

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar
al Grado de Ingeniero Agrónomo

Modalidad: Proyecto

**Evaluación de la aplicación individual o combinada de rizobacterias
promotoras del crecimiento y fitohormonas sobre la germinación y
crecimiento temprano de semillas de maíz**

Alumna: **Carolina Andrea Moyano**

DNI: **32542552**

Director: **Dr. Fabricio Cassán**

Río Cuarto- Provincia de Córdoba

Año 2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARI
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del trabajo final: Evaluación de la aplicación individual o combinada de rizobacterias promotoras del crecimiento y fitohormonas sobre la germinación y crecimiento temprano de semillas de maíz

Autor: MOYANO, CAROLINA ANDREA
DNI: 32.542.552

Director: CASSÁN, FABRICIO

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:

Ing. Agr. Espósito, Gabriel

Ing. Agr. Oddino, Claudio

Fecha de Presentación: / / .

Secretario Académico

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

Este trabajo va dedicado y un modo de agradecimiento a todas las personas que me acompañaron y siguen presentes en cada una de las etapas de mi vida.

A mis padres, Rosana y Oscar por estar siempre apoyándome en cada una de mis decisiones y siendo conscientes siempre de desear lo mejor para mi. Les agradezco por darme la oportunidad de acceder a un título universitario pensando en mi y en un futuro mejor, por esforzarse cada día para que nunca me falte nada, por ser mi fuente de inspiración.

A mis hermanos Esteban y Cecilia y al resto de mi familia (tíos, primos, abuelos) que están siempre presentes.

A mis amigos/as del alma y de la vida que estuvieron y están siempre brindándome un amor puro, acompañándome, dándome fuerzas, y voluntad de crecer.

A mi pareja y su familia, por estar acompañándome en cada uno de mis decisiones, sintiendo siempre su apoyo y amor incondicional.

A los compañeros en general que aportaron en mi crecimiento y en mi desarrollo tanto profesional y como persona.

A la profesora de estadística, Elsa Moschetti, por la colaboración que realizó durante la escritura de este trabajo final.

También agradezco la ayuda que me ofrecieron para la realización de este trabajo a todos los integrantes de la cátedra, especialmente a Fabricio Cassán cuyo aporte fue más allá el de un director convirtiéndose en un maestro, me enseñó, guió y me aportó todas las herramientas necesarias para realizar este trabajo y a Romina Molina por estar y sentir su apoyo en todo este transcurso.

A mi jurados, por su colaboración y dedicación en todo momento.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y precisamente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por formarme como profesional y permitirme ver al mundo de otro modo.

A toda la gente que colaboró conmigo en este trabajo que realmente fueron muchas personas que aportaron siempre un aprendizaje en mi vida.

Como cierre le dedico y le agradezco a Dios por brindarme la fuerza y esperanza para superar las dificultades y permitirme alcanzar este ansiado logro.

Gracias a todos de corazón por ser parte de mi vida y sentir que cada Ser que se cruzó en mi camino, fueron mis grandes maestros y aportaron un gran crecimiento tanto como persona y profesional. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	XIII
SUMMARY	XIV
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1.Características de la especie en estudio	1
1.2.Características morfo-fisiológicas y características generales del grano	2
1.3.Germinación	3
1.4.Crecimiento temprano	4
1.5.Calidad de semillas	5
1.6.Calidad de semillas y su importancia en el cultivo de maíz	6
1.7.Rizobacterias promotoras del crecimiento	7
1.8.Formulación de inoculantes en la República Argentina	9
1.9.Importancia económica del uso de biofertilizantes en Argentina	10
1.10.Hormonas vegetales	10
1.10.1.Auxinas	11
1.10.2.Giberelinas	12
1.10.3.Citocininas	13
2.HIPÓTESIS	15
3.OBJETIVOS	
3.1.Objetivo general	15
3.2.Objetivos específicos	15
4.MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1.Material vegetal	16
4.2.Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Az39)	16
4.3.Fitohormonas	16
4.4.Ensayo de germinación	17
4.5.Ensayo de crecimiento temprano	18
4.6.Diseño experimental	19
4.7.Análisis de datos	20

5.RESULTADOS	21
5.1.Ensayo de germinación	21
5.1.1.Energía y Poder germinativo	21
5.1.2.Longitud del coleoptile	24
5.1.3.Longitud de la radícula	27
5.1.4.Longitud total	31
5.2. Ensayo de crecimiento temprano	35
5.2.1.N° de plántulas emergidas y n° de hojas	35
5.2.2.Longitud aérea	38
5.2.3.Longitud radical	42
5.2.4. Longitud total	44
6.DISCUSIÓN	54
7.CONCLUSIÓN	62
8.BIBLIOGRAFÍA	63
9.ANEXOS	73

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado de la semilla y plántula de maíz, con sus partes. 3
- Figura 2.** Actividad hormonal y enzimática en grano de monocotiledonia durante la germinación. 4
- Figura 3.** Bandeja del tratamiento control correspondiente a semillas de maíz sin inocular, ni tratar con fitohormonas a los 4 días desde la siembra (izq.). Semillas emergidas de maíz con sus partes (derecha). 18
- Figura 4.** Ensayo de crecimiento temprano en maíz dentro de la cámara de cultivo vegetal a los 5 días de colocados dentro de la misma. 19
- Figura 5.** Evaluación del Poder Germinativo (PG) y Energía Germinativa (EG) en semillas de maíz embebidas con agua pura (A) o inoculadas con *Azospirillum* sp. (I) y tratadas de manera exógena con fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 4 y 7 días de crecimiento. 22
- Figura 6.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para el Poder Germinativo (%) en semillas de maíz luego de 7 días de germinadas. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua. 23
- Figura 7.** Evaluación de la Longitud del coleoptile de semillas de maíz embebidas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. 24
- Figura 8.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud del coleoptile (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua. 25
- Figura 9.** Longitud de la radícula (cm) en semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense* Az39 (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. 28

- Figura 10.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud radical (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Los puntos de color indican la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua. **29**
- Figura 11.** Evaluación de la Longitud total (cm) en semillas de maíz embebidas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. **31**
- Figura 12.** Evaluación de la Longitud (cm) del coleoptile y de la parte radical en semillas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3) luego de 7 días de crecimiento. **32**
- Figura 13.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud total (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua. **33**
- Figura 14.** Número de plántulas de maíz emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 y 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. **35**
- Figura 15.** Número de hojas por plántula de maíz inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 y 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. **36**
- Figura 16.** Plántulas de maíz emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. **37**
- Figura 17.** Plántulas de maíz emergidas no inoculadas (arriba) e inoculadas (abajo) y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. **37**

- Figura 18.** Evaluación de la longitud aérea de plántulas de maíz tratadas con agua (A) 38
o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con
soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de
crecimiento.
- Figura 19.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable 39
longitud aérea (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos
indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1:
auxinas, H2: giberelinas, H3:citocininas; I: inoculado; A: agua.
- Figura 20.** Evaluación de la Longitud radical de plántulas de maíz tratadas con agua 42
(A) o inoculadas (I) con *Azospirillum* AZ39 y tratadas de manera exógena e individual
con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días
de crecimiento.
- Figura 21.** Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable 43
longitud radical (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos
indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1:
auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua.
- Figura 22.** Longitud radical de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas 44
(I). con *Azospirillum* Az39, luego de 14 días de crecimiento.
- Figura 23.** Evaluación de la longitud total de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o 45
inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con
soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de
crecimiento
- Figura 24.** Longitud total (gr) de la parte aérea y radical en plántulas de maíz tratadas 46
con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e
individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3).
- Figura 25.** Plántulas de maíz emergidas no inoculadas y tratadas con diferentes 47
soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Arriba: todas las plantas del
tratamiento. Abajo: plantas individuales. Referencias: H0: sin el agregado de hormona,
H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; A: agua.
- Figura 26.** Plántulas de maíz emergidas inoculadas y tratadas con diferentes 48
soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Arriba: todas las plantas del
tratamiento. Abajo: plantas individuales. Referencias: H0: sin el agregado de hormona,

H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; A: agua.

Figura 27. Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud total (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua. 49

Figura 28. Resumen de la respuesta de semillas de maíz a la inoculación con *A. brasilense* Az39 (arriba); el tratamiento con fitohormonas (medio) y el tratamiento combinado (abajo) a nivel de la germinación y el crecimiento temprano. 53

Figura 29. Efecto de la morfología radicular en semillas de trigo con adición exógena de auxinas. A la izquierda represente el control sin inocular. Las otras raíces, las semillas fueron tratadas de izquierda a derecha con 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M de AIA. 57

Figura 30. A. Efecto de la longitud y desarrollo radicular en semillas de trigo inoculadas con *A. brasilense* a los 7 días. A la izquierda represente el control sin inocular. Las otras raíces, las semillas fueron inoculadas 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 UFC/mL, de izquierda a derecha. B. Efecto de las semillas inoculadas con formación de pelos radicales y variación del diámetro de la raíz. A la izq. representa el control sin inocular y el resto con 5×10^7 y 5×10^8 ufc/mL respectivamente. 58

Figura 31 Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud coleoptile (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. 73

Figura 32 Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud de la radícula (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. 74

Figura 33 Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud total (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. 75

Figura 34 Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud aérea (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e 76

individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento.

Figura 35 Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud radical (cm) en 77 semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medidas resumen de la variable Energía y Poder Germinativo (EG-PG), en semillas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) a los 4 días y 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	78
Tabla 2. Medidas Resumen de la variable longitud del coleoptile (cm) en semillas demaíz (<i>Zea mays L.</i>) a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	80
Tabla 3. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis para semillas sin inocular, para la variable longitud del coleoptile.	26
Tabla 4. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis para semillas inoculadas, para la variable longitud del coleoptile.	27
Tabla 5. Medidas de resumen de la variable longitud radical (cm) en semillas de maíz a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	82
Tabla 6. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis, para semillas sin inocular, para la variable longitud radical.	30
Tabla 7. Medidas de resumen de la variable longitud total (cm) en semillas de maíz (<i>Zea mays L.</i>) a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	84
Tabla 8. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis, para semillas sin inocular, para la variable longitud total.	34
Tabla 9. Medidas de resumen de la variable N° de plántulas emergidas en semillas de maíz a los 7 y 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	86
Tabla 10. Medidas de resumen de la variable N° de hojas/plántula en plántulas de maíz a los 7 y 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	87
Tabla 11. Medidas de resumen de la variable longitud aérea (cm) en plántulas de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.	88
Tabla 12. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis, para plántulas sin inocular, para la variable longitud aérea.	40
Tabla 13. Resultado del contraste <i>a posteriori</i> de la prueba de Kruskal-Wallis, para plántulas inoculadas, para la variable longitud aérea.	41
Tabla 14. Medidas de resumen de la variable longitud radical (cm) en plántulas	90

de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

Tabla 15. Medidas de resumen de la variable longitud total (cm) en plántulas de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos. **92**

Tabla 16. Resumen de los resultados presentados en maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con auxinas, giberelinas y citocininas. **51-52**

RESUMEN

El maíz es el tercer cultivo de importancia en el mundo junto con el arroz y el trigo. Debido al aumento de la producción y a las múltiples posibilidades de utilización, es necesario un gran trabajo de investigación y desarrollo para mejorar su producción. El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar la germinación, implantación y el crecimiento temprano de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) durante los primeros estadios del desarrollo vegetal, debido a la aplicación individual o combinada de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) del género *Azospirillum*, y tres hormonas vegetales (auxinas, giberelinas y citocininas). Se realizó un experimento con un diseño completamente al azar con arreglo factorial y se utilizó ocho tratamientos. Las semillas fueron cultivadas en dos condiciones experimentales, de acuerdo a su estado fenológico: 1° en cámara de germinación en condiciones sugeridas por ISTA (International Seed Test Association) para evaluar: (a) energía germinativa (EG), (b) poder germinativo (PG), (c) longitud del coleoptile; (d) longitud radical y (e) longitud total y 2° en cámara de cultivo, durante 14 días con fotoperíodo de 16 hs de luz a 25° C y 8 hs de oscuridad a 20° C y con 80 % de humedad relativa (HR), para evaluar los siguientes parámetros de crecimiento temprano: (a) n° de plántulas emergidas, (b) n° de hojas desplegadas, (c) longitud de la parte aérea y radical y (d) longitud total. Éstos resultados demuestran una tendencia de que *A. brasilense* Az39 tiene la capacidad de promover la germinación, establecimiento y crecimiento temprano en semillas de maíz y que la combinación con compuestos reguladores del crecimiento vegetal del tipo fitohormonas podría modificar este comportamiento.

PALABRAS CLAVE: *Azospirillum brasilense*, fitohormonas, auxinas, giberelinas, citocininas, maíz, *Zea mays*, PGPR.

SUMMARY

Maize is the third most important crop in the world, together with rice and wheat. Due to production increase and multiple possibilities of use, significant research and development work to improve its production. The aim of this research paper was to evaluate the promotion in germination, establishment, and early growth in maize seedlings (*Zea mays* L.) during the first stages of vegetal development, where the effect of the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the genera *Azospirillum*, in combination with three plant hormones (auxins, giberelines, cytokinines), was evaluated. A completely randomized design with factorial arrangement and eight treatments was used in the experiment. Seeds were grown in two experimental conditions, according to its phenological state: 1° in germination chambers under conditions suggested by the ISTA (International Seed Test Association) to evaluate: (a) germination energy (GE), (b) germination potential (GP), (c) coleoptile length; (d) root length and (e) total length and 2° in growth chambers, during 14 days with a 16-hour photoperiod at 25° C and a 8-hour period of darkness at 20° C with a relative humidity (RH) of 80%, to evaluate the following parameters of early growth (a) n° of emerged seedlings, (b) n° of emerged leaves, (c) surface and root length and (d) total length. These results show a tendency that *A. brasilense* Az39 has the ability of promoting germination, establishment, and early growth in maize seeds and that the combination of plant growth regulators (phytohormones) could change this behavior.

