

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

“Trabajo Final para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la salinidad, mediada por la inoculación
con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
del género *Azospirillum*

Matías Ignacio Calcagno

30.612.735

Director: Dr. Fabricio Cassán

Co-Directora: Dra. Virginia Luna

Río Cuarto, Córdoba, Argentina,

Mayo del 2009

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la salinidad, mediada por la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*.

Autor: Matías Ignacio Calcagno

DNI: 30.612.735

Director: Dr. Fabricio Cassán

Co-Director: Dra. Virginia Luna

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

MSc. Ing. Agr. Cesar Omar Núñez.

Dra. Alicia Thuar.

Ing. Agr. Guillermo March.

Fecha de presentación:

Aprobado por Secretaría Académica:

Secretario Académico:

AGRADECIMIENTOS

- Como siempre, agradezco a Dios y a la virgen María por regalarme este don especial que es la vida, por mi familia, amistades, compañeros y por tanta gente fabulosa que me acompaña, y ayuda en este camino tan lindo que es la vida, así es que le agradezco infinitamente por todo.
- A mis padres, Ester y Juan Carlos, quienes me dieron la vida, y la educación que tengo la oportunidad de gozar. Por su apoyo y confianza constante que fue y será un pilar fundamental en mi vida, ya que me brindaron las fuerzas necesarias para no bajar los brazos ni aún en los momentos más difíciles, y poder así llegar a cumplir un sueño que anhelaba desde muy chico, el cual me propuse cumplir al iniciar la carrera y que en estos días se me está cumpliendo; también quiero agradecer a mis hermanos, Melisa y Sebastian, quienes con pequeños momentos cotidianos compartidos demuestran los grandes sentimientos difíciles de expresar.
- A mi director de tesis Dr. Fabricio Cassán por su apoyo incondicional, quien con su pensamiento crítico y toda su energía, me guió, encaminó y aportó todas las herramientas básicas necesarias para recorrer el camino científico en la realización de este trabajo y que aparte de lo institucional, supimos forjar una amistad que seguro perdurará para siempre.
- A la Dra. Virginia Luna por el apoyo académico y humano que me brindó desde el primer momento en que llegué al laboratorio, por su confianza, la que fue fundamental para planear, organizar y desarrollar cada punto del trabajo final realizado y de lo que estoy muy profundamente agradecido a ella.
- A mis abuelos Otilia, Roberto y Armando, que a pesar de la distancia, siempre me dieron su cariño y apoyo incondicional; a mi abuela Anita que desde el cielo sé que me está guiando por el mejor camino y que me dio un claro ejemplo de vida.
- Al Mic. Oscar Masciarelli, por su apoyo desinteresado, que me ayudó en la investigación y durante la realización del trabajo, ofreciéndome tanto información como su experiencia del trabajo en laboratorio.
- A mis amigos por acompañarme, aconsejarme y compartir tantas aventuras y momentos en mi vida que jamás voy a olvidar.

- A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC por los fondos otorgados para este desarrollo experimental, así como la beca de fomento a la investigación que se me otorgó, permitiéndome realizar nuevos experimentos sobre el tema investigado y ampliar tanto mis conocimientos como experiencias en mi 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

Agradecimientos	II
Resumen	V
Summary	VI
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
Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento de <i>Azospirillum</i> sp.	5
Hipótesis	6
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Materiales, Técnicas y Métodos	7
Material Vegetal	7
Inoculante comercial	8
Condiciones generales del ensayo de germinación en cámara	8
Condiciones generales del ensayo de crecimiento temprano en cámara	9
Condiciones generales del ensayo de crecimiento en invernáculo	11
Resultados y Discusión	13
Ensayo de germinación en cámara de cultivo	13
Ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo	18
Ensayo de crecimiento temprano en invernáculo hasta V6-V7	21
Conclusiones	25
Bibliografías	27

RESUMEN

La salinización de los suelos disminuye la frontera agrícola generando suelos de baja productividad. Esta situación justifica la búsqueda de nuevas alternativas destinadas a ampliar la superficie de siembra en condiciones edáficas limitantes y/o incrementar la productividad de las mismas. Una posible alternativa para mejorar la respuesta vegetal en condiciones de salinidad, se basa en la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Azospirillum*, a fin de mejorar la implantación y productividad de los cultivos. En tal sentido, se propone la utilización de microorganismos capaces de regular el crecimiento vegetal, destinados a mejorar el balance hídrico de la planta en suelos con alto contenido de NaCl o Na₂SO₄. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento y el estado hídrico de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* sometidas a estrés salino en condiciones controladas (cámara de crecimiento) y semi-controladas (invernáculo) de cultivo hidropónico en medio sólido. Se utilizaron frutos de maíz de un híbrido simple Morgan, MASS 484 MG, correspondiente a un ciclo de crecimiento intermedio/precoc, inoculadas con la cepa PGPR, Az39 de *Azospirillum brasilense*. Los tratamientos salinos fueron NaCl, Na₂SO₄ y su mezcla isoosmótica, el medio nutritivo fue Hoagland 25%, y la bacterización se llevó a cabo con micropipeta a nivel radicular en un experimento y directamente sobre el fruto en el otro. Los resultados obtenidos nos permiten corroborar que la inoculación en condiciones controladas contrarresta el estrés salino incrementando el peso fresco, peso seco, y puede ser considerada como una alternativa tecnológica viable para aliviar al menos en parte, el efecto tóxico de la salinidad de los suelos.

Palabras clave: *Zea mays* L; salinidad; *Azospirillum brasilense*; inoculación.

SUMMARY

Soil salinization diminishes the agricultural frontier generating soils of low productivity. This situation justifies the search of new alternatives destined to extend the agricultural practice in restrictive soils and/or to increase the productivity in optimal conditions. A possible strategy to improve the soybean answer in salinity conditions is based on the seed inoculation with the PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) *Azospirillum brasilense* under both, optimal and abiotic stress conditions. In this regard, the use of rhizospheric microorganisms capable of promote or regulate the plant growth, improving the plant water balance in saline soils with high concentration of NaCl or Na₂SO₄ could be proposed as a suitable method for this purpose. The principal aim of this work was to evaluate the plant growth and water state of maize (*Zea mays* L.) seedlings inoculated with the strain Az39 of *A. brasilense* and cultivated under saline stress conditions generated by NaCl, Na₂SO₄ or their combination, in both, growth chamber and greenhouse hydroponic conditions. In this work, we used a single hybrid Morgan, MASS 484 MG maize seeds, corresponding to a early/intermediate growth cycle. Seeds were inoculated with the PGPR strain Az39 of *A. brasilense* in concentration and dose recommended for field conditions. Inoculation was conducted with micropipette over the natural seeds for germination and early growth state assays, or over the root seedlings for late growth state assays. Saline conditions were generated by addition of 100-150 mM of NaCl, an isosmotic concentration of Na₂SO₄ or their isosmotic combination into the complete Hoagland (25%) nutritive solution. Results of this work allow us to corroborate that maize inoculation with *Azospirillum* sp. under experimental controlled conditions, could alleviate the plant's saline stress improving the water stress (fresh weight) and biomass production (dry weight). In this sense, this simple and not expensive practice could be considered as a potential alternative technology to alleviate the toxic effect of soil salinity in many important regional crops.

Key words: *Zea mays* L; salinity; *Azospirillum brasilense*; inoculation.

1. Fundamentación

A medida que la población mundial incrementa, se hace necesario encontrar nuevas alternativas tecnológicas destinadas a mejorar la productividad agrícola y aprovechar eficientemente los recursos disponibles. Una manera de lograrlo, se basa en el desarrollo de cultivos tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico, como sequía, inundaciones, altas y bajas temperaturas, radiación excesiva, congelamiento, salinidad, etc. con el fin de que las tierras marginales puedan ser cultivables. En nuestro país, fundamentalmente en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y San Luis, este concepto tiene una fuerte connotación debido a que la salinización de los suelos disminuye de manera progresiva su frontera agrícola y ganadera, generando así condiciones de baja productividad. La generación de nuevas estrategias destinadas a mejorar la implantación de cultivos de alto interés económico, como lo es 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. Una posible alternativa tecnológica de bajo costo para mejorar este cultivo en condiciones de salinidad, se basa en la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) del género *Azospirillum* capaces de mejorar su implantación y productividad en condiciones óptimas como restrictivas. En numerosas especies la inoculación con PGPRs ha determinado una mejor implantación y una mayor productividad en los cultivos, comparadas con tratamientos no inoculados. Si bien estos incrementos son de considerable valor comercial, la falta de información del sector agrícola nacional es una de las mayores barreras que restringe su aplicación a gran escala. Actualmente, la industria de inoculantes nacional está centralizada en la obtención de bioformulados para tierras de alto potencial de producción, a pesar del avance progresivo en la desertificación por problemas de sequía o salinidad. Debido a su capacidad de sintetizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal, *Azospirillum* sp. ha sido descrito como partícipe directo en el establecimiento de la plántula en el sustrato y su desarrollo en los primeros estadios de crecimiento. Estas bacterias así como sus compuestos reguladores, podrían ser la segunda piedra angular del desarrollo de una nueva tecnología, de bajo costo en la industria de inoculantes para gramíneas y podrían servir como modelo experimental para modificar la formulación convencional de inoculantes para otras especies. La integración del conocimiento obtenido de este trabajo, permitirá no sólo un avance notable en la comprensión de

la fisiología de la interacción planta-rizobacterias-salinidad, sino que además permitirá en etapas posteriores, la implementación de prácticas extensivas de tratamiento de cultivo, lo que sugiere una fuerte inserción institucional de la UNRC en el sector productivo regional, mediante la vinculación científico-tecnológica con empresas o productores agrícola interesados en aplicar nuevas innovaciones tecnológicas.

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, México, Francia, Argentina con una producción total mundial de alrededor de 600 millones de Tn.año⁻¹ (www.monografias.com/trabajos/elmaiz.html).

