y L. YAMAGUCHI-SHINOSAKI. 1997. Gen expression and signal traducing in water-stress response. **Plant Physiology**. 115: 327-334.
51. SOMASEGAREN, P. y H. HOBEN (1994). **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer Verlag. New York.
52. SOSA, L., A. LLANES, H. REINOSO, M. REGINATO y V. LUNA. 2005. Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. **Annals of botany**. 96: 261-267.
53. TIEN, T., M. GASKIN, y D. HUBELL. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl Millet. **Appl. Environ. Microbiol.** 37:1016-1024.
54. WARNE, P., R. GUY, L. ROLLINS y M. REID. 1990. The effects of sodium sulphate and sodium chloride on growth, morphology, photosynthesis, and water use efficiency of *Cenopodium rubrum*. *Canadian Journal of Botany*. 68:999-1006.
55. WINICOV, I. y D. BASTOLA. 1999. Plant responses to water deficit. **Plant Physiology**. 120(2): 473-480.
56. XION, L y J.K. ZHU. 2002. Salt Tolerance. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologist. 1-22.