KEY WORDS: *Azospirillum brasilense*, phytohormones, auxins, giberelines, cytokinines, maize, *Zea mays*, PGPR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características de la especie en estudio

El maíz pertenece a la familia de las Poáceas (gramíneas), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Originario de Centroamérica y con varios sitios de diversidad que se encuentran en México y los Andes centrales de América del Sur, este cultivo deriva de plantas muy similares conocidas como “teosintes”, que crecen de manera silvestre en las áreas de México y Guatemala. Hay en el mundo más de 250 razas de maíz reconocidas (Abdo, 2012), siendo 40 las autóctonas descritas en Argentina (Eyherabide, 2006). Existen maíces de diferentes colores de granos, tipos de granos (harinosos o duros), de espigas grandes o pequeñas y con granos de diferente tamaño. (Abdo, 2012). Es uno de los principales cultivos agrícolas a nivel mundial, ocupando por su volumen de cosecha el tercer puesto después del trigo y el arroz (Alvarez y Mulin, 2004). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estimó que la producción mundial de esta especie para la campaña 2013/14 fue de 967,52 millones de toneladas (Agropanorama, 2014), donde los principales países productores son: Estados Unidos, China, Brasil y la Unión Europea en su conjunto. A nivel nacional, Argentina es el tercer exportador mundial y la Bolsa de Cereales de Rosario estimó que la superficie sembrada en 2013/14 fue de 4,3 millones (880 mil ha fueron destinadas a uso forrajero), con una estimación de producción de 22,7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 66,1 qq/ha (BCR, 2014).

El consumo de maíz se incrementó de manera acelerada en los últimos años. La evolución de los países asiáticos, la recuperación de la industria aviar, los nuevos mercados y el aumento de la población se consideran como algunas de las razones por las que el consumo mundial de maíz creció más de un 35% durante la última década. El creciente uso de maíz para la fabricación de etanol se considera la principal razón del aumento de la demanda del cereal en el mundo, pero ocurre especialmente en Estados Unidos, desde 2006 existe un mandato por el que se reemplaza de manera gradual el petróleo por fuentes de combustible de origen renovable. En la campaña 2006/07 se destinaron 54 millones de toneladas de maíz a la producción de etanol en USA y en la campaña 2011/12 ese volumen ascendió a las 127 millones de toneladas. Según datos del USDA, en los últimos 10 años el consumo industrial de maíz creció un 52% mientras que el destino del grano como forraje solo aumentó un 15%. Adicionalmente, un estudio de la FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas) y de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) considera que los derivados de la cadena del maíz son los que más aumentarán su volumen comercializado en los próximos 10 años. (FYO,

2014). Argentina participa en un 2% de la producción mundial exportando cerca del 65% de su producción y destinando al mercado interno el 35 % restante (Pastor, 2004).

En relación a las provincias productoras el cultivo de maíz en nuestro país se realiza principalmente en Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, La Pampa Santiago del Estero y Chaco en concordancia con las diferentes características agroclimáticas de cada región. Si bien, el área de siembra es muy dispersa, las provincias de Córdoba y Buenos Aires concentran el 70% de la producción con los mejores rendimientos y mayores oportunidades de destinos de la cosecha (FYO, 2014). Córdoba con un 38% de la producción nacional; Buenos Aires con el 31% de la producción y Santa Fe con un 14%. Del volumen total para el consumo interno, más de un 80% se destina a la alimentación animal bajo las formas de balanceado, silaje de maíz, derivados de la molienda o directamente grano entero, partido y/o molido, siendo el consumo en campo y la molienda en su conjunto los principales demandantes del maíz internamente (Pastor, 2004).

1.2. Características morfo-fisiológicas y características generales del grano

El maíz es una especie de crecimiento anual, pueden medir desde menos de un metro en zonas templadas hasta casi cuatro metros en ambientes tropicales (Abdo, 2012). Cultivado en la Argentina presenta una madurez relativa de 110 a 130 días, siendo de 110 a 115 días el ciclo ideal para la región sudeste de la provincia de Buenos Aires; de 115 a 125 días para la región pampeana central y de 125 a 130 días para zonas subtropicales. Es un cultivo cuyo aumento en el rendimiento está asociado a su mejoramiento genético, utilización de fertilizantes, incorporación de riego complementario, utilización de híbridos con mayor potencial de producción, resistencia a enfermedades y plagas, como el uso de semillas transgénicas, entre otras tecnologías (Gear, 2006). Se adapta a todos tipos de suelo con pH entre 6 a 7, requiere suelos profundos, ricos en materia orgánica y debe encontrarse en un ambiente en el cual predominen temperaturas dentro de un rango de 25 a 30°C para un normal crecimiento y desarrollo del cultivo. (Andrade *et al.*, 1996). Es una planta monoica con inflorescencia masculina y femenina, separada dentro de la misma planta con un tallo simple erecto, de elevada longitud (Bianco *et al.* 2004). Desarrolla varias yemas laterales en la axila de las hojas de la mitad superior de la planta; éstas terminan en una inflorescencia femenina, de las que solo una o dos se desarrollan en mazorcas cubiertas por hojas espatáceas (chalias). La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, que producen abundantes granos de polen (Paliwal, 2001).

En cuanto al grano, es un fruto con una sola semilla, llamado cariopse, en el que el tegumento o testa del fruto se encuentra adherido a la semilla. El endosperma ocupa 80-82% del peso seco del grano en madurez y representa el principal tejido de almacenaje de almidón y proteína. En cambio, el embrión, es un pequeño porcentaje del peso seco total del grano (menos del 2%). Como se muestra en la Figura 1, se diferencia en un eje embrionario (luego da lugar a la plántula) y un sólo cotiledón (escutelo), que contiene reservas y también funciona como una fuente de enzimas para la digestión del almidón y las proteínas del endosperma durante la germinación (Satorre *et al.* 2003).

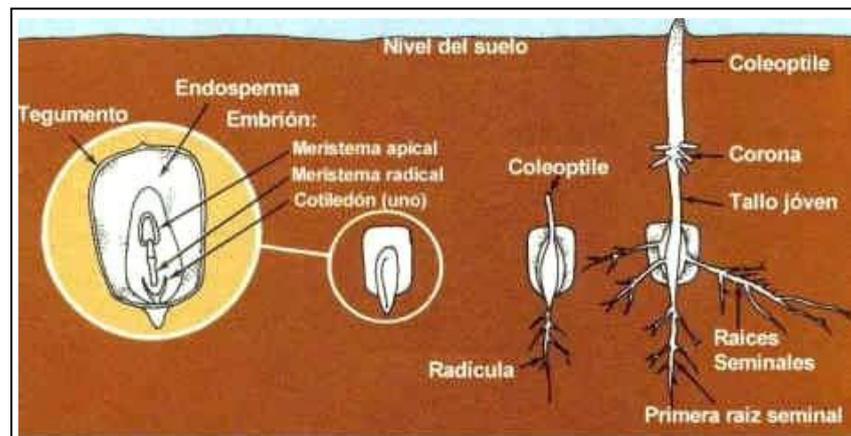


Figura 1: Esquema simplificado de la semilla y plántula de maíz, con sus partes.

1.3. Germinación

Se pueden identificar al menos tres etapas en el proceso de germinación: (1) Imbibición; (2) Germinación/Emergencia y (3) Crecimiento. El paso previo a la germinación, involucra la ruptura de la dormición de la semilla. La imbibición o entrada de agua en la semilla, inicia una serie de procesos metabólicos que hasta ese momento se encontraban latentes, se degrada el ácido abscísico (ABA) y otros inhibidores de la germinación (compuestos del tipo fenólico) y se da la síntesis *de novo* del ácido giberélico (GA₃), considerada la hormona de la germinación. Este nuevo balance hormonal, finaliza con la ruptura de la dormición y el inicio del proceso de germinación y emergencia propiamente dicho, como se observa en la **Figura 2**. De acuerdo con Azcón-Bieto y Taylor (2008) y Barceló *et al.* (1992), el maíz tiende a romper la dormición y consecuentemente germinar bajo las siguientes condiciones ambientales:

- ✓ *Humedad en la semilla* con un aumento de al menos un 30%.
- ✓ *Temperatura adecuada* entre 5 y 15 °C siendo normalmente lo ideal entre 15- 20 °C.

La germinación concluye con el inicio de la fase de crecimiento, que se da con la emergencia de la radícula. El embrión comienza a desarrollar sus partes diferenciadas (meristemas apicales de tallo y raíz). A partir de este momento, la aplicación de cualquier principio activo (ej. fitohormonas), podría tener un efecto fisiológico determinado por la capacidad de la plántula de absorberlo a través de la raíz en pleno desarrollo.

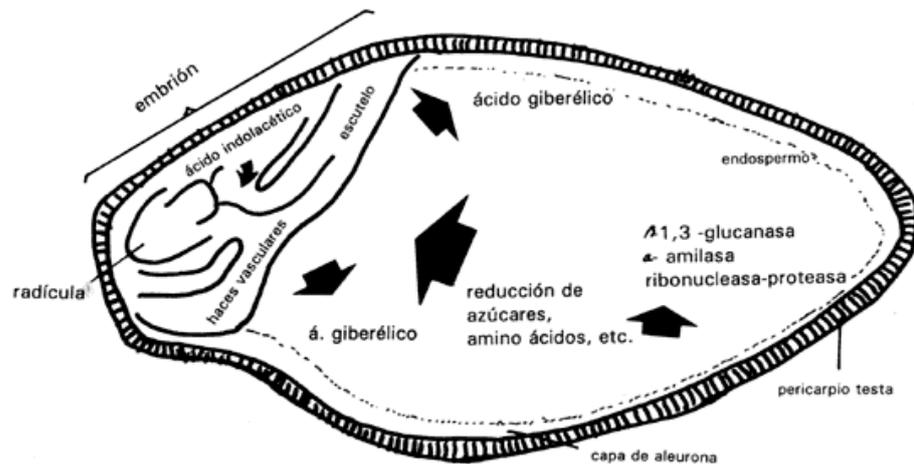


Figura 2: Actividad hormonal y enzimática en grano de monocotiledonia durante la germinación.

1.4. Crecimiento temprano

El crecimiento temprano o vegetativo abarca desde la germinación hasta el momento en el que se desarrollan los primeros órganos reproductivos, o la planta es capaz de desarrollarlos en condiciones normales. Consiste en el desarrollo de las partes previamente diferenciadas en el embrión. Implica un aumento irreversible en el número de células, acompañado de un aumento en volumen y biomasa de las mismas. Este proceso, al igual que el resto de fases de desarrollo de la planta, estará influenciado por las características ambientales. La forma en que las plantas son capaces de traducir las señales del medio ambiente en procesos fisiológicos específicos, son las hormonas vegetales o fitohormonas (Azcón-Bieto y Talyon. 2008; Barceló *et al.* 1992).

La raíz es el cerebro de la planta, despliega el programa genético de crecimiento y posteriores fases de desarrollo. Un potente sistema radicular, abrirá mayor superficie de exploración, mayor capacidad de absorción de agua y nutrientes y, por lo tanto, mayor capacidad de resistencia frente a estrés hídrico, deficiencias nutricionales, mayor sujeción, etc. Hormonalmente las raíces son la base de síntesis de un grupo de fitohormonas denominadas citocininas, que se mueven hacia puntos de crecimiento superiores incrementando la tasa de división celular. Los meristemas apicales son fuente de otro grupo de fitohormonas denominadas auxinas y una vez que el embrión inicia el crecimiento de su

meristema apical (del tallo), se iniciará la síntesis activa de esta hormona, que combinada con las citocininas, que llegan desde la raíz, darán lugar a una activa división celular y al desarrollo sucesivo del cuerpo de la planta (Barceló *et al.*1992). Este balance hormonal es regulado por las condiciones ambientales de desarrollo, principalmente por: radiación (iluminación); temperatura; agua y el estado nutricional. Cuando las condiciones son óptimas las coñas radiculares perciben esta situación y se la comunican al resto de la planta, incrementando el desarrollo radicular y por lo tanto la producción de citocininas, que dará lugar a un mayor y mejor desarrollo aéreo.

Otra hormona vegetal implicada en el crecimiento inicial de la planta es el ácido giberélico (GA₃). Cuando las condiciones ambientales son propicias (luz, temperatura, etc) se desencadenan las rutas metabólicas de síntesis de esta hormona, que en combinación con auxinas y citocininas inician el crecimiento, la elongación de las células y consecuentemente de los tejidos, que realmente es el que determina la forma y tamaño final de la planta (Azcón-Bieto y TAYLOR, 2008).

1.5. Calidad de semillas

La semilla es un insumo básico y clave en el stand de plantas sanas y homogéneas a campo, permitiendo una emergencia rápida y uniforme, de ahí su importancia sobre la rentabilidad y el éxito del mismo. Como todo insumo debe estar sujeto a un control de calidad que defina su eficiencia. (Pérez y Volpi, 2004). A nivel mundial existe una metodología específica para cada uno de estos parámetros descripta en los Protocolos Internacionales para el Análisis de Semillas publicados por el ISTA (ISTA, 2007), que es el organismo responsable de estandarizar todas las metodologías para el control de calidad de semillas a nivel mundial. En Argentina, el organismo equivalente es el INASE (Instituto Nacional de las Semillas) que se encuentra dentro del ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación. Las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas, editadas por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas del inglés (ISTA o Internacional Seed Test Association) mencionan que “uno de los mayores riesgos de la agricultura es la siembra de semillas que no tienen la capacidad de producir un cultivo abundante del cultivar y/o variedad deseada”. Se reconoce así, que sin semillas de calidad no hay agricultura y el término “sustentabilidad” deja de tener sentido (INTA, 2012).