2.2. El cultivo de maíz en nuestro país

Se siembra fundamentalmente en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y San Luí, de acuerdo a las diferentes características agroclimáticas. La superficie actualmente sembrada es de 4.000.000 has, representando un 32.2% de la superficie total sembrada con cereales (12.407.000 has) y generando una producción de 20.500.000 toneladas.año⁻¹. Esta especie participa de las exportaciones agroindustriales con un 7 % del total (durante el 2004) y con el 38% del total de granos exportados en 2007. En cuanto a la posición de nuestro país en el mercado tiene una importante relevancia porque es el segundo exportador y el sexto productor mundial de maíz. El cultivo de maíz está -muy influenciado por el régimen térmico e hídrico siendo el último el de mayor importancia en el desarrollo del cultivo y en la determinación del rendimiento y productividad. Desde el punto de vista de su plasticidad, se adecua a un amplio rango de tipos de suelo aunque los mejores resultados se obtienen en aquellos con mayor fertilidad y capacidad de retención de agua (www.sagpya.mecon.gov.ar).

2.3. Características morfofisiológicas

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie de crecimiento anual que alcanza una altura de 3 m, las hojas forman una larga vaina arrollada íntimamente al tallo y un limbo más ancho, alargado y flexuoso, con nervaduras paralelas; las espiguillas masculinas y femeninas se encuentran en inflorescencias separadas. La masculina en una panoja apical y las femeninas en espigas axilares protegidas por brácteas foliáceas. 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 (www.inta.gov.ar).

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

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 (Rhodes y Hanson, 1993). En nuestro país al menos 34.000.000 has están sometidas al exceso de agua y sales minerales y por ello sujetas a condiciones ecológicas extremas y a una drástica reducción en su productividad. Desde el punto de vista fisiológico, la salinidad determina dos tipos de estrés en los tejidos vegetales: un estrés hídrico ocasionado por el aumento relativo de la concentración de solutos y la consecuente disminución en la disponibilidad de agua en el suelo, y un estrés iónico que resulta de la modificación en la relación de K^+/Na^+ y en las concentraciones de Na^+ y Cl^- que son perjudiciales para la planta. Shannon y Grieve (1999) afirman que el factor osmótico de la salinidad es responsable de reducir la tasa de crecimiento (principalmente en los estadios de germinación y crecimiento de plántula) y de modificar la arquitectura vegetal (proporción raíz/tallo). El efecto iónico se manifiesta generalmente como daño generalizado en el meristema y hojas jóvenes, o como síntomas típicos de desórdenes nutricionales. Según Gadallah (1996), además de reducción en el 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}). Éstos 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^{++} y Mg^{++} , mientras que los principales aniones son Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- . En base a esto, Grattan y Grieve (1999) manifiestan que resulta sorprendente que la mayoría de los estudios sobre salinidad se lleven a cabo considerando al NaCl como el único agente salinizante, limitando la posibilidad de extrapolación de resultados a condiciones reales de campo. En los suelos salinizados del sur de Córdoba, las sales predominantes son NaCl y Na_2SO_4 (Sosa *et al.*, 2005). Según Egan y Ungar (1998), muy pocos estudios enfocan los efectos del Na_2SO_4 en el crecimiento vegetal, a pesar de ser de interés creciente la comparación de los mismos con los del NaCl. 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). Sobre la base de la tolerancia relativa a la condición impuesta por la salinización, se han considerado cuatro niveles de respuesta para diversos cultivos: tolerantes (T), moderadamente tolerantes (MT), moderadamente sensibles (MS) y sensibles (S). De esta manera, la búsqueda de poblaciones vegetales tolerantes (T), así como la comprensión de la base fisiológica de su respuesta a la salinidad, se considera como un tema prioritario de estudio.

Con el aumento de la población mundial, es necesario encontrar nuevas alternativas para mejorar la productividad agrícola y aprovechar eficientemente los recursos naturales disponibles. Una de estas estrategias se focaliza en la obtención de cultivos tolerantes a diferentes tipos de estrés con el objeto de introducirlos en las tierras marginales o no utilizadas. A nivel nacional, los suelos salinos aumentan su superficie año tras año, lo que produce una disminución de la productividad y disponibilidad de los mismos para su explotación. En este sentido, Holmberg y Bülow (1998) consideran que la estrategia básica para transferir la capacidad de respuesta a un estrés, de una planta tolerante a una no tolerante comienza con: i) La búsqueda y selección de organismos que naturalmente viven en condiciones extremas de estrés y ii) El estudio fisiológico y bioquímico del organismo bajo condiciones estresantes y no estresantes. De esta manera, la búsqueda de poblaciones vegetales tolerantes, así como la comprensión de la base de su respuesta a la salinidad, se considera como un tema prioritario de estudio. En nuestro país existen poblaciones vegetales exitosamente adaptadas a ambientes de

baja disponibilidad hídrica o salinidad 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. Ello les permitiría 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 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 PGPRs 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 *Z. mays* con rizobacterias del género *Azospirillum* sp. en condiciones de salinidad. En la actualidad, este género microbiano es considerado como un partícipe directo en establecimiento efectivo de ciertas especies cultivables y en la promoción de su desarrollo en los primeros estadios de crecimiento (Bashan *et al.*, 2004) y en numerosas especies, la inoculación con *Azospirillum* sp. ha determinado una mejor implantación en el sustrato, así como un consecuente aumento de su productividad (Okon and 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.*, 2005).

2.5. 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 maneras 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 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 and Glick, 1996), citocininas (Tien *et al.*, 1979) y giberelinas (Cassan *et al.*, 2003), además de ciertas poliaminas como la cadaverina (Cassán *et al.*, 2008b), 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 este y otros microorganismos como estrategia para incrementar la productividad de cultivos de interés económico o ecológico (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994) aún en condiciones desfavorables (Barassi *et al.*, 2006).

3. Hipótesis

La inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum*, en semillas y plántulas de maíz (*Zea mays* L.) tratadas con NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, determinará una mayor eficiencia en el uso del agua, un mayor crecimiento y una mayor acumulación de materia seca.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar la respuesta de crecimiento y el estado hídrico de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y sometidas a condiciones de estrés salino por NaCl, Na₂SO₄ o su mezcla isosmótica, en condiciones controladas (cámara de crecimiento) y semi-controlados (invernáculo) de cultivo hidropónico.

4.2. Objetivos específicos

1-Evaluar la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* en condiciones de cultivo recomendadas para la especie o modificadas por la adición de concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica.

2-Evaluar peso fresco y peso seco aéreo y radical, en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y cultivadas en condiciones controladas (cámara de crecimiento), en sistemas hidropónicos suplementados con concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica, en comparación con las plántulas no inoculadas.

3-Evaluar peso fresco y peso seco aéreo y radical, longitud final de tallo principal y raíz primaria y curva de crecimiento de tallo en plantas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con rizobacterias del género *Azospirillum* y cultivadas en condiciones semi-controladas (invernáculo) en sistemas hidropónicos suplementados con concentraciones equivalentes de NaCl y Na₂SO₄ o su combinatoria isosmótica, en comparación con las plántulas no inoculadas.

5. Materiales y Métodos

5.1. Material Vegetal

En todos los experimentos se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.), híbrido simple Morgan MASS 484 MG, de ciclo de crecimiento intermedio. Antes 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 con la cepa Az39 de *A. 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 testeada por Perrig *et al.* (2007) sobre su capacidad de promover el crecimiento vegetal en medio definido.

5.3. Condiciones generales del ensayo de germinación en cámara

Para el desarrollo del experimento, se utilizaron cajas de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro como soporte impregnado con 10 ml de H₂O como control o soluciones -0,2; -0,3; -0,4 y -0,6 MPa de NaCl; Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, de acuerdo a cada tratamiento. Previo a la siembra, las semillas fueron inoculadas con dosis recomendadas de los productos mencionados a base de microorganismos y adicionalmente se consideró un tratamiento sin bacterización. La preparación de cada sal y su equivalencia en concentración de iones se detalla a continuación en las Tablas A y B:

Tabla A: Preparación de soluciones entre 0,05 y 0,15 M de NaCl, a partir de una solución 1M y su equivalencia en términos de potencial osmótico, de acuerdo a Sosa *et al.* (2005).

MOLARIDAD	POTENCIAL OSMÓTICO	SOLUCION 1 M NaCl (ml)	H₂O destilada (ml)
0,05	-0,1 Mpa	4,5	85,5
0,075	-0,3 Mpa	6,72	83,25
0,1	-0,4 Mpa	9	81
0,15	-0,6 Mpa	13,5	77,5

Tabla B: Preparación de soluciones entre 0,05 y 0,15 M de Na₂SO₄, a partir de una solución 1M y su equivalencia en términos de potencial osmótico, de acuerdo a Sosa *et al.* (2005).

MOLARIDAD	POTENCIAL OSMÓTICO	SOLUCION 1 M Na ₂ SO ₄ (ml)	H ₂ O destilada (ml)
0,044	-0,1 Mpa	4	86
0,066	-0,3 Mpa	6	84
0,088	-0,4 Mpa	8	82
0,132	-0,6 Mpa	12	78

La experiencia se desarrolló con un diseño aleatorio de dos réplicas por tratamiento (n=10) y en cada cápsula se colocaron 10 semillas de maíz. Las placas con las semillas fueron colocadas en una cámara de germinación mantenida a 25 °C y condiciones de oscuridad hasta la finalización del ensayo. El parámetro determinado en todos los casos fue el número de semillas germinadas por réplica, considerando como tales a aquellas que presentan más de 0.5 cm de longitud la radícula. Los intervalos de evaluación fueron establecidos cada 24 horas hasta el momento de la evaluación de la energía germinativa o EG (4 días), de acuerdo a normas ISTA (Internacional Seed Test Association), más una evaluación final a los 7 días correspondiente a la evaluación de poder germinativo o PG, para la misma especie. En ambos casos se consideró el porcentaje expresado como el número de semillas germinadas sobre el total de semillas existentes en la placa. Adicionalmente, para la construcción del comportamiento poblacional expresado como crecimiento sigmoideo, se consideró el valor promedio así como su desvío standard (SD) para el total de semillas germinadas en cada placa y cada tratamiento.