1.6. Calidad de semillas y su importancia en el cultivo de maíz

Los atributos comúnmente más utilizados para analizar la calidad de las semillas son su viabilidad, germinación, vigor y sanidad. En todos los casos, existe una correlación directa entre tales atributos, mayoritariamente evaluados en el laboratorio y el comportamiento del cultivo, en condiciones agronómicas. Una semilla con una mayor germinación (poder germinativo) y crecimiento inicial (vigor) determinará potencialmente un mayor rendimiento para ese cultivo. En el caso particular del maíz, se recomienda lograr un cultivo bien implantado y con un número de individuos uniformemente distribuidos para obtener los rendimientos estimados y esto se extrapola desde el punto de vista fisiológico con la obtención de una cobertura vegetal adecuada y con una eficiente intercepción de la radiación solar, que indefectiblemente determinarán una mayor captura de radiación y un mayor rendimiento del cultivo (Andrade *et al.*; 1996). Así, volviendo al inicio de este párrafo, queda claro que semillas de maíz con una mayor capacidad germinativa y de crecimiento temprano, determinarán potencialmente un aumento del rendimiento en condiciones agronómicas.

El maíz es un cultivo sensible a la densidad poblacional y uniformidad espacial, por ello es muy importante que no existan problemas durante la germinación e implantación. Así, la densidad de siembra es una de las prácticas de manejo mayoritariamente controladas para esta especie en condiciones agronómicas (Satorre, 2003). La variabilidad en la distribución de las plantas en un lote podría ser causada por: (a) un mal funcionamiento de la sembradora; (b) una excesiva velocidad de siembra y (c) un bajo poder germinativo o un crecimiento inicial insuficiente o aletargado (Bragachini *et al.*, 2002) como ocurre debido al ataque de algunas enfermedades. Este es el caso del Mal de Río Cuarto (MRCV), en el sur de la provincia de Córdoba, la mayor sensibilidad de la planta se observa en los estadios tempranos del desarrollo, por lo tanto una mayor germinación y mejor crecimiento temprano podrían ser consideradas como una alternativa para mitigar esta enfermedad. Para puntualizar esta consideración debemos mencionar que el MRCV es considerado una de las enfermedades más importantes para el cultivo de maíz en nuestro país. Este cultivo es altamente propenso a adquirir el virus, manifestar la enfermedad y mostrar un grado severo de síntomas cuando las plantas tienen hasta cinco hojas. Por lo tanto una de las estrategias de manejo para esta enfermedad podría basarse en el acortamiento del período susceptible de la planta aumentando su capacidad germinativa y de crecimiento temprano (Escande, 2005).

Unas de las prácticas agronómicas relacionadas con la búsqueda de mejoras significativas sobre la implantación de los cultivos de alto interés económico como el maíz (*Zea mays*) y

otras especies de alta producción nacional, se han relacionado con el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en formulaciones definidas como inoculantes (Boiero, *et al.* 2007; Perrig *et al.*, 2007) y/o moléculas reguladores del crecimiento vegetal (fitoestimulantes) (Davies, 1995), pero no existe información reportada relacionada al uso combinado (interacción) de estos productos biológicos en semillas o plántulas.

1.7. Rizobacterias promotoras del crecimiento

El suelo es el soporte natural en el que proliferan un gran número de microorganismos. Se utiliza el término de rizósfera para describir la parte del suelo que se encuentra en contacto directo con la región radical de la planta en la que se induce la proliferación de microorganismos. Las bacterias de la rizosfera, denominadas rizobacterias, tienen capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces de muchas especies vegetales (Gárate y Bonilla, 2000) se pueden separar entre las que forman una relación simbiótica con la planta y las que no lo hacen, denominadas de vida libre, que se asocian cerca, sobre las raíces o dentro de ellas como endofíticas (Kloepper *et al.*, 1989). Entre las asociaciones más exitosas de la naturaleza, se destacan la asociación benéfica entre gramíneas y rizobacterias de vida libre de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* que colonizan la rizósfera de dichas plantas o sus tejidos de manera endofítica (Döbereiner y Pedroza, 1987). Adicionalmente, la bibliografía en general considera a *Azospirillum* sp. como uno de los más importantes géneros bacterianos responsable de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo así como el rendimiento de numerosas especies cultivables (Okon, 1985). Cuando las rizobacterias son benéficas para el crecimiento de las plantas, se las denomina rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.*, 1993). Son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Inicialmente, estas bacterias llamaron la atención de los investigadores por dos características distintivas:

1. la capacidad de colonizar de maneras endofítica los tejidos de ciertas gramíneas y otras especies;
2. la capacidad de aumentar significativamente el crecimiento radical y aéreo de plantas inoculadas.

Posteriormente, Bashan y Holguin (1998) introdujeron un nuevo concepto que divide este grupo entre (a) las **PGPR**, que promueven el crecimiento mediante mecanismos directos, en los que el efecto promotor depende del aporte bacteriano de compuestos capaces de regular el crecimiento, la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos.

Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas; y (b) las bacterias promotoras del crecimiento vegetal por biocontrol o biocontrol-**PGPR** (del inglés, Biocontrol-Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que promueven el crecimiento por mecanismos indirectos mediados por la inhibición del desarrollo o actividad de organismos fitopatógenos. Según Okon y Labandera-Gonzalez (1994) su aplicación a gran escala no ha sido fácil, debido a problemas como la inconsistencia y lo poco previsible de los resultados obtenidos en campo, especialmente cuando los agricultores tienen poco tiempo o conocimiento acerca de la inoculación con bacterias.

La promoción directa del crecimiento se produce cuando una PGPR proporciona los compuestos que afectan al metabolismo de la planta o cuando se facilita la adquisición de nutrientes no disponibles en el suelo. En las PGPR los mecanismos directos más importantes han sido propuestos para el género *Azospirillum* sp., además de la fijación biológica del nitrógeno son: (a) la actividad nitrato reductasa (NR) ligada a la producción de óxido nítrico; (b) la solubilización de fosfatos; (c) la producción de sideróforos, que incrementan la disponibilidad de Fe en la rizosfera; (d) la biosíntesis de fitohormonas o compuestos reguladores del crecimiento, tales como el ácido indol acético (AIA) (Bastían *et al.*, 1998); el ácido giberélico (GA₃) (Bottini *et al.*, 2004) y ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007); (e) incremento en el volumen de la raíz con la consecuente absorción de minerales y nutrimentos (Crowley *et al.*, 1991; Bowen y Rovira, 1999), entre otros mecanismos menos estudiados. Así, los beneficios directos de la inoculación de semillas con PGPR incluyen incrementos en la tasa de germinación, aumento del crecimiento de la raíz y del tallo (Cassán *et al.*, 2009 a); aumento en la absorción de nutrientes (Okon y Kapulnik, 1986) y tolerancia a la sequía (Glick, 1995). Por otro lado, los mecanismos indirectos dependen de la interacción de la PGPR con un fitopatógeno por la que se reducen los efectos dañinos en el vegetal. Esta capacidad estaría mediada por la biosíntesis de antibióticos y antifúngicos o por competencia directa con los patógenos de la rizósfera.

La identificación y posible manipulación de las asociaciones entre PGPR o PGPB y plantas superiores, ha sido considerada una estrategia fundamental de la agricultura moderna. (Terouchi y Syono, 1990). Tien *et al.*, (1979) fueron los primeros en sugerir que bacterias rizoféricas, podrían mejorar el crecimiento vegetal por excreción de fitohormonas como ácido indol-3-acético (AIA), giberelinas (GAs), citocininas (CA) y etileno (Et) (Bottini *et al.*, 1989). El tratamiento de semillas con inoculantes microbianos también ha sido empleado

para promover y acelerar la germinación de semillas y el crecimiento temprano de plántulas. Cassán *et al.*, (2009 b) indicaron que *Azospirillum sp.* tiene capacidad de promover la germinación de semillas y crecimiento temprano de plántulas de maíz. En gramíneas, el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar y seleccionar una cepa promotora del crecimiento vegetal. El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la elongación de la raíz principal o por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en un estadio crítico del desarrollo vegetal. (Ross *et al.* 2000). La capacidad de *Azospirillum sp.* para estimular el crecimiento de plantas inoculadas ha sido comprobada en decenas de experimentos en condiciones sumamente contrastantes; sin embargo, los mecanismos por los cuales *Azospirillum sp.* modificaría el desarrollo y la productividad vegetal aún son motivo de debate dentro de la comunidad científica (Bashan *et al.*, 2004).

1.8. Formulación de inoculantes en la República Argentina.

En la década del 80, en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA-INTA) de Castelar (Bs As), realizó un intenso programa para seleccionar e identificar cepas de *Azospirillum sp.* capaces de mejorar la productividad de cultivos de trigo y maíz en condiciones de campo. Este programa permitió seleccionar a la cepa Az 39 como mejor performance y recomendarla para la fabricación de inoculantes para maíz y trigo en la República Argentina. Desde el punto de vista fisiológico, los mecanismos potencialmente responsables de la promoción del crecimiento vegetal presentes en la cepa Az39 de *A. brasilense* fueron evaluados por Perrig *et al.* (2007) en medio de cultivo químicamente definido y de la misma manera que en *A. brasilense* Az39, las fitohormonas parecerían jugar un rol central en la interacción. Cassán *et al.* (2009 a), establecieron la capacidad de la cepa Az39 de promover la germinación y crecimiento temprano de maíz y parte de la respuesta se debería a la producción de fitohormonas. En tal sentido, un inoculante formulado para promover el crecimiento vegetal debería definirse como un “complejo biológico” resultante de la presencia de un microorganismo, en este caso *Azospirillum sp.* y todas las moléculas resultantes de la biotransformación los componentes adicionados al medio de cultivo durante su fermentación, tal es el caso de las hormonas vegetales.

1.9 Importancia económica del uso de biofertilizantes en Argentina

El término de biofertilizante es muy amplio, representando desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera sintetizada, se puede decir que son productos que contienen microorganismos u otros principios activos de origen biológico (incluidas las fitohormonas), que al ser inoculados o aplicados sobre la planta pueden modificar el comportamiento, vivir asociados o en simbiosis con éstas y le ayudan a su nutrición o desarrollo (Vessey, 2003). El uso de biofertilizantes es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, sin ejercer un impacto perjudicial sobre el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad. En términos generales, se puede decir que los biofertilizantes representan un 10% del costo de la fertilización química para el productor, con un valor promedio de dosis entre los u\$s 3-5 por hectárea. Lo que en la mayoría de los casos no representa más del 2-3 % del costo de producción del cultivo. Con esta relación, claramente se consolidan como una herramienta de bajo costo destinada a incrementar la productividad de ciertos cultivos, fundamentalmente aquellos dependientes de la fertilización nitrogenada (Rosas *et al.*, 2013).

1.10. Hormonas vegetales

Para poder crecer además de agua, nutrientes, luz solar y dióxido de carbono, las plantas necesitan de hormonas vegetales. Las hormonas vegetales o fitohormonas, son un grupo químico de compuestos naturales que afectan procesos de las plantas a concentraciones más bajas de las que presentan nutrimentos o vitaminas. Son producidos por plantas, bacterias, hongos e incluso pueden ser sintetizados por el hombre con capacidad de promover, inhibir o regular casi todos los procesos fisiológicos en plantas superiores. Se encuentran a muy bajas concentraciones, se sintetizan en determinado lugar de la planta y se translocan a otro lugar, donde ejercen sus efectos reguladores. Dentro de estas moléculas podemos considerar a las auxinas, giberelinas y citocininas como los grupos más representativos, además del ácido abscísico, el ácido jasmónico o el etileno. Las fitohormonas constituyen un grupo de compuestos orgánicos diversos que influyen en casi todos los procesos fisiológicos de las plantas, principalmente aquellos relacionados con el crecimiento, diferenciación y desarrollo (Kende y Zeevaart, 1997; Kucera *et al.*, 2005; Marchi *et al.*, 2007). La germinación y el crecimiento de las plántulas también pueden ser controladas por la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en concentraciones

fisiológicas, que pueden actuar como promotoras e inhibidoras de ambos procesos (Amador *et al.*, 2013).

1.10.1. Auxinas

Auxina, proviene del término griego que significa “crecer”, es un nombre genérico que representa a un grupo de compuestos que han sido vinculados a procesos de orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz y gravedad, diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical (reprimiendo el desarrollo de brotes axilares laterales), iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallos y raíces (Ross *et al.*, 2000). Es una de las fitohormonas de mayor relevancia dado que regula muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal como la división, elongación y diferenciación celular (Zaho, 2010).

Las auxinas se encuentran en toda la planta, pero las enzimas responsables de la biosíntesis del IAA son más activas en los tejidos finos jóvenes como meristemas apicales, hojas y frutas crecientes. En los tejidos finos, como regiones meristemáticas en crecimiento activo se concentran más IAA. No se conoce cuáles son exactamente las vías de transporte del IAA, pero se cree que son transportadas por células asociadas a floema más próxima al cambium por medio de un mecanismo dependiente de energía alejándose de forma basipétala (desde el punto apical de la planta hacia su base) (Lluna, 2006). La producción y metabolismo bacteriano de auxinas ha captado la atención de los investigadores como un mecanismo alternativo a la FBN para promover el crecimiento vegetal en PGPRs y en algunos géneros de rizobios como *Bradyrhizobium* o en el género *Azospirillum sp.* el estudio de estas hormonas ha sido evaluado desde el efecto fisiológico que ocasiona en plantas inoculadas (Falik *et al.*, 1989).

Como otras fitohormonas, las auxinas también se sintetizan endógenamente por las plantas; sin embargo, sus efectos hormonales se han elucidado por sus aplicaciones exógenas (Contreras *et al.*, 2010). Tien *et al.* (1979) y Hubbell *et al.* (1979) probaron que la aplicación exógena de auxinas, giberelinas y citocininas en mijo perla (*Pearl millet*) y sorgo (*Sorghum sp.*) respectivamente, producían los mismos cambios en la morfología de raíz que en las plántulas inoculadas con *A. brasilense*. Kolb and Martin (1985) comprobaron que la inoculación de *Beta vulgaris sp.* con *A. brasilense*, aumentó el número de raíces laterales y esto se correlacionó con la identificación de altos niveles de auxinas bacterianos presentes en el medio de cultivo. Adicionalmente, la aplicación exógena de auxinas, causó un efecto similar al de las plántulas inoculadas. Simultáneamente, Kucey (1988) comprobó que la inoculación de trigo con *A. brasilense* simulaba el efecto del tratamiento exógeno con

auxinas y giberelinas a nivel del patrón de crecimiento de tallo y raíz. También en las plantas de trigo, Zimmer *et al.* (1998) probaron que la adición exógena de auxinas (completamente) y NO₂- (parcialmente) eran sustituidas por la inoculación con *A. brasilense*. Estos resultados revelan que las auxinas de origen microbiano y en particular, las producidas por *Azospirillum* sp. podrían tener un interés significativo para la industria agrícola. Estos compuestos producidos en forma continua y en baja concentración en el exterior de raíces ó en el interior de la planta proveen de una dosis hormonal constante que resulta suplementaria y beneficiosa para el crecimiento vegetal y un sistema mejorador a la aplicación exógena de formas sintéticas en el suelo cultivado.

1.10.2. Giberelinas

Las giberelinas constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos) que regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la germinación, el alargamiento caular, la floración y la fructificación (Davies, 1995). El uso de métodos fisicoquímicos de alta sensibilidad ha revelado que las giberelinas son un amplio grupo de productos naturales, constituidos al menos por 126 compuestos producidos tanto por plantas, hongos y bacterias (Hedden and Phillips, 2000) y que son esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de todas las plantas superiores (Mander, 1991). Actualmente hay más de 90 giberelinas aisladas de tejidos vegetales, que han sido identificadas químicamente. Varían algo en estructura y también en actividad. La mejor conocida del grupo es la GA₃ (ácido giberélico), producida por el hongo *Giberella fujikuroi* (Lluna, 2006).

Esta hormona se presenta en cantidades variables en todos los órganos de la planta, pero las concentraciones mayores se alcanzan en órganos jóvenes, y en las semillas inmaduras. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y semillas en desarrollo. Esta hormona, a diferencia de las auxinas, muestran un movimiento por el floema junto con los productos de la fotosíntesis y también por el xilema. Poseen actividad hormonal y regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Davies, 1995). La inducción del crecimiento del tallo es probablemente el efecto más evidente, vía alargamiento celular (Ascon-Bieto y Taylon, 2003). También están implicadas en la promoción del crecimiento de las raíces y la abundancia de pelos radicales (Bottini y Luna 1993; Fulchieri *et al.* 1993; Reinoso *et al.* 2002) y son ampliamente utilizadas para promover o inducir la geminación de semillas en diversas especies (Hartmann y Kester, 1987). En la mayoría de estos procesos, las giberelinas actúan en combinación con otras fitohormonas (Trewavas 2000). Ross *et al.*,

(2000) demostraron que en especies cultivadas, el efecto de las giberelinas sobre el alargamiento celular depende de la presencia de auxinas.

Al igual que las auxinas, la producción bacteriana de giberelinas se ha estudiado extensamente desde dos puntos de vista, desde la capacidad bacteriana de producir o metabolizar formas activas de giberelinas por parte de *Azospirillum sp.* en medio químicamente definido (Piccoli *et al.* 1998) y desde la modificación del balance hormonal y estimulación del crecimiento de plantas por la inoculación con este microorganismo (Fulchieri *et al.* 1993, Lucangeli y Bottini 1997, Cassán *et al.* 2001). Ensayos de inoculación con *Azospirillum sp.* demostraron que se incrementó el crecimiento y la producción de cultivos de cereales y al menos, parte de este efecto, podría atribuirse a la producción de fitohormonas por la bacteria y dentro de ellas, específicamente a las giberelinas (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). Esto mismo fue demostrado para la cepa Az39 de *A. brasilense* (Cassán *et al.* 2009 b). Probanza *et al.* (2002) también informó que la inoculación con *Bacillus licheniformis* y *B. pumilus* en plantas de *Pinus pinea* tuvo mayor crecimiento por la producción de giberelina bacteriana.

1.10.3. Citocininas

Las citocininas son un grupo de compuestos naturales que regulan procesos de división y diferenciación celular en tejidos no meristemático de plantas superiores (Sakakibara, 2006). Este grupo de fitohormonas se considera responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular (Klee y Estelle, 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas (Sakakibara, 2006). Por definición, son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos o tejidos vegetales. El primer regulador con actividad específica del tipo citocinina, fue descubierto por Miller *et al.*, (1955), y se denominó *cinetina* (K) la cual fue considerada como una forma no natural de la hormona. En 1963, Letham, identificó una forma natural que se denominó *zeatina* (Z) y desde entonces más de 40 moléculas y sus metabolitos han sido clasificados. Tien *et al.* (1979) fueron los primeros en demostrar la capacidad de *A. brasilense* de producir citocinina como moléculas usando diferentes tipos de cromatografía y en un bioensayo de inoculación en mijo perla. Muralidhara y Rai (1986) en *A. lipoferum* obtuvieron resultados similares. Además, la inoculación produjo cambios significativos en la morfología de la raíz

causada por el aumento de número de raíces laterales y la densidad de pelos radicales como los obtenidos mediante la aplicación de citocininas exógenas (Tien *et al*, 1979).

En este trabajo, se evaluó el tratamiento individual o combinado de inoculantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento del género *Azospirillum brasilense* y soluciones a base de fitohormonas del tipo auxinas, giberelinas y citocininas en semillas de maíz, con el objetivo de verificar si su aplicación individual y/o combinada podrían modificar la germinación y el crecimiento temprano, así potencialmente mejorar la productividad del cultivo en condiciones agronómicas. La importancia del abordaje experimental propuesto radica en que, una mejora sobre el proceso de germinación o el crecimiento temprano para la especie en estudio determinaría una mejora potencial a nivel de su capacidad de implantación, por lo tanto es imprescindible que todas las plantas nazcan y que estén separadas a la misma distancia para evitar la dominancia entre plantas, como así también de obtener un rápido crecimiento temprano, acortando el período susceptible de la planta a enfermedades como el MRC. Considerando que tanto la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento, como la de productos con efectos hormonales a nivel de semilla, se consideran como prácticas en expansión para el cultivo de maíz y otros cultivos en Argentina, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo.

2. HIPÓTESIS

“La aplicación de inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* y hormonas vegetales exógenas de manera individual o combinada modifica la respuesta de germinación, implantación y crecimiento temprano de semillas de maíz”

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar los procesos de germinación, implantación y crecimiento temprano en semillas de maíz (*Zea mays L.*) por el tratamiento biológico individual o combinado de rizobacterias promotoras del crecimiento del género *Azospirillum* y fitohormonas.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la germinación de semillas de maíz (*Zea mays L.*) en estado natural y tratadas exógenamente con soluciones de fitohormonas y/o la inoculación con dosis agronómicas de *A. brasilense*.
- Evaluar la implantación y parámetros de crecimiento temprano (longitud aérea, longitud radical) de semillas de maíz (*Zea mays L.*) naturales o tratadas exógenamente con diferentes soluciones de fitohormonas e inoculadas con dosis agronómicas de *A. brasilense*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Naturales, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

4.1 Material Vegetal

Para los ensayos de germinación y crecimiento temprano se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays L.*), híbridos simples de ciclo intermedio (MR 118 a 122), ya curadas y obtenidas durante la campaña 2011-2012. Antes del comienzo del ensayo se evaluó su energía y poder germinativo de acuerdo a las normas de la International Seed Test Association (ISTA) para esta especie.

4.2 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Az39)

Las semillas se inocularon al momento de la siembra con bioinsumos de origen comercial formulados 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 y otras especies de importancia agrícola en Argentina. La forma de aplicación y la cantidad de bacterias aportadas por unidad de siembra (dosis) se estableció de acuerdo a las recomendaciones de la empresa y declaradas en el marbete del producto, con un recuento de $5.0E + 08$ ufcml⁻¹ y una dosis de 10 ml inoculante kg⁻¹ semilla. Esta cepa fue testeada por Perrig *et al.* (2007) sobre los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en medio de cultivo químicamente definido.

4.3 Fitohormonas

Para la preparación de las soluciones, se utilizaron los siguientes reactivos comerciales: ácido indol-3-acético (AIA) en sus forma libre, ácido giberélico (GA₃) y cinetina (K), todas de la firma Olchemin (Checoslovaquia) y con un 98.0% de pureza. Las soluciones fueron preparadas en base acuosa y en concentraciones de 1 ppm. Todas las soluciones fueron almacenadas hasta su utilización en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 4°C. Las soluciones fueron adicionadas en una relación volumétrica del 10 % con el inoculante empleado en el momento de la siembra.

4.4 Ensayo de germinación

Para el desarrollo del ensayo, se tomó como base experimental, el protocolo de germinación propuesto por el Internacional Seed Test Association (ISTA, 2007) para semillas de maíz (*Zea mays L.*) con la metodología denominada “between paper” o "entre papeles". La experiencia se desarrolló con un diseño completo al azar, de dos réplicas por tratamiento (n=200) y los datos se analizaron a través de un arreglo factorial sobre un Diseño completo aleatorizado (DCA). Para ello, se pesaron 100 gr de semillas para cada tratamiento, se las colocó en bolsitas de polietileno y se les aplicó los distintos tratamientos que se detallan posteriormente. Luego, las semillas se homogeneizaron vigorosamente con las soluciones y el inoculante durante 10'. Se sembraron al azar 100 semillas en dos bandejas plásticas (15 x 25 cm) sobre papel de servilleta (doble hoja) humedecido con agua destilada estéril, como solución de riego, y se cubrieron con el mismo soporte inerte. Las bandejas se colocaron dentro de bolsas plásticas transparentes cerradas con clip para conservar la humedad. Las mismas fueron colocadas en cámara de germinación sin fotoperíodo y a una temperatura de 25° C de acuerdo a los siguientes tratamientos:

Se realizaron los siguientes tratamientos:

1. Semillas naturales (A H0):
1040 µl agua destilada cada 100 g de semilla.
2. Semillas tratadas exógenamente con AIA (A H1):
1000 µl agua destilada + 40 µl H1 (auxina) cada 100 g de semilla.
3. Semillas tratadas exógenamente con GA₃ (A H2):
1000 µl agua destilada + 40 µl H2 (giberelina) cada 100 g de semilla.
4. Semillas tratadas exógenamente con K (A H3):
1000 µl agua destilada + 40 µl H3 (citocinina) cada 100 g de semilla.
5. Semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39 (I H0):
1000 µl inoculante + 40 µl de agua destilada H0 (sin hormona) cada 100 g de semilla.
6. Semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas exógenamente con AIA (I H1):
1000 µl inoculante + 40 µl de H1 (auxina) cada 100 g de semilla.
7. Semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas exógenamente con GA₃ (I H2):
1000 µl inoculante + 40 µl de H2 (giberelina) cada 100 g de semilla.
8. Semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas exógenamente con K (I H3):
1000 µl inoculante + 40 µl de H3 (citocinina) cada 100 g de semilla

A los 4 días desde el inicio de la experiencia, se evaluó la energía germinativa (EG) por normas ISTA y a los 7 días se realizó el recuento de semillas germinadas, considerándose germinadas cuando reunían tres requisitos: (1) longitud del ápice mayor a 5 mm; (2) presencia de raíz primaria y (3) ausencia de anomalías en ambas estructuras. Al final de la experiencia, sobre las semillas germinadas se evaluaron los siguientes parámetros: (a) número de semillas germinadas, correspondientes al valor de poder germinativo (PG) por normas ISTA; (b) longitud del coleóptilo; (c) longitud de la radícula y (d) longitud total de la plántula, como parámetros representativos del crecimiento embrionario temprano (Figura 3).



Figura 3: Bandeja del tratamiento control correspondiente a semillas de maíz sin inocular, ni tratar con fitohormonas a los 4 días desde la siembra (izq.). Semillas emergidas de maíz con sus partes (derecha).

No se consideró la evaluación fitosanitaria inicialmente propuesta en el plan de trabajo, ya que la semillas de maíz fueron pre-tratadas con defensivos, por lo que no se observaron semillas infectadas por ningún patógeno. Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico exploratorio e inferencial con el software InfoStat desarrollado por el Grupo InfoStat de la ciudad de Córdoba (Balzarini *et al.* 2011).

4.5 Ensayo de crecimiento temprano

La experiencia se llevó a cabo con un diseño completo al azar, de tres réplicas por tratamiento (n=15) y los datos fueron analizados a través de un análisis estadístico con arreglo factorial sobre un DCA. Para ello, 5 semillas de maíz (*Zea mays*) fueron sembradas en receptáculos plásticos de 220 ml de capacidad, conteniendo una mezcla (1:1) de vermiculita y arena estéril como sustrato y se utilizó como solución de riego, la solución

nutritiva de Hoagland (1956) preparada al 10% de concentración con agua destilada estéril y suministrada por riego capilar. En el caso de las semillas inoculadas y/o tratadas exógenamente con fitohormonas se procedió de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.4. (utilizando la mitad de las concentraciones). Todos los receptáculos de cada tratamiento se mantuvieron por 14 días en cámara de cultivo vegetal con un fotoperíodo de 16 h de luz (PAR38 roja+azul+ambar) a 30°C y 8h de oscuridad a 25°C con 80% de HR. A los 7 días desde la siembra, se observó el número de plántulas germinadas y la cantidad de hojas desplegadas. Al final de la experiencia, luego de 14 días desde la siembra, se evaluó la cantidad de hojas desplegadas, la longitud de la parte aérea, radical y longitud total como parámetros de crecimiento.