5.4. Condiciones generales del ensayo de crecimiento temprano en cámara de cultivo

La experiencia se llevó a cabo con un diseño aleatorio, de tres réplicas por tratamiento (n=10) y los datos fueron analizados por ANOVA y test de Tuckey *a posteriori* con p<0.05. Para ello, 300 semillas fueron sembradas en bandejas plásticas conteniendo arena y agua destilada estéril (60 % de capacidad de campo). Las semillas fueron cultivadas en cámara de germinación con un fotoperíodo de 16 h de luz a 30° C y 8 h de oscuridad a 25° C con 80 % de HR durante 72 h. Transcurrido este período, se seleccionaron los individuos con crecimiento y características morfológicas uniformes y se implantaron en un sistema de bandejas plásticas con receptáculos individuales de 100 ml de capacidad, conteniendo vermiculita estéril como único sustrato y solución nutritiva de Hoagland 25% (Hoagland y Arnon, 1950) suministrada por riego capilar. Las plántulas fueron inoculadas luego de 48 h desde la implantación, con una dosis de 2 x 10⁸

UFC.ml⁻¹ de la cepa Az39 de *A. brasilense* formulada en el producto BONUS® de la empresa Nitragin Argentina SA. en los tratamientos presentes. La bacterización se llevó a cabo utilizando una micropipeta y a nivel radicular y luego las plántulas fueron cultivadas por 12 días en las condiciones ambientales descritas anteriormente, de acuerdo a los siguientes tratamientos:

- 1-Plántulas sin inocular.
- 2-Plántulas inoculadas con *A. brasilense* Az39.
- 3-Plántulas tratadas con 100 mM de NaCl.
- 4-Plántulas tratadas con 100 mM de Na₂SO₄.
- 5-Plántulas tratadas con 100 mM de NaCl y Na₂SO₄.
- 6-Plántulas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas con 100 mM de NaCl.
- 7-Plántulas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas con 100 mM de Na₂SO₄.
- 8-Plántulas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas con 100 mM de NaCl y Na₂SO₄.

La salinización comenzó luego de 48 horas desde la inoculación. Para ello, la solución nutritiva de Hoagland 25 %, fue modificada por la adición de 100 mM de NaCl (-0,4 MPa); una concentración equivalente de Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales. Al finalizar la experiencia, fueron evaluados los siguientes parámetros de crecimiento: (a) peso (fresco y seco) aéreo y radical (b).



Fotografías 1 y 2. Condiciones generales del ensayo y estado fenológico de plántulas de maíz (*Zea mays* L.), al momento de la salinización (izquierda) y luego de 7 días desde la inoculación (derecha) con *Azospirillum brasilense*.

5.5. Condiciones generales del ensayo de crecimiento en invernáculo

La experiencia fue desarrollada en el invernáculo de la Universidad Nacional de Río Cuarto, que se encuentra emplazada sobre la ruta nacional n° 36 Km. 601, Las Higueras, Córdoba (33° 07' Latitud Sur, 64° 14' Longitud Oeste, 421 m.s.n.m.) durante la campaña 2005-2006 (Febrero-Abril 2006), bajo condiciones semi-controladas de temperatura y luz natural. El ensayo se llevó a cabo con un diseño experimental "anidado" que consistió en 8 tratamientos con tres repeticiones cada uno. Cada repetición (maceta) de cada tratamiento (3 macetas) contuvo 5 semillas que fueron colocadas en macetas plásticas flexibles de 20 cm de diámetro x 20 cm de longitud, conteniendo como soporte inerte una mezcla de perlita:arena (2:1) estéril según Somasegaran *et al.* (1994). Para asegurar el crecimiento sin deficiencias nutricionales, todas las semillas fueron inoculadas con la cepa Az39 de *A.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 maíz en la República Argentina. Debido a la imposibilidad de obtener un producto de la misma firma comercial que el utilizado en los ensayos en condiciones controladas, la forma de aplicación y la cantidad de bacterias por unidad de siembra se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del marbete de un producto de similares características producido en la ciudad de Jesús María (Córdoba), que recomienda la aplicación de 10 ml de formulación concentrada con un título de $1E+9$ UFC.ml⁻¹, para 50 kg de semillas (0,2 ml.kg⁻¹). Cada maceta recibió por capilaridad agua destilada estéril hasta el momento de la emergencia. A partir de este momento el riego capilar se realizó con solución nutritiva de Hoagland 25%, que se renovó cada 7 días hasta la finalización del ensayo.

Las variantes para cada tratamiento se resumen a continuación:

- 1-Semillas sin inocular.
- 2-Semillas inoculadas con la cepa Az39.
- 3- Semillas tratadas con 150 mM de NaCl.
- 4- Semillas tratadas con 150 mM de Na₂SO₄.
- 5- Semillas tratadas con 150 mM de NaCl y Na₂SO₄
- 6-Semillas tratadas con 150 mM de NaCl e inoculadas con la cepa Az39.
- 7-Semillas tratadas con 150 mM de Na₂SO₄ e inoculadas con la cepa Az39.
- 8-Semillas tratadas con 150 mM de NaCl y Na₂SO₄ e inoculadas con la cepa Az39.

La salinización comenzó a los 15 días posteriores a la siembra, mediante pulsos de 50 mM de la sal correspondiente, cada 7 días hasta que alcanzó una concentración final de 150 mM.

La experiencia completa finalizó cuando las plantas alcanzaron el estado fenológico correspondiente a V6-V7 según la escala de desarrollo de Ritchie-Hanway. (1982), evaluándose los siguientes parámetros de crecimiento: (a) número de plántulas establecidas, (b) peso seco y peso fresco aéreo y radical. Los datos obtenidos se analizarán mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un test de Tukey *a posteriori* con $p < 0.05$, en el software para diseño estadístico, Prism 4.0 para Windows.



Fotografías 3 y 4. Condiciones generales del ensayo y estado fenológico de plántulas y plantas de maíz (*Zea mays* L.), al momento de la emergencia (Ve) (parte superior) y en el momento de la salinización, luego de 15 días desde la siembra, con un estadio vegetativo correspondiente a V3-V4 (parte inferior).

6. Resultados y Discusión

6.1. Ensayo de germinación en cámara de cultivo

Cuadro 1. Porcentaje (%) de semillas germinadas en placas de Petri embebidas con volúmenes constantes de agua (control), soluciones de NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, de acuerdo al tratamiento, como se describe en materiales y métodos.

		C	MPa de NaCl				MPa de Na ₂ SO ₄				MPa de NaCl+ Na ₂ SO ₄			
Lectura	T	0	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6
1	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	48	90	60	65	35	20	60	55	50	0	65	35	25	50
3	72	95	95	95	90	85	85	80	70	60	100	85	90	80
4-EG	96	95	95	95	95	85	95	85	75	75	100	95	95	85
5-PG	168	100	100	100	100	100	95	90	95	95	100	95	100	100

C: Concentración osmótica de las soluciones expresadas como Mpa.

T: Tiempo de evaluación desde tiempo 0 (comienzo del ensayo).

Como se observa en el **Cuadro 1**, la mayor respuesta a nivel de la velocidad de germinación, se obtuvo en el tratamiento control (C), en el que luego de 48 horas de incubación, se logró un 90% de semillas germinadas. Por otro lado, el máximo porcentaje de germinación se obtuvo para la mayoría de los tratamientos salinizados, al momento de la evaluación del poder germinativo, luego de 7 días desde la incubación. La única excepción para este comportamiento, fue obtenida en la semillas tratadas con la solución -0.2 Mpa de mezcla la isosmótica, en las que se determinó el máximo valor germinativo (100%) luego de 72 horas de incubación. La respuesta de germinación en las condiciones experimentales propuestas, podría explicarse tanto desde el comportamiento osmótico como iónico de cada sal adicionada. Desde el punto de vista osmótico, podemos observar que en todos los casos las semillas tuvieron capacidad de realizar un ajuste osmótico para adaptar su potencial interno con el externo, incorporando de iones desde la solución, hecho que determinó la posterior incorporación de agua, imbibición y finalmente germinación. Al respecto, Shannon (1997) menciona que en presencia de sales la germinación y crecimiento temprano se ven principalmente inhibidos por el componente osmótico de la sal; sin embargo, desde el punto de vista iónico, podemos mencionar que la salinización determinó una disminución, tanto del porcentaje de semillas germinadas, como de la velocidad de germinación y que cada sal tuvo un comportamiento diferencial. En tal sentido, podemos mencionar que tanto para el control no salinizado como para las semillas tratadas con NaCl se obtuvo un máximo

valor de germinación (100 %); mientras que en las semillas tratadas con Na_2SO_4 (de manera individual o combinada) uno o más los tratamientos presentaron un porcentaje de germinación inferior (90-95 %). A partir de los datos presentados en el **Cuadro 1**, podemos mencionar que el NaCl , tuvo una mayor toxicidad sobre la germinación durante las primeras 72 horas en concentraciones menores a $P_0 = -0.4$ Mpa. De la misma manera, podemos mencionar este comportamiento para el Na_2SO_4 , pero en todas las concentraciones generadas. Por otro lado, la mezcla isosmótica de sales presentó un comportamiento intermedio y su respuesta se comparó a la del cloruro o sulfato de sodio, dependiendo del potencial osmótico generado, donde a potenciales menores (-0.2, -0.3 Mpa) se determinó una respuesta similar al sulfato de sodio y a potenciales mayores (-0.4, -0.6 Mpa), una respuesta similar al cloruro de sodio. Desde el punto de vista del tiempo de incubación, podemos mencionar que durante las primeras 48 horas de incubación, la mezcla isosmótica tuvo un comportamiento intermedio, mientras que luego de las 96 horas, su comportamiento se asemejó al de las semillas tratadas con NaCl .