Figura 4: Ensayo de crecimiento temprano en maíz dentro de la cámara de cultivo vegetal a los 5 días de colocados dentro de la misma.

4.6 Diseño experimental

En el ensayo de germinación, las semillas fueron sembradas en dos bandejas de manera homogénea (en cuanto a temperatura ambiente y preparación) en cada tratamiento se tomó igual cantidad de semillas. El diseño adecuado para el análisis de este fue completo y al azar, debido a que el interés de este trabajo fue el de estudiar si la utilización de rizobacterias promotoras del crecimiento o de fitohormonas de manera individual o combinada (interacción) podría modificar el comportamiento de semillas de maíz. En cuanto al ensayo de crecimiento temprano, las semillas fueron sembradas en receptáculos de manera homogénea (en cuanto a temperatura ambiente y preparación), se tomaron 3 repeticiones por tratamiento y en cada tratamiento se sembraron igual cantidad de semillas (5), no descartando ningún valor. El diseño adecuado para el análisis fue un diseño completo al azar, lo mismo del ensayo de germinación.

4.7 Análisis de datos

Con los datos obtenidos se hizo un análisis descriptivo de los ocho tratamientos. Se analizaron los datos de acuerdo al diseño propuesto, arreglo factorial sobre un DCA. En casi todas las variables no se verificó el cumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza donde se usó el test de Shapiro-Wilks para normalidad y test de Levene para homogeneidad de varianzas. Al no cumplirse estos supuestos ($p < 0.0001$), se realizaron nuevos análisis de la varianza con variables obtenidas por transformaciones a log decimal, pero tampoco se verificaron. Por lo que se realizó un análisis no paramétrico, test de Kruskal Wallis, para los 8 tratamientos. A excepción de una variable, donde los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Estas pruebas, junto con los estadísticos descriptivos se realizaron usando el programa InfoStat (Balzarini *et al.* 2011). En todas las pruebas estadísticas se trabajó con un nivel de significación α del 5%.

5. RESULTADOS

La evaluación del crecimiento vegetal durante la germinación, representa un modelo experimental desafiante y complejo ya que cualquiera de las variables consideradas para su evaluación, estarán afectadas por el proceso de germinación en sí y por la velocidad con la que este ocurre, lo que determina, independientemente de la especie y el cultivar, una respuesta de crecimiento inicial variable para cada individuo, lo que se conoce como "asincronía de la germinación" y que desde el punto de vista evolutivo a representado una ventaja evolutiva en ciertas especies . En este trabajo, las variables de crecimiento evaluadas durante la germinación y crecimiento inicial presentaron datos heterogéneos, atípicos (outliers) y variabilidad (establecida a través de la varianza y el coeficiente de variación). En el **Anexo 1** se encuentran los diagrama de cajas (box-plot) de casi todas las variables evaluadas, en las que se denotan los datos atípicos y el comportamiento disperso de los datos, tanto en los valores superiores como inferiores. Debido a la dificultad de obtener resultados confiables desde el punto de vista estadístico, se decidió utilizar un test no paramétrico para el análisis de datos. Para ello, se utilizó como respaldo bibliográfico, los trabajos previos de Cabello *et al.*(1998) y Pece *et al.* (2010) en los que utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis como herramienta estadística preferencial. Un enfoque similar fue empleado en este trabajo.

5.1 Ensayo de germinación

5.1.1 Energía y Poder germinativo

La Figura 5 y Tabla 1 del **Anexo 2** representan la Energía Germinativa (EG) y Poder Germinativo (PG) de semillas de maíz (*Zea mays* L.) a los 4 días y a los 7 días desde la siembra de acuerdo a normas ISTA. Las semillas fueron inoculadas con *A. brasilense* Az39 o tratadas con un volumen equivalente de agua destilada estéril y de acuerdo al tratamiento, impregnadas con una solución de auxinas, giberelinas o citocininas.

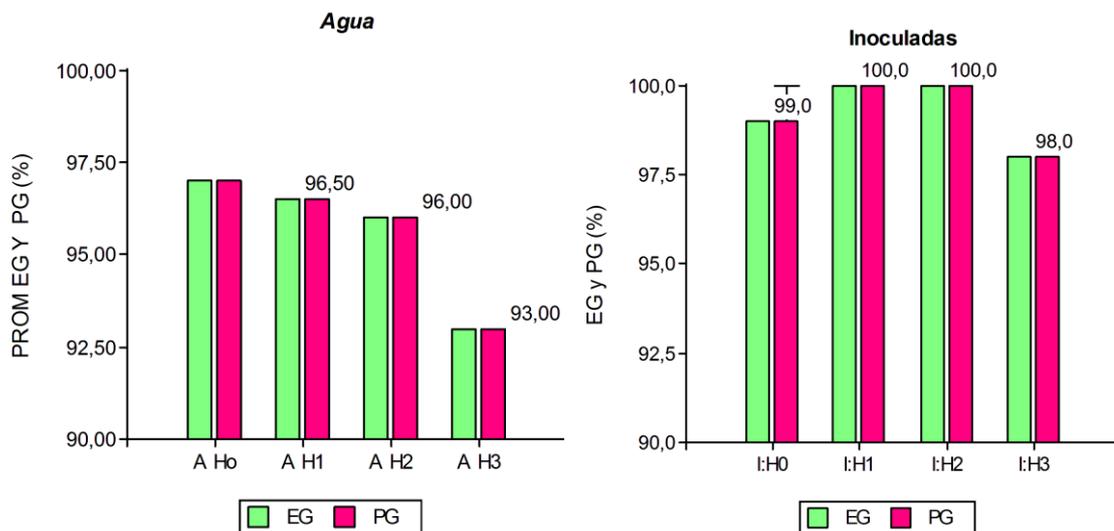


Figura 5: Evaluación del Poder Germinativo (PG) y Energía Germinativa (EG) en semillas de maíz embebidas con agua pura (A) o inoculadas con *Azospirillum* sp. (I) y tratadas de manera exógena con fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 4 y 7 días de germinadas. Las barras representan el promedio de dos repeticiones.

Como se observa en la Figura 5 y en la Tabla 1 del **Anexo 2**, la respuesta más promisorio con respecto a la Energía Germinativa y Poder Germinativo se obtuvo cuando las semillas fueron inoculadas (I) con respecto a aquellas solo tratadas con agua (A). Dentro de estos tratamientos inoculados, se obtuvo en aquellas semillas tratadas con auxinas (IH1) y giberelinas (IH2) un 100 % de semillas germinadas). El tratamiento que menor porcentaje de semillas germinadas presentó fue aquel con la adición exógena de citocininas (IH3) (98%) cuyo porcentaje incluso fue menor que el control tratado con agua (99% de EG y PG). Para el caso de las semillas sin inocular, la adición de cualquiera de los metabolitos, redujo la respuesta de germinación en comparación con el control sin tratar (AH0). En ellos, el tratamiento que menor porcentaje de semillas germinadas presentó fue aquel que recibió la adición exógena de citocininas (AH3) (93%) cuyo porcentaje fue menor que el control tratado con agua que presentó un 97% de EG y 100 % de PG.

La **Figura 6** representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en semillas de maíz, luego de 7 días de germinación.

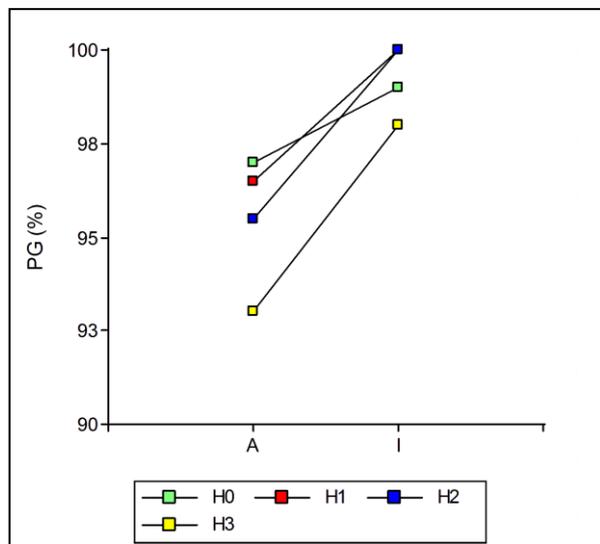


Figura 6: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para el Poder Germinativo (%) en semillas de maíz luego de 7 días de germinadas. Los puntos de color indican la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 6 de manera en general se observa que las hormonas no se comportan de la misma manera al aplicar inoculantes. En todos los tratamientos inoculados, se observa una tendencia de aumento en el porcentaje de germinación, con respecto a aquellos tratamientos sin inocular. De manera particular, se evidencia una diferencia mayor por la adición exógena de auxinas, giberelinas y el control inoculado. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se observó un menor porcentaje de germinación con la adición exógena de alguna fitohormona, en comparación con el control. En contrapartida, el menor porcentaje de germinación se manifestó cuando se le agregó citocininas.

Los resultados obtenidos en el **Anexo 2** determinaron que en ambos tratamientos (A o I) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjo un efecto diferente ($p=0,2$; $p=0,4286$).

Así, se puede resumir que la adición exógena de cualquier hormona sin la aplicación de inoculante genera un menor porcentaje para este ensayo de germinación y un efecto más marcado con la aplicación de citocininas, por lo que se podría asumir que esta hormona determinaría una reducción en estas variables. Por otro lado, cuando las semillas fueron inoculadas, las hormonas que presentaron mayor porcentaje fueron las auxinas y el ácido

giberélico, seguido del tratamiento control. Desde el punto de vista biológico, la inoculación con *A. brasilense* Az39 determinaría una tendencia de aumento en la germinación. No se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre el agregado de hormonas, a nivel de ensayo se observa diferencias, existiendo la posibilidad de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de auxinas y giberelinas.

5.1.2 Longitud del coleoptile

La Figura 7 y Tabla 2 del **Anexo 3**, representan la longitud del coleoptile (cm) de semillas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 y tratadas exógenamente con soluciones de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 7 días desde la siembra.

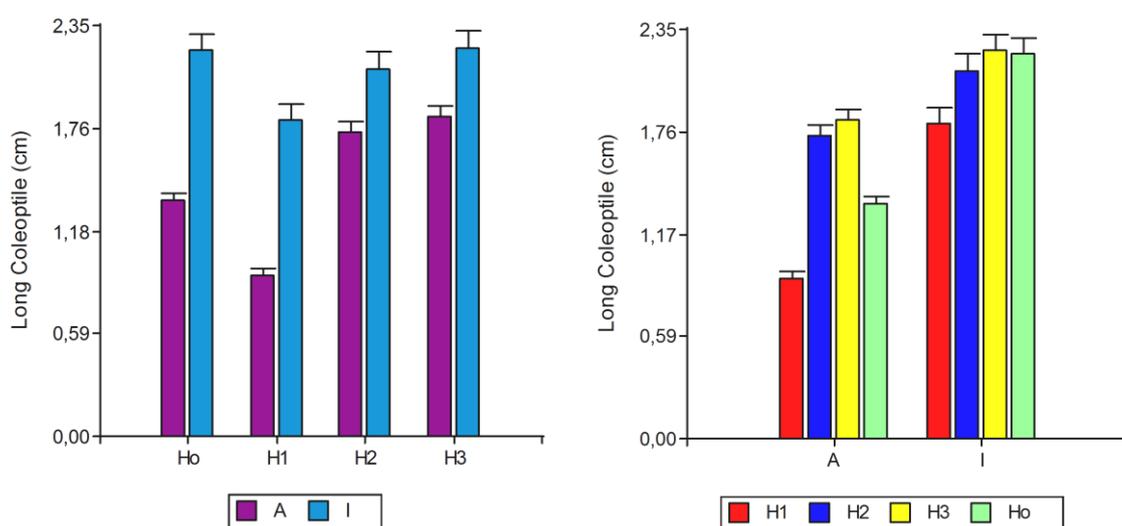


Figura 7: Evaluación de la Longitud del coleoptile de semillas de maíz embebidas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en la Figura 7, cuando las semillas fueron inoculadas mostraron un aumento de la longitud del coleoptile cercano a una media de 2 cm, que aquellas no inoculadas. De manera particular, la adición de auxinas redujo la variable en comparación con el control sin adición exógena de fitohormonas o a los tratamientos con adición de giberelinas y citocininas. Con respecto a las semillas sin inocular, el tratamiento con adición de auxinas AH1 (0,92 cm) tuvo un marcado efecto de reducción del crecimiento, con respecto a la adición de giberelinas (H2: 1,74 cm) y citocininas (H3: 1,83 cm), que en ambos casos fueron capaces de aumentar la longitud del coleoptile en relación con el control sin adición exógena de fitohormonas (HO: 1,35 cm).

La Figura 8 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento.

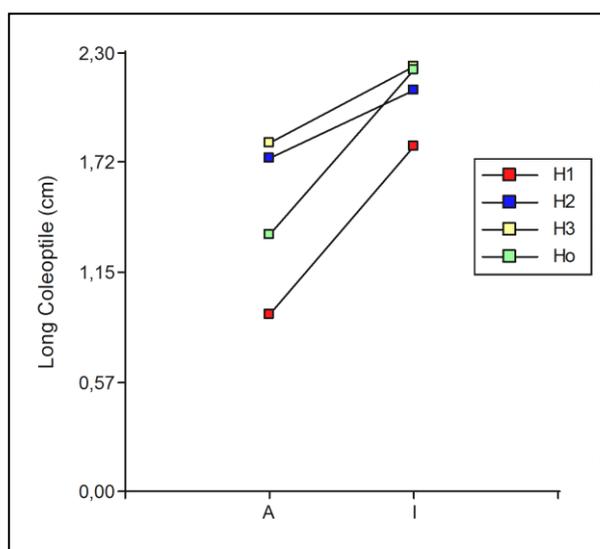


Figura 8: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud del coleoptile (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Los puntos de color indican la media del tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 8 de manera en general se observa que las hormonas no se comportan de la misma manera al aplicar inoculantes. En todos los tratamientos inoculados, se observa una tendencia de aumento en la longitud media del coleoptile, con respecto a aquellos tratamientos sin inocular. De manera particular, se evidencia una diferencia mayor por la adición exógena de citocininas y el control inoculado. Esto indicaría una tendencia que la inoculación modificaría el crecimiento del coleoptile no haciendo falta la aplicación exógena de alguna hormona. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se produjo mayor longitud media con la adición exógena de giberelinas y citocininas, en comparación con el control. En contrapartida, la menor longitud del coleoptile se manifestó cuando se le agregó auxinas. Lo que indicaría que la adición exógena de giberelinas y citocininas, sin la inoculación tendría un efecto promotor con el crecimiento. La mayor tendencia de aumento correspondió al tratamiento con adición exógena de auxinas (H1: 129%) mientras que en segundo lugar se observó en el tratamiento sin adición de hormonas (H0: 64%) y luego el caso de las citocininas (H3: 22%). Finalmente, la menor tendencia, se observó en el caso de la adición exógena de giberelinas (H2: 4%).

Los resultados obtenidos en el **Anexo 3** determinaron que en ambos tratamientos (A o I) se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona

produjo un efecto diferente ($p=0,0001$; $p=0,0031$). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso particular, se realizó una prueba *a posteriori*.

En el caso de las semillas sin inocular, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 3**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis para semillas sin inocular, para la variable longitud del coleoptile.

Test *a posteriori*

Trat.	Ranks		Media(cm)
AH1	206,45	A	0,92
AH0	350,85	B	1,35
AH2	455,99	C	1,74
<u>AH3</u>	<u>476,71</u>	C	<u>1,83</u>

Referencias: A: agua; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados del análisis, se observó que cuando las semillas no fueron inoculadas: (1) las hormonas H3 y H2 produjeran efecto estadísticamente significativo con respecto a H0 y H1; (2) se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre la H1 y el control H0; (3) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre la H3 y H2. Así, se puede resumir que el tratamiento hormonal que presentó un aumento fue el ácido giberélico, seguido de las citocininas. Por otro lado, se observó un menor efecto con agregado de auxinas, por lo que esta hormona modificaría la longitud del coleoptile. Desde el punto de vista biológico el ácido giberélico o las citocininas cuando son aplicadas de manera exógena, determinarían una tendencia a incrementar la longitud del coleoptile.

En el caso de las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 3**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis para semillas inoculadas, para la variable longitud del coleoptile.

Test *a posteriori*

Trat.	Ranks		Media (cm)
IH1	324,73	A	1,81
IH2	372,38	B	2,11
IH3	395,12	B	2,23
<u>IH0</u>	<u>397,77</u>	<u>B</u>	<u>2,21</u>

Referencias: I: inoculado; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados del análisis, se observó que cuando las semillas fueron inoculadas: (1) se encontraron evidencias estadísticamente significativa de que la hormona H1 produjo efecto con respecto a H0, H2 y H3; (2) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre la H2, H3 y H0. El tratamiento que presentó un efecto positivo fue el control, seguido del tratamiento con citocininas o giberelinas, mientras que en las auxinas se observó un efecto más pequeño. Por lo tanto la inoculación sin adición de hormonas podría existir una tendencia a promover el crecimiento del coleoptile.

En resumen el tratamiento de las semillas con inoculante o sin inocular, la aplicación de giberelinas o citocininas generan efectos positivos sobre la longitud del coleoptile a diferencia de la aplicación exógena de auxinas. Desde el punto de vista biológico, esto determinaría que la inoculación con *A. brasilense* Az39 existiría una tendencia de promover el crecimiento del coleoptile ya que no se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de giberelinas o citocininas pero si se comprobó un efecto antagónico por la aplicación combinada con auxinas.

5.1.3 Longitud de la radícula

La Figura 9 y Tabla 5 del **Anexo 4** representan la longitud de la radícula (cm) en semillas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39, más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 7 días desde la siembra.

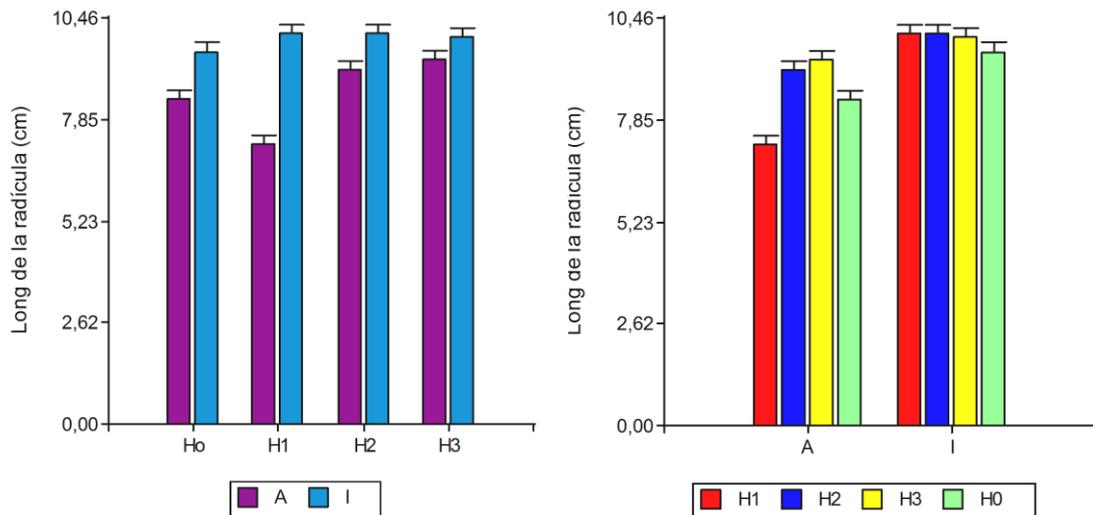


Figura 9: Longitud de la radícula (cm) en semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense* Az39 (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en la Figura 9 y Tabla 5 del **Anexo 4**, cuando las semillas fueron inoculadas y tratadas con fitohormonas existe una tendencia de mayor crecimiento en cuanto a la longitud media de la radícula, con valor medio cercano a 10 cm que aquellas que no fueron inoculadas. Sobre éstas en particular, la adición de giberelinas o citocininas, se observó un incremento de la longitud, con una media cercana a 9,2 cm y en comparación con control sin adición exógena de hormonas, que arrojó un valor de 8,36 cm. Por otro lado, la adición exógena de auxinas a semillas sin inocularse observó una marcada reducción del crecimiento de este órgano con 7,23 cm.

La Figura 10 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de maíz, luego de 7 días de crecimiento.

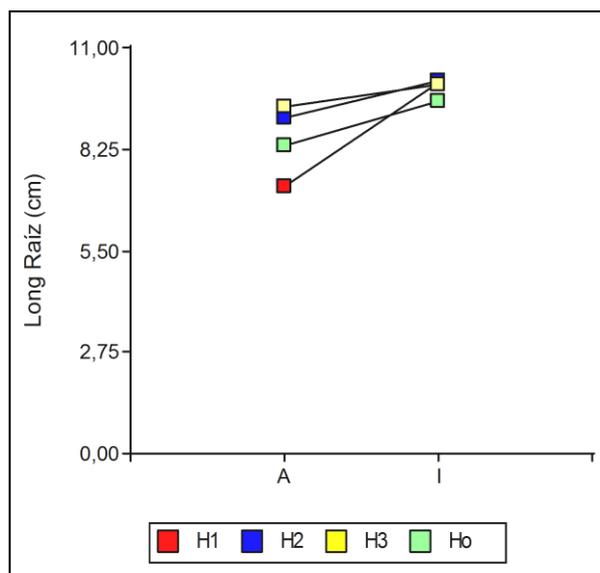


Figura 10: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud radical (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Los puntos de color indican la media del tratamiento. Ref.: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3:citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 10 se observa que las hormonas no se comportan de la misma manera al aplicar inoculantes. Cuando los tratamientos fueron inoculados, se observa una tendencia de aumento de la longitud media de la raíz, pero sin evidenciarse una diferencia por la adición exógena de alguna de las hormonas (H1, H2 y H3), con respecto a aquellos tratamientos sin inocular. Lo que muestra que existe una tendencia que la inoculación promoviera el crecimiento radicular no haciendo falta la aplicación exógena de alguna hormona. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se produjo mayor longitud media con la adición exógena de giberelinas y citocininas, en comparación con el control. En contrapartida, la menor longitud se observó cuando se le agregó auxinas. Lo que muestra que la adición exógena de giberelinas y citocininas, sin la inoculación tendría un efecto promotor con el crecimiento. En cuanto a la mayor tendencia de aumento correspondió al tratamiento con adición exógena de auxinas (H1:39%); mientras que en segundo lugar se observó una tendencia para el control sin adición de hormonas (H0: 14%) y finalmente, para el caso de la adición exógena de giberelinas (H2: 10%) y citocininas (H3: 6%).

Los resultados obtenidos en el **Anexo 4** determinaron que en los tratamientos sin inocular (A) se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjera un efecto diferente ($p=0,0001$). En cuanto a las semillas inoculadas (I) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de algunas de las hormonas fuera distinto ($p=0,6145$).

Para determinar que fitohormona determinó un efecto significativo en las semillas sin inocular, se realizó una prueba *a posteriori*.

En este caso, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 4**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis, para semillas sin inocular, para la variable longitud radical

Test *a posteriori*

<u>Trat.</u>	<u>Ranking</u>		<u>Media (cm)</u>
AH1	275,59	A	7,23
AH0	363,19	B	8,36
AH2	410,93	C	9,11
<u>AH3</u>	<u>440,29</u>	<u>C</u>	<u>9,39</u>

Referencias: A: agua ; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a estos resultados, se observó que cuando las semillas no fueron inoculadas: (1) las hormonas H2 y H3 producen un efecto estadísticamente significativa diferente con respecto a las hormonas H1 y el control (H0); (2) el efecto del control (H0) es estadísticamente diferente del efecto producido por la hormona H1; (3) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre H2 y H3. El tratamiento de las semillas no inoculadas con giberelinas o citocininas generaron un efecto positivo sobre el crecimiento en longitud de la radícula, que se diferenciaron estadísticamente del tratamiento control o de la aplicación exógena de auxinas, que redujo significativamente el desarrollo de la longitud de este órgano.

Así, se puede resumir que el tratamiento hormonal que modificó la longitud de la raíz fue el de la aplicación exógena de auxinas, que redujo significativamente su tamaño. Por otro lado, la adición de citocininas o giberelinas determinaron una mayor longitud de la raíz.

En el caso de las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 4**; el cual indica que no se encontraron evidencias estadísticas entre los efectos producidos por las hormonas cuando las semillas son tratadas con inoculante, $p=0,6145$. Por lo que podríamos determinar que la

inoculación de las semillas sin el agregado de fitohormonas sería suficiente para producir efectos sobre este parámetro.

En resumen, el tratamiento de las semillas sin inoculante con la aplicación de giberelinas o citocininas sería suficiente para promover un efecto sobre el crecimiento en la longitud de la radícula a diferencia de la aplicación exógena de auxinas que redujo significativamente el desarrollo de la longitud de este órgano. En cuanto a la inoculación con *A. brasilense* Az39 sería suficiente para promover el crecimiento radical ya que no se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de alguna fitohormona.

5.1.4 Longitud total

La Figura 11 representa la variable longitud total (cm) en semillas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39, más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 7 días desde la siembra.

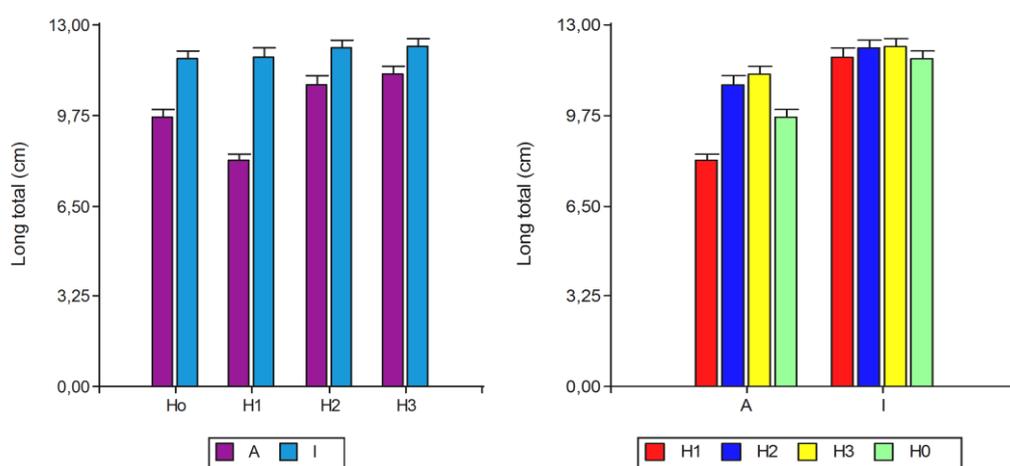


Figura 11: Evaluación de la Longitud total (cm) en semillas de maíz embebidas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en la Figura 11 y en la Tabla 7 del **Anexo 5**, cuando las semillas fueron inoculadas mostraron una mayor respuesta de crecimiento que aquellas no inoculadas, con un aumento de la longitud total cercano a una media de 12 cm. De manera particular, en los tratamientos inoculados, la adición de cualquier fitohormona no se diferenció del control

sin adición exógena (IH0: 11,7 cm; IH1: 11,8 cm). Con respecto a las semillas sin inocular, el tratamiento con adición de auxinas AH1 (8,1 cm) tuvo un marcado efecto de reducción del crecimiento, con respecto al control o a las semillas tratadas con giberelinas (H2: 10,8 cm) o citocininas (H3: 11,2 cm), que en ambos casos fueron capaces de aumentar el valor de la variable en relación con el mismo tratamiento (H0: 9,7 cm).