Cuando los valores se ajustaron a un modelo exponencial de crecimiento, como indica la **Figura 1**, los tratamientos salinizados, fueron inferiores que el control sin salinizar en la mayor parte de los resultados; sin embargo, a un potencial osmótico de -0.2 Mpa no se observaron diferencias significativas entre el control y las semillas tratadas con NaCl y la mezcla isosmótica de sales. En el mismo potencial, las semillas tratadas con Na_2SO_4 mostraron una respuesta inferior a partir de las 72 horas de incubación y tal respuesta se extendió hasta el final del ensayo. Esta respuesta se intensificó a potenciales de -0.3 Mpa debido a que las semillas tratadas con Na_2SO_4 mostraron un efecto inhibitorio a partir de las 48 horas. Con un potencial de -0.4 Mpa, se observó que las semillas salinizadas, presentaron un comportamiento más alejado del tratamiento control sin salinizar, durante las primeras 96 horas de incubación y que esta tendencia fue revertida hacia el final del ensayo solo en las semillas tratadas con NaCl y la mezcla isosmótica de sales. Finalmente, con un potencial osmótico de -0.6 Mpa se determinó una fuerte inhibición de la germinación, en las semillas salinizadas y tratadas con NaCl o Na_2SO_4 de manera individual. Adicionalmente, la inhibición se comprobó para las semillas tratadas con la mezcla isosmótica durante las primeras 72 horas de incubación; sin embargo, luego de este período, el comportamiento de la población fue similar al control no salinizado, por lo que se supone que el comportamiento intermedio obtenido se debería a la capacidad de las semillas para mantener la homeostasis solo en presencia de ambas sales.

Para resumir, podemos mencionar que las semillas salinizadas con Na_2SO_4 mostraron una respuesta inferior, tanto a nivel de la velocidad (Figura 1), como en el porcentaje de semillas germinadas (Cuadro 1) y que tal efecto fue igualado en las semillas tratadas con NaCl , en

tratamientos de menor potencial osmótico (-0.6 MPa). Al respecto, estudios previos realizados en nuestro laboratorio por Quetglas *et al.* (2008) y Ramadú *et al.* (2007) a nivel de la respuesta germinativa de soja (*Glycine max* L.) tratada con las mismas soluciones, determinaron solo una respuesta inhibitoria en el caso del Na_2SO_4 , solo o en combinación con el NaCl. Similares resultados fueron informados por Lone, (1988), en los que determinó la mayor toxicidad del ión SO_4^{2-} a nivel del crecimiento y desarrollo de embriones de cebada (*Hordeum vulgare* L.). Similares resultados fueron informados por Warne *et al.* (1990) en la halófito *Chenopodium rubrum*, en la que el Na_2SO_4 fue más inhibitorio sobre el crecimiento y tóxico en los tejidos que el NaCl. Por su parte, Shi and Sheng. (2005), determinaron una respuesta similar para girasol (*Helianthus annuus* L.) tanto por la salinización con SO_4Na_2 , 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 sal era combinada con el Cloruro en soluciones isosmóticas bisalinas (Sosa *et al.*, 2005).

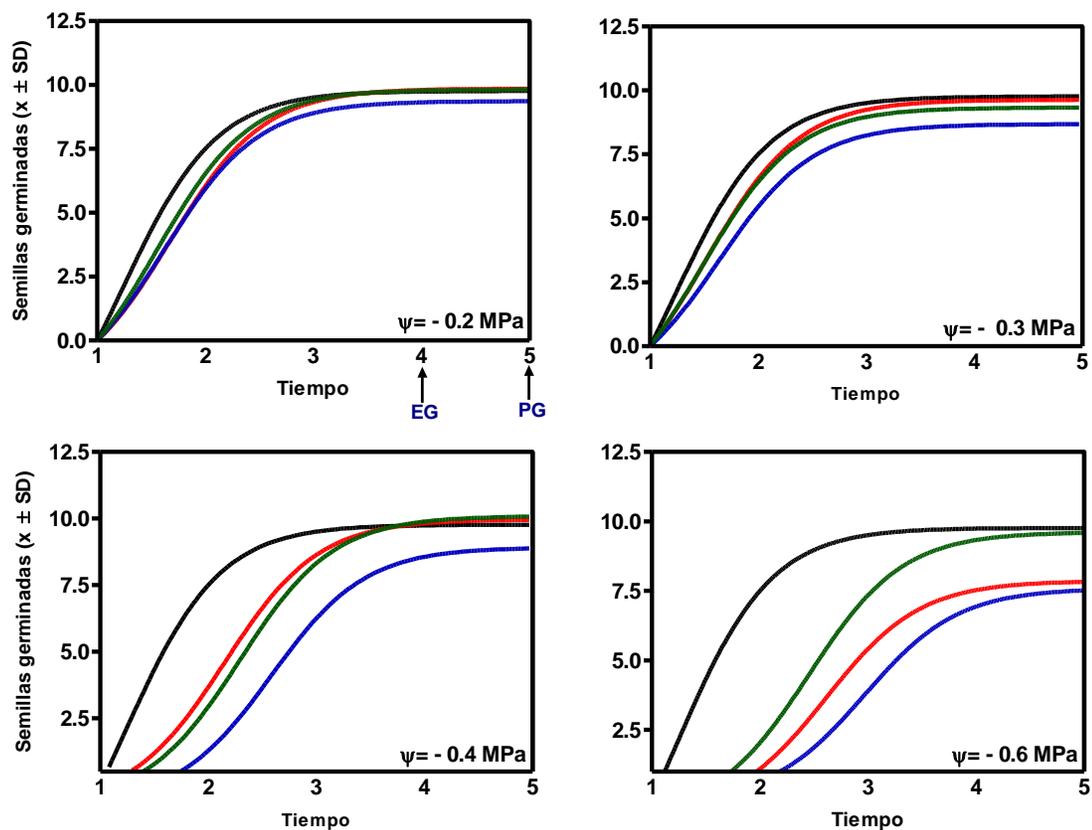


Figura 1. Comportamiento germinativo ajustado a un crecimiento exponencial ($r^2 > 0.95$) de semillas de maíz germinadas en placas de Petri impregnadas con volúmenes constantes de agua (negro), soluciones de

NaCl (rojo), Na₂SO₄ (azul) o la mezcla isosmótica de ambas sales (verde), como se describe en materiales y métodos.

Cuadro 2. Porcentaje (%) de semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense* Az39 germinadas en placas de Petri embebidas con volúmenes constantes de agua (control), soluciones de NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla isosmótica de ambas sales, en concentraciones crecientes de acuerdo al tratamiento, como se describió.

		C	MPa de NaCl				Mpa de Na ₂ SO ₄				Mpa de NaCl+ Na ₂ SO ₄			
Lectura	T	0	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6	-0,2	-0,3	-0,4	-0,6
1	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	48	75	45	25	20	5	30	35	20	0	50	45	20	10
3	72	95	85	60	80	60	90	70	80	45	90	90	85	80
4-EG	96	95	85	75	90	65	100	80	85	50	95	95	95	90
5-PG	168	95	100	85	95	85	100	85	100	90	95	95	100	100

C: Concentración osmótica de las soluciones expresadas como Mpa.

T: Tiempo de evaluación desde tiempo 0 (comienzo del ensayo).

Como se observa en el **Cuadro 2** y en la **Figura 2**, la mejor respuesta a nivel de la velocidad de germinación, se obtuvo en las semillas inoculadas con la cepa Az39 de *A. brasilense* del control (C). En tales condiciones, se comprobó el máximo valor de germinación, que se consiguió a las 96 hs de incubación y se mantuvo hasta la finalización del ensayo. En lo que se refiere a las soluciones salinas, podemos destacar que el tratamiento de semillas con cualquiera de las sales o su mezcla isosmótica, a potenciales osmóticos menores a -0.2 MPa determinaron una disminución significativa, tanto del porcentaje de semillas germinadas, como de la velocidad de germinación, comparados con el control no salinizado. A diferencia de lo observado en las semillas no inoculadas de la **Figura 1** y de las inoculadas con *A. brasilense* de la **Figura 2** que fueron tratadas con soluciones de P₀ de -0.3, -0.4 y -0.6 MPa, no evidenciamos un efecto deletéreo del Na₂SO₄ sobre el resto de los tratamientos, lo que determinaría que la incorporación del microorganismo a las semillas permitiría regular benéficamente el proceso de germinación en condiciones de salinidad por Na₂SO₄. Al respecto, ensayos realizados con semillas de lechuga inoculadas con bacterias del género *Azospirillum* demostraron que, tanto la (EG) energía germinativa como el (PG) poder germinativo fueron significativamente superiores a los controles sin inocular, tanto a 50 como 80 mM NaCl (Barassi *et al.*, 2006). Otros ensayos adicionalmente han probado la tolerancia de este género microbiano a concentraciones mayores a 200 mM de NaCl en medio químicamente definido (Fisher *et al.*, 2000) y quizás parte de la

respuesta reguladora observada, en primera instancia se deba a la capacidad del microorganismo de tolerar tales concentraciones de la sal. Por otro lado es necesario destacar que no existen referencia relacionadas con la supervivencia de la bacteria en soluciones de Na_2SO_4 en las que suponemos debería darse una respuesta similar a la observada en la sal de sodio. Por otro lado, parte de la regulación sobre el sistema vegetal, se debería a la adición conjunta del microorganismo y de compuestos reguladores del crecimiento vegetal, del tipo fitohormonas producidos por la bacteria durante su fermentación, que amortiguarían el estrés iónico ocasionado por el anión sulfato al embrión. En tal sentido, Perrig *et al.*, (2007) comprobaron la capacidad de la cepa Az 39 de *A. brasilense* para producir ácido giberelico (GA_3), abscísico (ABA), indol 3-acético (AIA), zeatina (Z) y etileno, así como ciertas poliaminas (PAs) en medio químicamente definido. Esta hipótesis supone la incorporación de estas moléculas a la semilla en el momento de la inoculación y en la actualidad se apoya sobre la consideración de que la mayoría de los inoculantes a base de esta bacteria del mercado nacional, además de aportar un número considerable de microorganismos viables, aportarían estas moléculas con un efecto a corto plazo sobre la semilla (Cassán *et al.*, 2008). Si bien existió una respuesta uniforme a los diferentes tratamientos de salinización, es necesario destacar que la respuesta fue disminuyendo en la medida que disminuía el potencial osmótico de la solución.