En la Figura 12 representan los valores medios de la variable longitud del coleoptile y de la parte radical en semillas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 7 días desde la siembra.

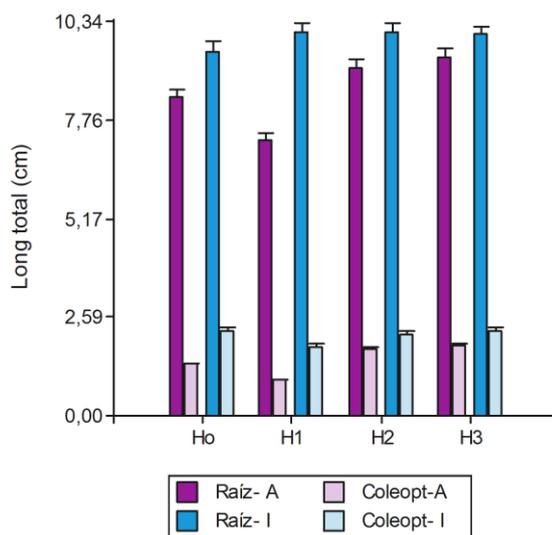


Figura 12: Evaluación de la Longitud (cm) del coleoptile y de la parte radical en semillas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3) luego de 7 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en esta Figura 12 y para resumir los datos anteriormente analizados, se observa que: (1) la adición de inoculantes formulados con *A. brasilense* Az39 aumentó la longitud aérea y radical de semillas de maíz; (2) la adición de fitohormonas en el caso de las semillas sin inocular, solo promovió el crecimiento aéreo y radical por la adición exógena de giberelinas y citocininas; mientras que en el caso de las auxinas, se determinó un efecto opuesto; (3) la inoculación junto con la adición exógena de cualquier fitohormona, si bien favorecería ambas variables en comparación con los controles, no determinarían un efecto sinérgico de ambos tratamientos.

La Figura 13 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de maíz, luego de 7 días de crecimiento.

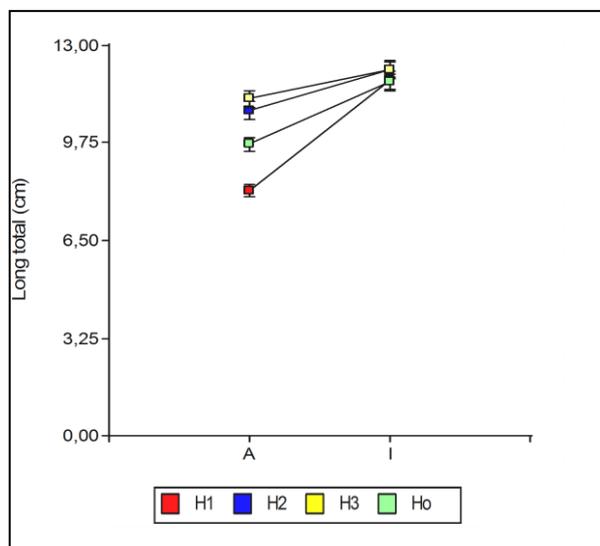


Figura 13: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud total (cm) de semillas de maíz luego de 7 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; I: inoculado; A: agua.

En todas las semillas inoculadas, como se observa en la Figura 13, una tendencia de aumento de la longitud media total, no presentando diferencia entre las hormonas (H1, H2 y H3) con respecto a aquellos tratamientos sin inocular. Esto muestra que hay una tendencia que la inoculación genera un mayor impacto en el crecimiento a nivel de la longitud total sin que sea necesaria la aplicación exógena de alguna fitohormona. Por otro lado, en las semillas sin inocular se obtuvo una mayor longitud media total por la adición exógena de giberelinas o citocininas, en comparación con el control y en contrapartida, la adición exógena de auxinas determinó la menor longitud. La mayor tendencia de aumento por inoculación correspondió al tratamiento con adición exógena de auxinas (H1:45%); mientras que en segundo lugar se observó en el tratamiento control (H0; 20%). Finalmente, la menor tendencia de aumento, se observó en el caso de la adición exógena de giberelinas (H2: 12%) y citocininas (H3: 9%).

Los resultados obtenidos en el **Anexo 5** determinaron que en los tratamientos sin inocular (A) se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjo un efecto diferente ($p=0,0001$). En cuanto a las semillas inoculadas (I), no se encontraron evidencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de algunas de las hormonas es distinto ($p=0,7486$). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en las semillas tratadas con agua (A), se realizó una prueba *a posteriori*.

En el caso de las semillas sin inocular, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 5**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis, para semillas sin inocular, para la variable longitud total.

Test *a posteriori*

Trat.	Ranks		Media (cm)
AH1	257,31	A	8,16
AH0	359,28	B	9,71
AH2	420,42	C	10,85
AH3	452,99	C	11,22

Referencias: A: agua ; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a estos resultados, se observó que cuando las semillas no fueron inoculadas: (1) se encontraron evidencias estadísticamente significativa entre el efecto producidos por las hormonas H2 y H3 con respecto al efecto producido por la hormona H1 y el control H0; (2) se encontraron evidencias estadísticamente significativa entre los efectos producidos por la hormona H1 y el control H0; (3) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas entre H2 y H3. La aplicación de citocininas o giberelinas en semillas sin inocular mostró efectos positivos sobre el crecimiento, que se diferenciaron estadísticamente del tratamiento control o de la aplicación exógena de auxinas, que mostró un efecto opuesto.

En el caso de las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39, el resultado del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 5**; el cual indica que no se encontraron evidencias estadísticas entre los efectos producidos por las hormonas cuando las semillas son tratadas con inoculantes, $p= 0,7486$. Por lo que pareciera ser que la inoculación de las semillas sin el agregado de fitohormonas sería suficiente para producir efectos sobre este parámetro.

5.2 Ensayo de crecimiento temprano

5.2.1 Número de plántulas emergidas y número de hojas

La Figura 14 y Tabla 9 del **Anexo 6**, representan el número de plántulas emergidas en semillas inoculadas y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, a los 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

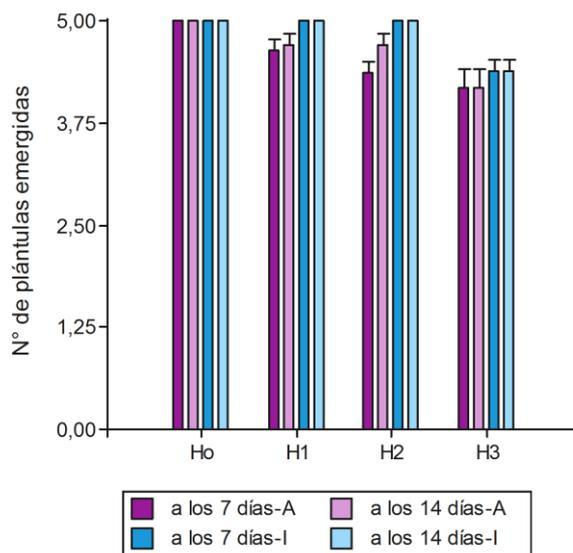


Figura 14: Número de plántulas de maíz emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 y 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

En la Figura 14 se puede observar que se obtuvo mayor número de plántulas emergidas cuando las semillas fueron inoculadas (I-barras celestes) con respecto a aquellas sin inocular (A-barras lilas). Tanto en los tratamientos inoculados como no inoculados, la menor cantidad de plántulas se obtuvo en semillas tratadas con citocininas, con un valor medio de 4,3 plántulas emergidas; sin embargo este efecto pareció revertirse levemente por efecto de la inoculación. Para el caso de las semillas sin inocular, la adición de cualquiera de los metabolitos, redujo la respuesta de emergencia, en comparación con el control sin tratar (AH0). En ellos, el tratamiento que menor valor medio de 4,17 de plántulas emergidas presentó fue aquel que recibió la adición exógena de citocininas (AH3).

En resumen, se puede observar que la aplicación de cualquier hormona en plántulas de maíz sin inocular, disminuyó el número de plántulas emergidas, siendo la aplicación de citocininas la que menor número de plántulas presentó. Por otro lado, la aplicación de

fitohormonas en semillas inoculadas, determinó un efecto de opuesto al anterior, siendo todos tratamientos inoculados los que en promedio, mayor número de plántulas presentaron. Por lo tanto, hay una tendencia que la adición de fitohormonas a las semillas de maíz producen una reducción del número de plántulas establecidas, que parcialmente sería revertida por efecto de la inoculación.

Las Figura 15 -16 – 27 y en Tabla 10 del **Anexo 6** representan el número de hojas por plántula en semillas de maíz inoculado y sin inocular, más la adición exógena de fitohormonas, a los 7 y 14 días desde la siembra y en condiciones controladas de cultivo.

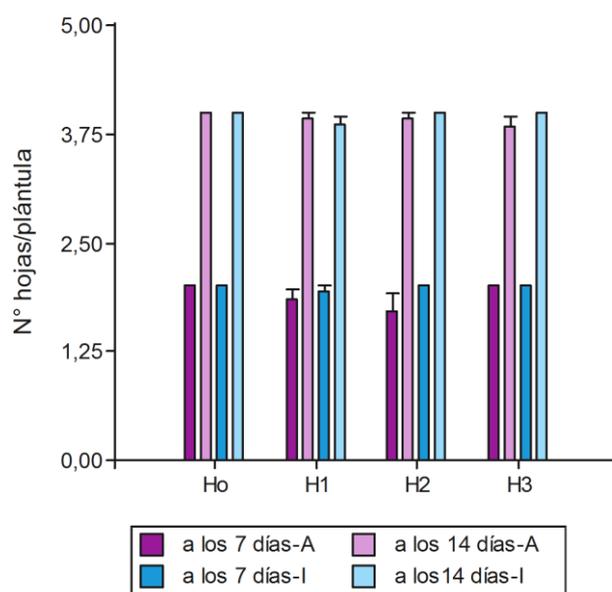


Figura 15: Número de hojas por plántula de maíz inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 y 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

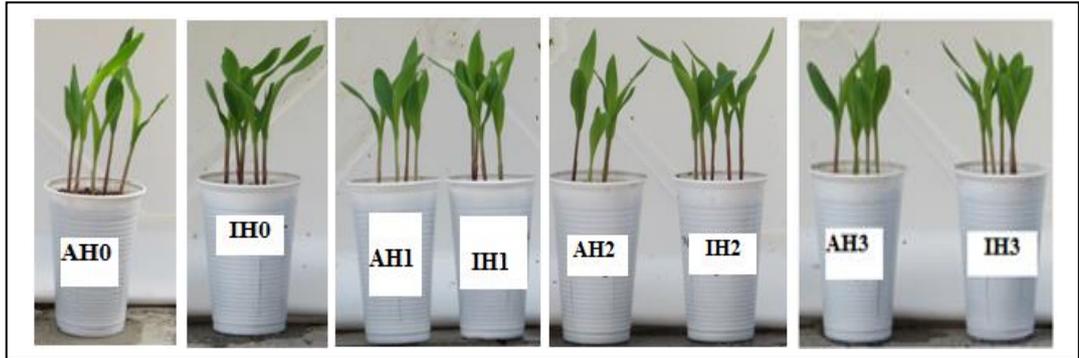


Figura 16: Plántulas de maíz emergidas inoculadas o no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 7 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua.

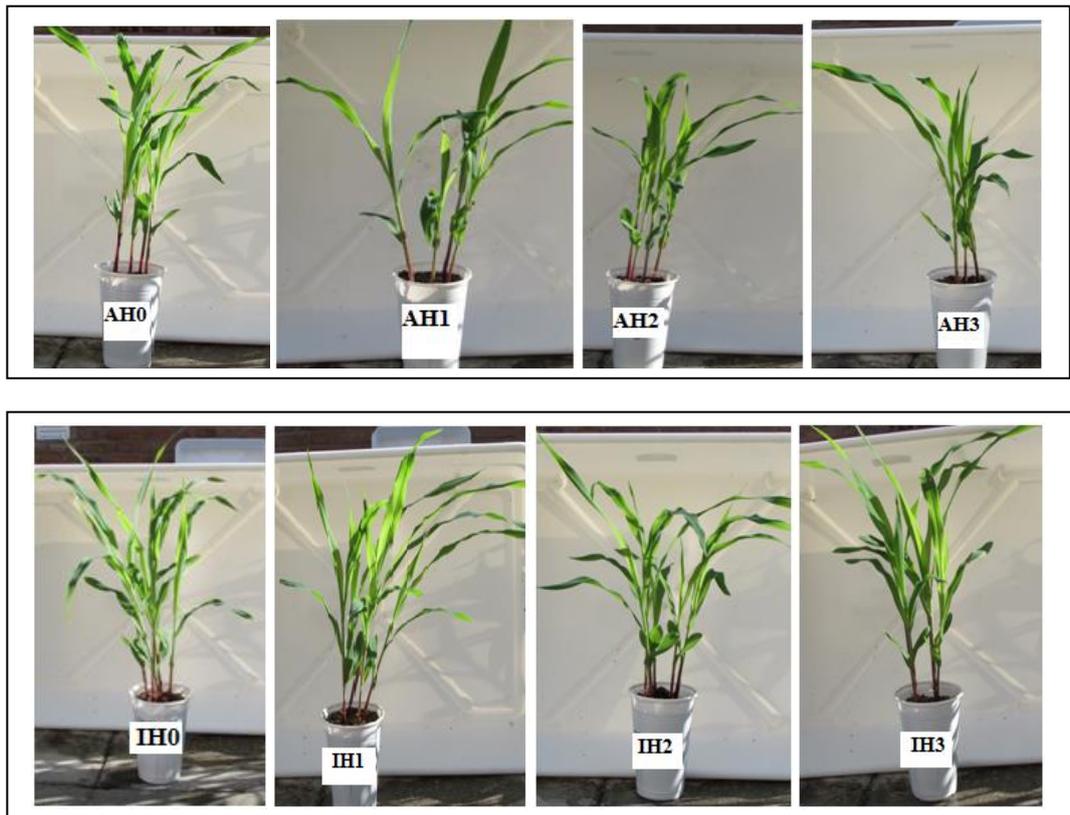


Figura 17: Plántulas de maíz emergidas no inoculadas (arriba) e inoculadas (abajo) y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado; A: agua.