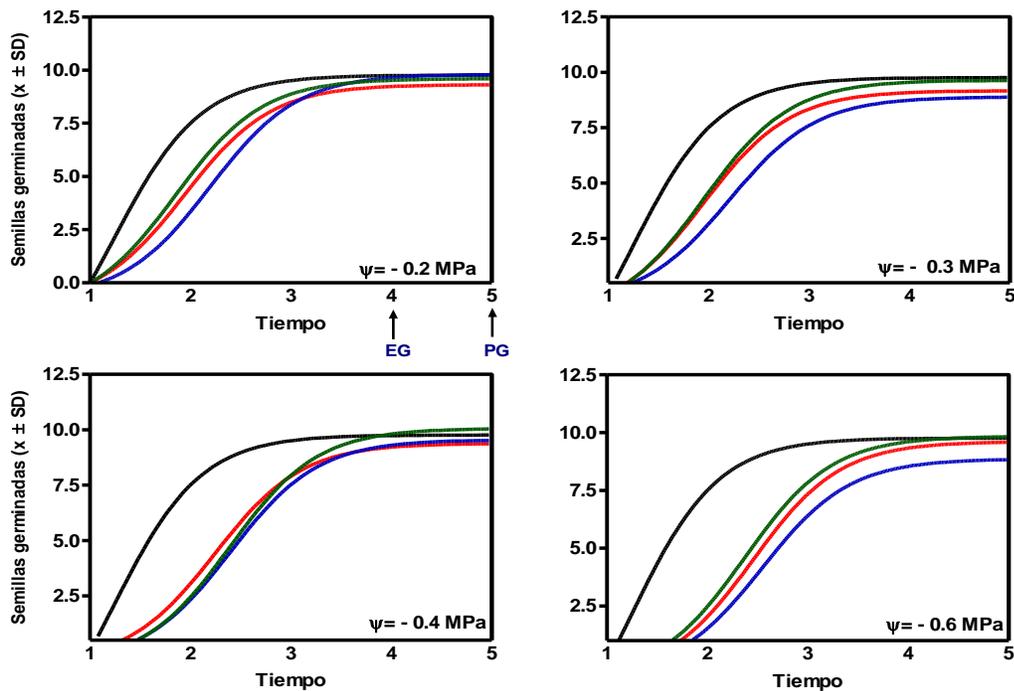


Figura 2. Comportamiento germinativo ajustado a un crecimiento exponencial ($r^2 > 0.95$) de semillas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 e impregnadas con volúmenes constantes de agua (negro), soluciones de NaCl (rojo); Na_2SO_4 (azul) o la mezcla isosmótica de ambas sales (verde).

Como podemos observar en la **Figura 3**, el efecto de la inoculación con *A. brasilense* en plántulas de maíz, determinó un aumento significativo del peso fresco de la parte aérea (PFA), con respecto al control sin inocular. Esta respuesta se debería, al menos en parte, a un mejor estado hídrico de las plántulas bacterizadas, determinado por la producción bacteriana de compuestos reguladores del crecimiento que le permitirían una mayor retención y absorción de agua y nutrientes desde la solución mineral, tal como ha sido propuesto para este microorganismo por Bashan *et al.* (2004). A nivel de raíces, en los tratamientos inoculados se observó un aumento significativo del peso fresco radical (PFR) producido por la bacterización. Similares resultados fueron obtenidos a nivel de plántulas por la inoculación de esta estirpe bacteriana en semillas de soja y maíz en sistemas de cultivo controlados (Cassán *et al.*, 2008).

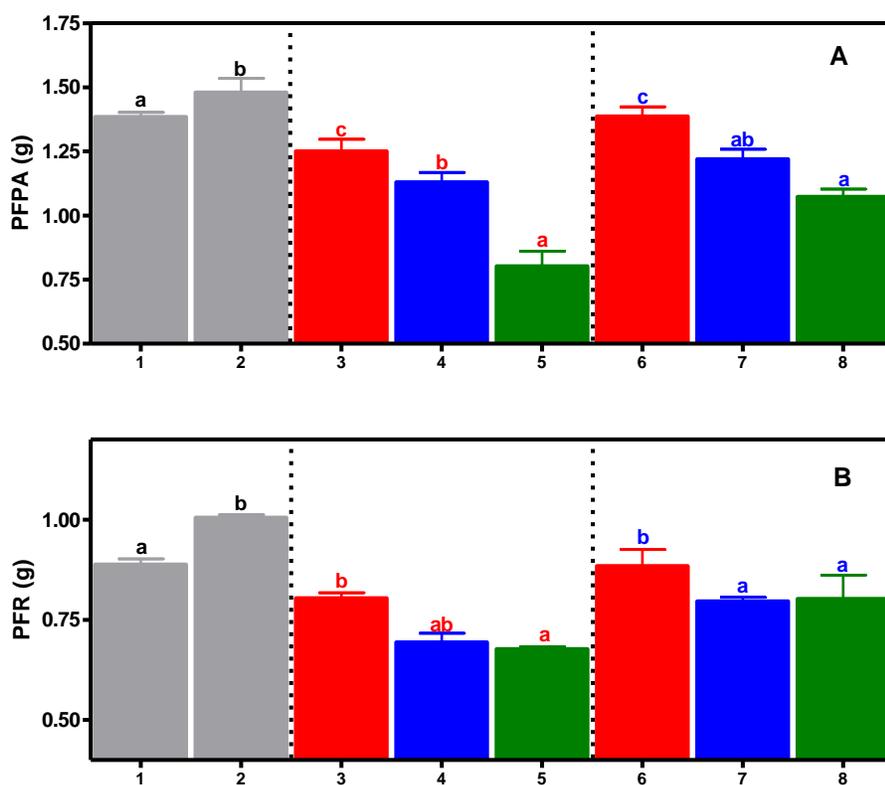


Figura 3. Peso fresco parte aérea (PFA) (A) y peso fresco radical (PFR) (B), de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y cultivadas en 100 mM de NaCl (barras rojas); una concentración equivalente de Na₂SO₄ (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en el punto (4.4) de materiales y métodos. (T=SD para p<0.05). (*) Letras diferentes dentro de cada bloque significa que existe diferencia significativa entre tratamientos.

Cuando las plántulas inoculadas se sometieron a salinidad mediada por NaCl, Na₂SO₄ o la mezcla de ambas, se observó una disminución significativa del peso fresco, tanto a nivel aéreo como radical en comparación con el control inoculado y no salinizado, pero estos resultados fueron mayores que los tratamientos en donde se utilizó salinización pero sin inocular. En tal sentido, el peso fresco aéreo y radical, así como el estado hídrico de ambas fracciones vegetales, fue mayormente afectado por la presencia de ambas sales en conjunto, luego por la sal de Na₂SO₄ y en menor efecto lo presentaron los tratamientos con NaCl; siendo que este último tratamiento arrojó un resultado similar al control sin inocular y salinizar, ya sea en la parte aérea como radical. De acuerdo con Shannon y Grieve. (1999), este efecto se debería, al menos en parte al componente osmótico de las diferentes sales adicionadas al medio de cultivo que sería el responsable de reducir la tasa de crecimiento, principalmente en los estadios de germinación y crecimiento temprano. 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).

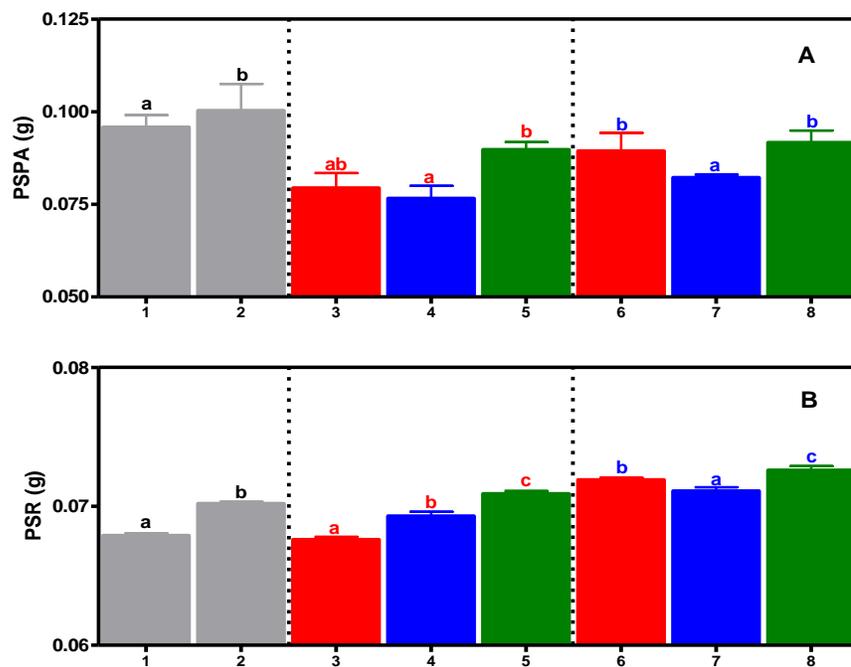


Figura 4. Peso seco parte aérea (PSPA) (A) y peso seco radical (PSR) (B), de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y cultivadas en 100 mM de NaCl (barras rojas);

una concentración equivalente de Na_2SO_4 (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en el punto (4.4) de materiales y métodos. (T=SD para $p < 0.05$). (*) Letras diferentes dentro de cada bloque significa que existe diferencia significativa entre tratamientos.

En lo que se refiere al peso seco (PS), la **Figura 4**, muestra que existió una respuesta diferencial entre el peso seco de la parte aérea (PSPA) y el peso seco radical (PSR) de las plántulas. A nivel del PSPA, podemos mencionar que en todos los tratamientos salinizados, las plántulas tuvieron una respuesta de producción de biomasa menor que los controles sin salinizar. Tanto el NaCl, como el Na_2SO_4 determinaron una inhibición del crecimiento, que fue revertida parcialmente revertida por el tratamiento combinado de ambas sales. En el caso de la inoculación con *Azospirillum* sp., podemos mencionar que la colonización de las plántulas con el microorganismo determinó una reversión del efecto inhibitorio generado por el NaCl y que esta respuesta no se comprobó para las plántulas tratadas con Na_2SO_4 . En el caso del tratamiento con ambas sales se determinó una respuesta similar al tratamiento sin salinizar, por lo que se puede presumir que no existió un efecto aditivo entre la mezcla de sales y la inoculación. A nivel del PSR, podemos mencionar que la inoculación con *Azospirillum* sp. determinó un aumento de la producción de biomasa, comparado con el control sin inocular. En el caso de los tratamientos salinizados no inoculados, la adición de NaCl determinó una respuesta similar al control; mientras que la adición de Na_2SO_4 provocó un aumento de la producción de biomasa radical, que fue máximo cuando se adicionaron ambas sales de manera combinada. En este caso particular, la respuesta se comparó al tratamiento control inoculado, en el que se determinó la promoción del crecimiento radical. En todos los casos de inoculación y salinización se determinó una respuesta superior al control y para la que no se comprobó una diferencia significativa entre cada tratamiento. Esto permitiría considerar el hecho de que el proceso de colonización efectiva de las plántulas incrementa la producción de biomasa, fundamentalmente radical, aún en condiciones de estrés salino generado por NaCl o Na_2SO_4 . Similares resultados fueron previamente informados para maíz por Casanovas *et al.*, (2002), donde la inoculación con *Azospirillum* Sp245 aliviaba los efectos del estrés generado por el tratamiento con NaCl. Desde el punto de vista fisiológico, el mecanismo más importante para determinar un aumento efectivo en la producción de biomasa de las plántulas inoculadas, se debería a la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia (Baldani *et al.*, 1983); sin embargo, en este trabajo, la inoculación y la evaluación de la respuesta de crecimiento de la planta se realizó en un tiempo corto que no sería suficiente para permitir la completa colonización de la bacteria en los tejidos de la planta y la consecuente puesta en marcha del proceso de fijación, en

magnitud suficiente para determinar un cambio significativo en la respuesta de crecimiento de la planta. El patrón de crecimiento obtenido, permitiría especular sobre la actividad de un segundo mecanismo de promoción, de acción casi inmediata y que fue propuesto por Tien *et al.* (1979), como alternativo a la FBN. En tal sentido, la producción de fitohormonas, como AIA, GAs, citocininas, fue previamente evaluada en Az39 de *A. brasilense* por Perrig *et al.* (2007) y su corroborado su efecto en los primeros estadios de crecimiento de plantas inoculadas de maíz y soja por Cassán *et al.* (2008). Este nuevo modelo de interacción, además permitiría explicar el hecho de que el blanco primario de la inoculación en los primeros estadios de crecimiento de la planta es la raíz, mientras que la producción de biomasa aérea generalmente se ve incrementada al final del ciclo de cultivo. Así la hipótesis aditiva propuesta por Bashan *et al.* (1997) sería cierta para momentos diferentes del desarrollo de la planta.

6.3. Ensayo de crecimiento temprano en invernáculo

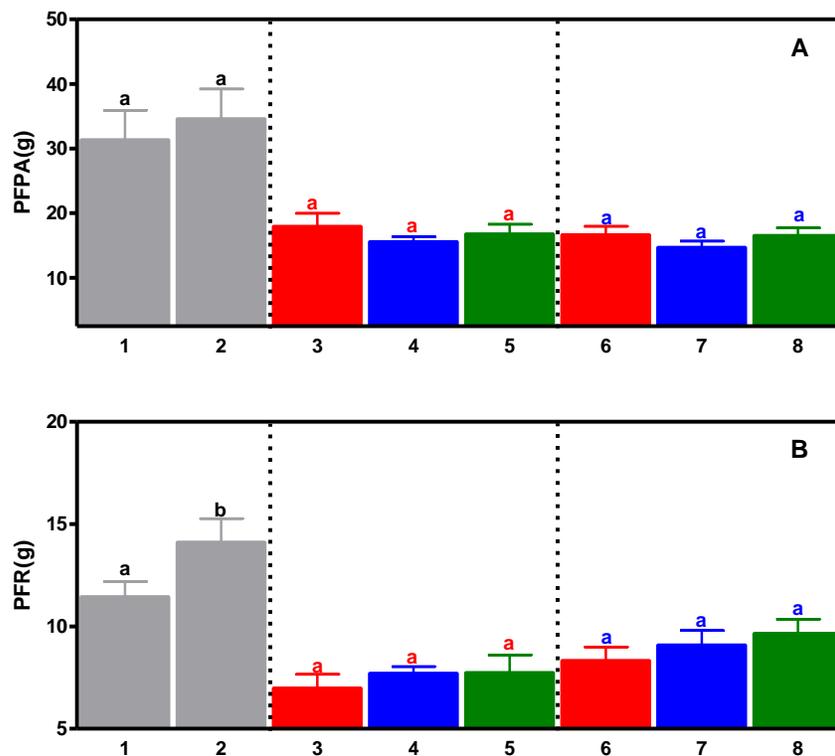


Figura 5. Peso fresco parte aérea (PFPA) (A) y peso fresco radical (PFR) (B), de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y cultivadas en 150 mM de NaCl (barras rojas); una concentración equivalente de Na₂SO₄ (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en el punto (4.4) de materiales y métodos. (T=SD para p<0.05). (*) Letras diferentes dentro de cada bloque significa que existe diferencia significativa entre tratamientos.

En la **Figura 5** se observa que los tratamientos control inoculado y no inoculado, tanto a nivel radical como aéreo, presentaron un estado hídrico (expresado como PSR y PSPA) superior al de los tratamientos salinizados. Solo a nivel radical (PSR) se comprobó una diferencia significativa entre controles, debida a la inoculación con *Azospirillum* sp. En el caso de los tratamientos salinizados, la respuesta de menor crecimiento aéreo y radical no tuvo una discriminación por el tipo de sal adicionada, por lo que se podría suponer que el efecto sería exclusivamente osmótico y no dependiente de alguna de las sales adicionadas. Según Shannon y Grieve (1999), tal condición se debería, al menos en parte, a la disminución de la disponibilidad de agua en el sustrato mediada por el componente osmótico de cada sal con la consecuente disminución de la capacidad de realizar trabajo en la solución acuosa. Si comparamos el efecto de la salinización en aquellas semillas que fueron inoculadas con *Azospirillum* sp., podemos observar que no se presentaron diferencias significativas en la fracción vegetal aérea (PFPA) y radical (PSR); sin embargo la respuesta de crecimiento tuvo una tendencia de crecimiento debida a la inoculación, con incrementos del 20 % para el NaCl, 17 % para el Na₂SO₄ y 26 % para la mezcla isosmótica de ambas sales.

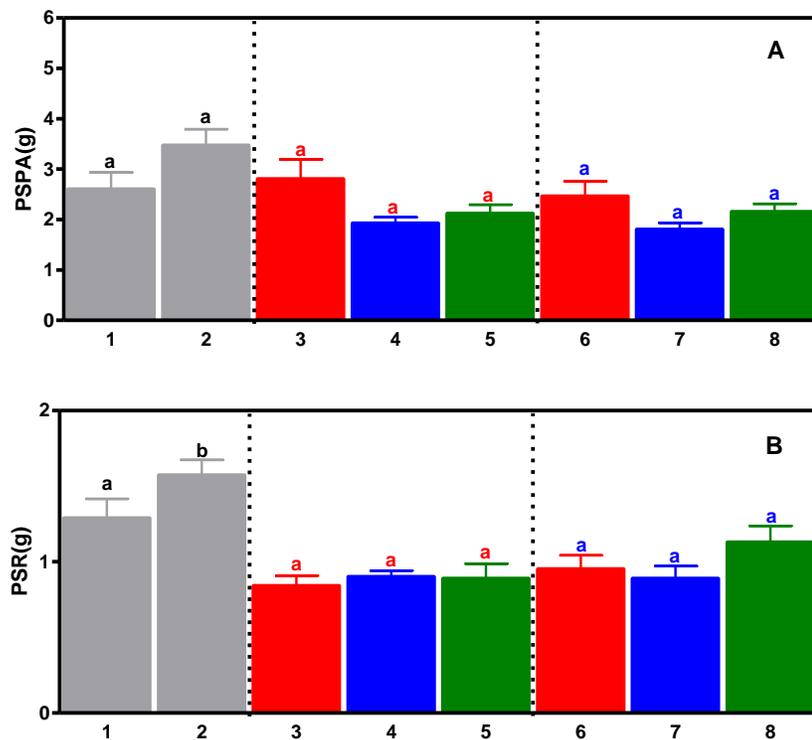


Figura 6. Peso seco parte aérea (PFPA) (A) y peso seco radical (PFR) (B), de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y cultivadas en 150 mM de NaCl (barras rojas);

una concentración equivalente de Na_2SO_4 (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El orden de los tratamientos de la figura, se detalla en el punto (4.4) de Materiales y métodos. (T=SD para $p < 0.05$). (*) Letras diferentes dentro de cada bloque significa que existe diferencia significativa entre tratamientos.

En lo que se refiere al peso seco (PS), la **Figura 6**, muestra que existió una respuesta diferencial entre el peso seco de la parte aérea (PSPA) y el peso seco radical (PSR) de las plántulas inoculadas y no salinizadas. A nivel del PSPA, podemos mencionar que en todos los tratamientos salinizados y no salinizados, las plántulas tuvieron una respuesta de producción de biomasa mayor cuando fueron expuestas a NaCl, en comparación a aquellas expuestas a Na_2SO_4 y a la combinatoria de ambas sales. No se determinaron respuestas significativas sobre la producción de biomasa aérea entre tratamientos inoculados y no inoculados. A nivel del PSR, podemos mencionar que la inoculación con *Azospirillum* sp. determinó un aumento de la producción de biomasa, solo en el caso del tratamiento de las semillas con la mezcla isosmótica de sales.

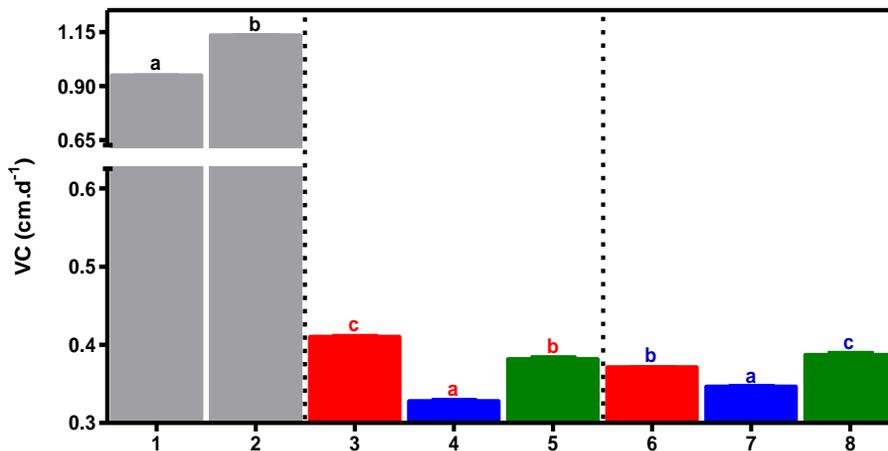


Figura 7. Velocidad de crecimiento obtenida de la curva sigmoide (cm.d^{-1}) de plántulas de maíz no inoculadas, inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 (barras grises) y cultivadas en 150 mM de NaCl (barras rojas); una concentración equivalente de Na_2SO_4 (barras azules) o la mezcla isosmótica de ambas sales (barras verdes). El parámetro fue obtenido de una regresión lineal de la fase de crecimiento constante de las curvas desarrolladas para cada tratamiento, en base a la longitud total de la parte aérea, utilizando el software PRISM® y considerando (T=SD para $p < 0.05$ y $r^2 > 0.95$). (*) Letras diferentes dentro de cada bloque significa que existe diferencia significativa entre tratamientos.

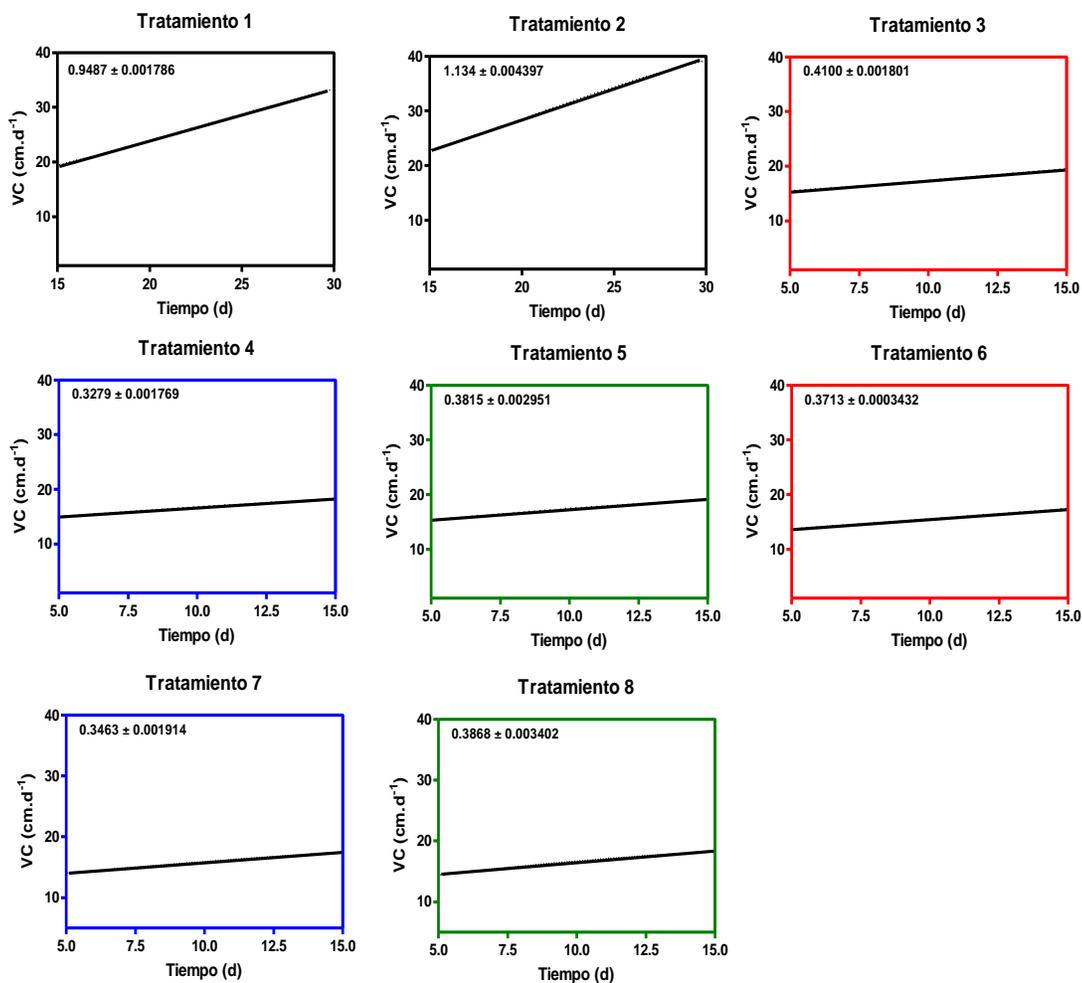


Figura 8. Velocidad de crecimiento expresada como cm.d^{-1} de plántulas de maíz no inoculadas (recuadro 1); inoculadas con *Azospirillum brasilense* Az39 y cultivadas en 150 mM de NaCl; una concentración equivalente de Na_2SO_4 o la mezcla isosmótica de ambas sales, utilizando el software PRISM® y considerando ($T=SD$ para $p<0.05$ y $r^2>0.95$).

Como podemos observar en las **Figuras 7 y 8**, en condiciones de estrés salino disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento (cm.d^{-1}), en comparación con los controles no salinizados y además, el control inoculado presentó una mayor velocidad de crecimiento en comparación al control sin inocular. A pesar de que la salinización determinó una menor velocidad de crecimiento, las sales presentaron un comportamiento diferencial entre sí y no existieron diferencias en este parámetro, por la presencia del microorganismo. Así, podemos

observar que el tratamiento de las semillas con Na_2SO_4 tuvo un efecto más deletéreo que el NaCl y que esta condición fue parcialmente revertida por la adición de ambas sales en una mezcla isosmótica. Tal como hemos comprobado en los diferentes ensayos desarrollados en este trabajo, como en los obtenidos particularmente en este ensayo en condiciones de invernáculo, podríamos inferir que la presencia de *Azospirillum* sp. en condiciones de salinidad, no aumentaría la velocidad de crecimiento de las plantas inoculadas y que su capacidad de promover el crecimiento en tales condiciones, estaría puntualizada a generar un mejor estado de la homeostasis general de la planta en condiciones de estrés abiótico. Solo desde el punto de vista del crecimiento radical, se pudo comprobar la capacidad de la planta de aumentar tanto el estado hídrico, como la producción de biomasa y ello estaría relacionado no con una respuesta directa sobre el crecimiento, sino como una estrategia dirigida a incrementar la captación de agua y nutrientes de la planta para mantener su homeostasis en condiciones de estrés abiótico. Estos resultados abonarían la hipótesis de que *Azospirillum* sp. podría mejorar la respuesta vegetal a determinados tipos de estrés abióticos, por lo que podría ser incluido en el grupo de las rizobacterias PHRR del inglés Plant Homeostasis Regulator Rhizobacteria (Cassán et al. 2008b).

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 un estrés salino.

A nivel de la germinación podemos mencionar que las semillas salinizadas con Na_2SO_4 mostraron una respuesta inferior, tanto a nivel de la velocidad como del porcentaje de germinación y que tal efecto fue solo igualado en las semillas tratadas con NaCl , en tratamientos de menor potencial osmótico. En todos los casos, el tratamiento de las semillas con la solución bisalina determinó una respuesta superior a cualquiera de las sales adicionadas de manera individual. Desde el punto de vista de la inoculación con *Azospirillum* sp. podemos decir que la presencia de la bacteria permitió regular el proceso de germinación, aún en condiciones de salinidad generadas por Na_2SO_4 .

A nivel del crecimiento temprano, podemos mencionar que la inoculación con *Azospirillum brasilense* en plántulas de maíz, determinó un aumento significativo del peso fresco de la parte aérea (PFA) y radical (PFR), con respecto a los controles sin inocular y cuando las plántulas inoculadas se sometieron a salinidad mediada por NaCl , Na_2SO_4 o la mezcla

de ambas, se observó una reversión parcial de la inhibición generada por las sales, en plantas no inoculadas.

A nivel del crecimiento tardío en condiciones de invernáculo, podemos decir que el mismo no presentó los resultados esperados y en tal sentido queremos remarcar que si bien comprobó un efecto benéfico de la inoculación en condiciones óptimas y una tendencia a nivel del crecimiento radical, en condiciones de salinización, esto no permitió correlacionar los resultados obtenidos a nivel de la germinación y del crecimiento temprano para la misma especie vegetal y con el mismo microorganismo. En tal sentido, consideramos que una fuente importante de variabilidad se puntualizó en el uso de dos formulaciones comerciales diferentes, debido a la imposibilidad de contar con la misma formulación durante el desarrollo completo del trabajo. Una de las formulaciones denominada BONUS® se utilizó tanto en ensayos de germinación como en cámara de cultivo, con un recuento de $5E+08$ UFC.ml⁻¹ y una dosis de aplicación de marbete de 10 ml.kg⁻¹ de semillas y en estos ensayos se comprobó un efecto favorable del microorganismo, tanto en condiciones óptimas, como de salinidad. Por otro lado, en condiciones de invernáculo, se utilizó un producto con un recuento de $1E+09$ UFC.ml⁻¹ y una dosis de aplicación de marbete de 0,2 ml.kg⁻¹ de semillas y en este caso particular no se comprobó la diferencia antes mencionada. La falta de respuesta se debería simplemente a la cantidad de bacterias aportadas en las semillas por cada inoculante. Para el caso de BONUS® se determinó un aporte teórico de 800.000; mientras que en el segundo caso, el aporte teórico fue de 32.000 UFC.semilla⁻¹.

Los resultados obtenidos por nuestros experimentos indicarían que:

1-La salinización de plántulas o semillas de maíz (*Zea mays* L.) con soluciones osmóticamente comparables de NaCl o Na₂SO₄ afecta considerablemente su germinación; el crecimiento y desarrollo temprano, así como el crecimiento en estadios fenológicos posteriores. En el caso de la germinación, tal efecto se correlacionó además con un aumento de la concentración de cada sal en el medio de cultivo. La salinización con Na₂SO₄ tuvo un efecto de mayor toxicidad a nivel de la velocidad de germinación y el número de plantas germinadas que en el caso del NaCl, que solo tuvo un efecto significativo en las soluciones de menor potencial osmótico. Por contrapartida, la salinización con la mezcla isosmótica de NaCl y Na₂SO₄, revertió el efecto individual de cada sal.

2- La inoculación de maíz (*Zea mays* L.) con *Azospirillum brasilense* Az39 modificó significativamente la respuesta fisiológica de la semilla y de la planta a la salinización y revirtió

parcialmente la condición de estrés impuesta. A nivel de la germinación, la incorporación de la bacteria mitigó el efecto de mayor toxicidad ocasionado por el Na₂SO₄ o NaCl (a mayores concentraciones) y las semillas presentaron una respuesta más uniforme.

3-Estos resultados demostrarían que *Azospirillum* sp. podría mejorar la respuesta vegetal a determinados tipos de estrés abióticos, por lo que estos microorganismos podrían ser considerados en el grupo de rizobacterias PHRR, del inglés Plant Homeostasis Regulator Rhizobacteria.

8. Bibliografía:

1. ALVAREZ, M., R. SUELDO y C. BARASSI. 1996 Effect of *Azospirillum* on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. **Cereal Research Communications**, 24:101-107.
2. ASHRAF, M. 1993 Effect of sodium chloride on water relations and some organic osmotica in arid zone plant species *Melilotus indica* (L.) **All. Tropenlandwirt**, 94: 95-102.
3. BALDANI, V., J. BALDANI, y J. DÖBEREINER. 1983 Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Can. J. Microbiol.** 29: 924-929.
4. BALDANI, V.; J. BALDANI, y J. DÖBEREINER. 1987 Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum spp.* 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 Horticulturae**, 109: 8-14.
6. BASHAN, Y. y G. HOLGUIN. 1997 *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Can. J. Microbiol.** 43:103-121.
7. BASHAN, Y., G. HOLGUIN, y L. BASHAN. 2004 *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Can. J. Microbiology** 50: 521-577.
8. CASANOVAS E., C. BARASSI, F. ANDRADE, y R. SUELDO. 2003 *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. **Cereal Research Communications** 31:395-402.
9. CASANOVAS E., C. BARASSI, y R. SUELDO. 2002 *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. **Cereal Research Communications**, 30: 343-350.

10. CASSÁN, F., P. PICCOLI, y R. BOTTINI. 2003 Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. through gibberellin production. An alternative model to increase crop yield? En: Albanesi A. (Ed). **Microbiología Agrícola**. pp: 143-158. ISBN: 987-99083-5-1. Ed. UNSE.
11. CASSÁN, 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**. 45:28-35.
12. CASSÁN F., S. MAIALE, O. MASCIARELLI, A. VIDAL, V. LUNA, y O.RUIZ. 2008 b. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**.45: 12-19.
13. CREUS, C., R. SUELDO, y C. BARASSI. 2004 Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Can J. Botany** 82:273-281.
14. CREUS, C., R. SUELDO, y C. BARASSI. 1998 Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. **Can J. Botany** 76: 238-244.
15. SHIA, D. y Y. 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.
16. EGAN, T. y I. UNGAR 1998 Effect of different salts of sodium and potassium on the growth of *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae). **Journal of Plant Nutrition** 21(10): 2193-2205.
17. El cultivo de maíz: www.inta.gov.ar/actual/noticias.html. Consultado: 12-07-2007.
18. El cultivo de maíz en nuestro país: www.sagpya.mecon.gov.ar. Consultado: 12-07-2007.
19. FISCHER, R. y N. TURNER. 1978 Plant productivity in the arid and semiarid zones. **Annual Review of Plant Physiology**, 29: 277-317.
20. FISCHER, S., V. RIVAROLA, y G. MORI. 2000 Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. **Plant and Soil** 225: 187–191.
21. GADALLAH M.1996 Abscisic acid, temperature and salinity interactions on growth and some mineral elements in *Carthamus* plants. **Plant Growth Regulator** 20:225-236.
22. GRATTAN, S. y C. GRIEVE. 1999 Mineral Nutrients Acquisition and Response by plantas Grown in Saline Environments. En: **Handbook of Plant and Crop Stress**. Ed. Mohammad Pessarakli. New York. Cap 9: 203-229.
23. HOAGLAND, D. y D. ARNON. 1950 The water-culture method for growing plants withoutsoil. **California Agricultural Experiment Station Circular** 347:1-32.
24. HOLMBERG, N., y L. BÜLOW. 1998 Improving stress tolerance in plants by gene transfer.

- Trends in Plant Science.** 3(2): 61-66.
25. INTERNATIONAL SEED TEST ASSOCIATION. 2007 International Rules for Seed Testing. ISTA Editorial. USA.
 26. LONE M. 1988. **Managing Soil Resources: Proceedings of First National Congress of Soil Science.** Pakistan. India.
 27. LONGSTRETH, D., y P. NOBEL. 1979 Salinity effects on leaf anatomy. Consequences for photosynthesis. **Plant Physiology**, 63: 700-703.
 28. OKON, Y. 1985 *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends Biotechnol.** 3: 223-228.
 29. OKON, Y., y C. LABANDERA-GONZÁLEZ. 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil. Biol. Biochem.** 26: 1591-1601.
 30. Origen del maíz (www.monografias.com/trabajos/elmaiz.html). Consultado: 12-09-2007.
 31. PATTEN, C., y B. GLICK. 1996 Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. **Can. J. Microbiology** 42: 207-220.
 32. PERRIG, D., L. BOIERO, O. MASCIARELLI, C. PENNA, R. RUÍZ, F. CASSÁN, y V. LUNA. 2007 Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 75: 1143-1150.
 33. PERRIG, D., O. MASCIARELLI, A. PERTICARI, F. CASSÁN y V. LUNA. 2005 Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasilense* az39, la cepa más 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.
 34. QUETGLAS, R., L. BRICHI, D. PERRIG, V. SGROY, O. MASCIARELLI, F. CASSÁN, y V. LUNA. 2008. La inoculación de soja con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum* sp. modifica su respuesta a la salinidad por NaCl Y Na₂SO₄. **XXVII Reunión Argentina. XIII Reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal.** Rosario. Argentina. pp 117.
 35. RAMADÚ, M., L. LÉPORE, F. CASSÁN y V. LUNA. 2007. Respuesta de la soja (*Glycine max* L.) a salinidad por NaCl y Na₂SO₄, mediada por la co-inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento o la aplicación exógena de ácido abscísico. **VI REBIOS-2007.** CD-ROM; ISBN: 978-950-665-438-2. Río Cuarto. Argentina.

36. REIMANN, C., y S. BRECKLE. 1995 Salt tolerance and ion relations of *Salsola kali* L.: differences between ssp. *tragus* (L.) Nyman and ssp. *ruthenica* (Iljin) Soo. **The New Phytologist**, 130: 37-45.
37. RHODES, D., y A. HANSON. 1993 **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 44: 257-384.
38. RITCHIE, S., y J. HANDWAY. 1982 **How a corn plant develops**. Iowa state University of Science and Technology, Ames, Iowa.
39. SHANNON, M., y C. GRIEVE. 1999 Effect of salinity and oxygen level on lettuce grown in a floating system. **Scientia Horticulturae** 78: 5-38.
40. SHANNON, M. 1997 Adaptation of plants to salinity. **Adv. Agron.** 60, 75-120.
41. SHI D. y Y. SHENG B. 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.
42. SOMASEGARAN, P., y H. HOBEN 1994 **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer Verlag. New York.
43. SOSA L., A.LLANES, M.REGINATO, H.REINOSO y V.LUNA 2005 Osmotic and Specific Ion Effects on the Germination of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. **Annals of Botany** 96 (2): 261-297.
44. TIEN, T., M. GASKIN, y D. HUBBELL. 1979 Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. **Appl. Environ. Microbiol.** 37: 1016-1024.
45. WARNE, P., R. GUY, L. ROLLINS, y D. REID. 1990 The effects of sodium sulphate and sodium chloride on growth, morphology, photosynthesis, and water use efficiency of *Chenopodium rubrum*. **Canadian Journal of Botany**. 68: 999-1006.