En las Figuras 15, 16 y 17 se puede observar que la mayoría de las plántulas a los 7 días de crecimiento presentaron 2 hojas desplegadas/ plántula excepto en los tratamientos AH2 que presentaron un valor medio de 1,7 hojas/plántula. En el caso de AH1 presentaron un valor medio de 1,8 hojas/plántula y en el caso de IH1 un valor medio de 1,9 hojas/plántula. Por otro lado, a los 14 días aumentó el número de 3 a 4 hojas desplegadas/plántula en todos los tratamientos. Considerando la aparición de hojas, como un parámetro relacionado con la velocidad de crecimiento de esta especie (estado fenológico), se puede decir que hay una tendencia que la aplicación de auxinas y giberelinas en plántulas de maíz sin inocular, presente un retraso en la velocidad de crecimiento en las condiciones evaluadas en este ensayo. Por otro lado, la aplicación de auxinas en semillas inoculadas, se observó un menor número de hojas, en comparación con el resto de los tratamientos del experimento.

5.2.2 Longitud aérea

La Figura 18 y Tabla 11 del **Anexo 7**, representan la variable longitud aérea en semillas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 14 días desde la siembra.

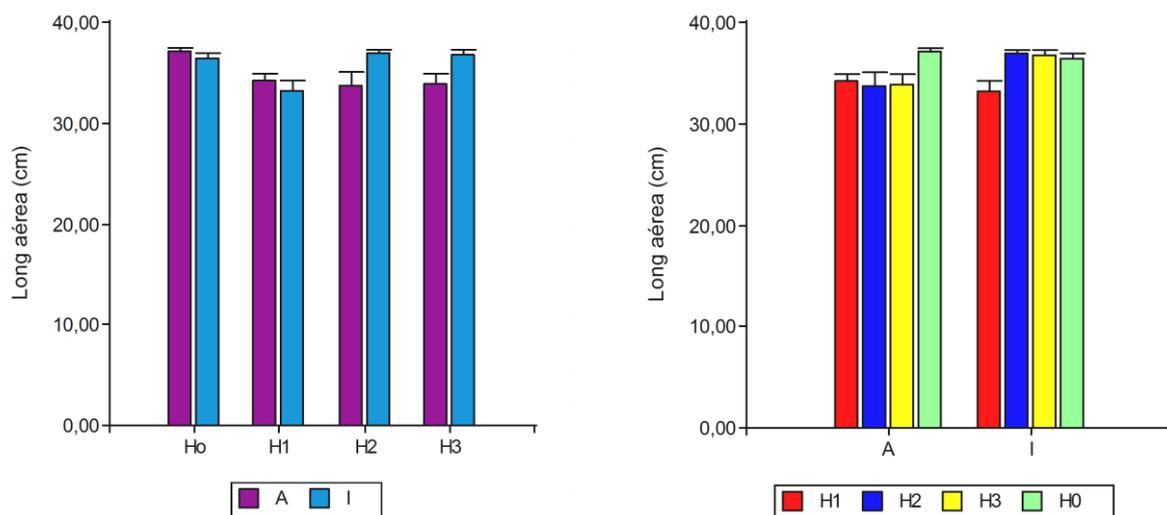


Figura 18: Evaluación de la longitud aérea de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

En cuanto a esta variable en la Figura 18, se observa que las semillas inoculadas tuvieron un aumento de la longitud aérea con adición exógena de giberelinas (H1: 36,93 cm) y citocininas (H3: 36,77 cm) en relación con el control sin adición exógena de fitohormonas

(H0: 36,4 cm). De manera particular, la adición de auxinas (H2: 33,27 cm) se observó una reducción de la variable en comparación con el control o a las semillas tratadas con giberelinas o citocininas. Con respecto a las semillas sin inocular, el tratamiento con adición de auxinas AH1 (34,18 cm), giberelinas (H2: 33,75 cm) y citocininas (H3: 33,92 cm), tuvieron un efecto de reducción del crecimiento, con respecto al control sin adición exógena de fitohormonas (HO: 37,03 cm) que fue capaz de aumentar el valor de la variable.

En la siguiente Figura 19 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de maíz luego de 14 días de crecimiento.

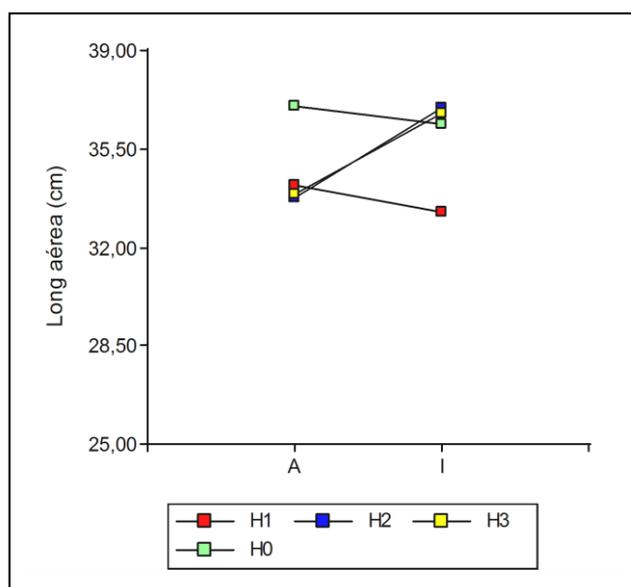


Figura 19: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud aérea (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3:citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 19 se observa que a nivel de muestra una tendencia de aumento de la longitud media aérea cuando son tratadas con giberelinas (H2) y con citocininas (H3). No ocurre lo mismo en las plántulas sin hormonas (H0) o tratadas con auxinas (H1) que produjeron una longitud media aérea similar tanto con plántulas inoculadas como sin inocular, teniendo una tendencia negativa. Esto muestra que hay una tendencia que la inoculación y la adición exógena de giberelinas o citocininas generen un mayor impacto en el crecimiento de la parte aérea, al igual que el control sin hormonas. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular la menor longitud se manifestó cuando se le agregó alguna fitohormona. Lo que podría esperarse que la adición exógena de auxinas, giberelinas o

citocininas, que exista un efecto negativo sobre el crecimiento temprano de maíz. La mayor tendencia de aumento por la inoculación correspondió al tratamiento con adición exógena de giberelinas (H2:9,4%); mientras que en segundo lugar se observó en la adición exógena de citocininas (H3: 8,4%). Finalmente, la menor tendencia y negativa, se observó en el caso de la adición exógena de auxinas (H1: 2,7 % menos) y sin adición de hormonas (H0: 1,7% menos).

Los resultados obtenidos en el **Anexo 7** determinaron que en ambos tratamientos (A o I) se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjo un efecto diferente ($p=0,0181$, $p=0,0021$). Para determinar que fitohormona se comportó mejor en cada caso particular, se realizó una prueba *a posteriori*.

En el caso de las semillas sin inocular, los resultados del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 7**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis para plántulas sin inocular, para la variable longitud aérea

Test *a posteriori*

<u>Trat.</u>	<u>Ranks</u>		<u>Media (cm)</u>
AH3	22,42	A	33,92
AH1	23,00	A	34,18
AH2	26,07	A	33,75
<u>AH0</u>	<u>38,93</u>	<u>B</u>	<u>37,03</u>

Referencias: A: agua ; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a estos resultados, se observó que cuando las semillas no fueron inoculadas: (1) se encontraron evidencias estadísticamente significativas entre el efecto producido por el control H0 y el efecto producidos por las hormonas H1, H2 y H3; (2) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre las hormonas H1, H2 y H3. De acuerdo al análisis anterior se puede concluir que hay una tendencia que el efecto del tratamiento de semillas no inoculadas con alguna fitohormona

generaría un efecto en la reducción sobre el crecimiento en la parte aérea de la plántula y de manera particular, la adición de citocininas o auxinas reducirían más aún su tamaño.

En el caso de las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39, los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis se resumen en el **Anexo 7**; mientras que la prueba *a posteriori* se presentan a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultado del contraste *a posteriori* de la prueba de Kruskal-Wallis para plántulas inoculadas, para la variable longitud aérea.

Test *a posteriori*

<u>Trat.</u>	<u>Ranks</u>		<u>Media (cm)</u>
IH1	15,37	A	33,27
IH0	32,17	B	36,4
IH3	35,31	B	36,77
<u>IH2</u>	<u>35,93</u>	<u>B</u>	<u>36,93</u>

Referencias: I: inoculadas; H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados se observó que cuando las semillas fueron inoculadas: (1) se encontraron evidencias estadísticamente significativa de que la hormona H1 produjo efecto diferente con respecto a H2, H3 y al control H0;(2) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas en los efectos producidos entre H2, H3 y el control H0. Por lo tanto, la inoculación a base de *A. brasilense* Az39 y la aplicación de giberelinas o citocininas en semillas inoculadas mostró efectos positivos sobre el crecimiento, que se diferenciaron estadísticamente de la aplicación exógena de auxinas, que mostró un efecto opuesto.

Así, podemos resumir que el tratamiento de las semillas sin inocular con la adición exógena de auxinas, giberelinas o citocininas muestran un efecto en la reducción sobre el crecimiento en la parte aérea de la plántula. En cuanto a los tratamientos inoculados con *A. brasilense* Az39 hay una tendencia de generar un mayor crecimiento de la parte aérea, ya que no se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de giberelinas y citocininas pero si se comprobó un efecto antagónico por la aplicación combinada con auxinas.

5.2.3 Longitud radical

La Figura 20 y Tabla 14 del **Anexo 8**, representan la variable longitud radical en plántulas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 14 días desde la siembra.

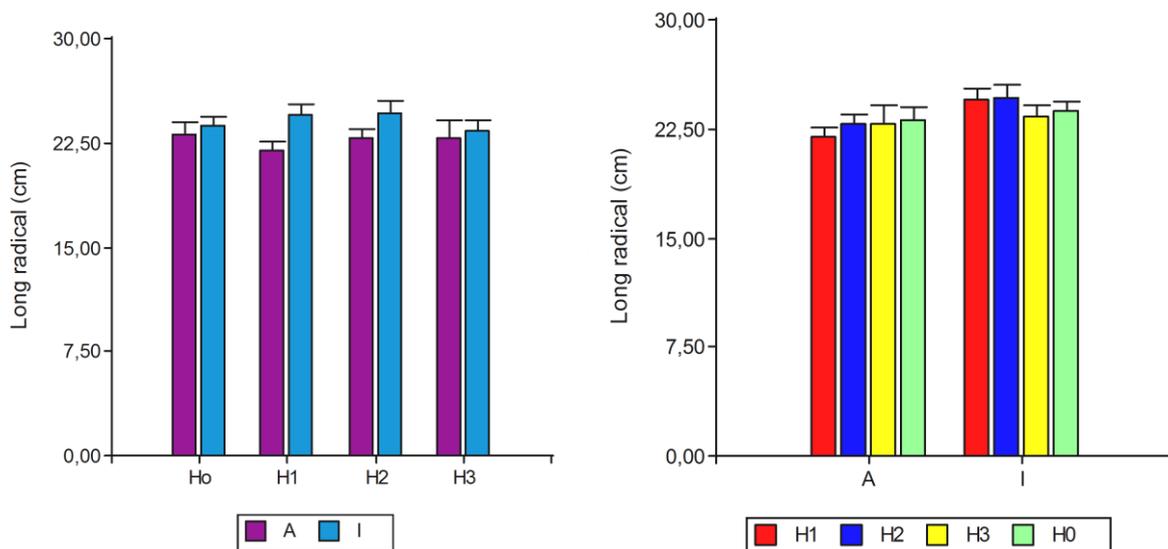


Figura 20: Evaluación de la Longitud radical de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *Azospirillum* AZ39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

En la Figura 20, se observa que las semillas inoculadas mostraron una tendencia de aumento en la longitud media radical con adición de giberelinas (H2: 24,6 cm) y auxinas (H1: 24,5 cm) en relación con el control sin adición exógena de fitohormonas (H0: 23,7 cm). De manera particular, la adición de citocininas (H3: 23,3 cm) se observó una pequeña reducción de la variable en comparación con el control o a los tratamientos con adición de giberelinas y auxinas. Con respecto a las semillas sin inocular, el tratamiento con adición de auxinas (H1: 21,96 cm), giberelinas (H2: 22,82) o citocininas (H3: 22,88 cm), se observó una reducción del crecimiento, con respecto al control sin adición exógena de fitohormonas (H0: 23,07 cm).

En la siguiente Figura 21 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en las semillas de maíz luego de 14 días de crecimiento.

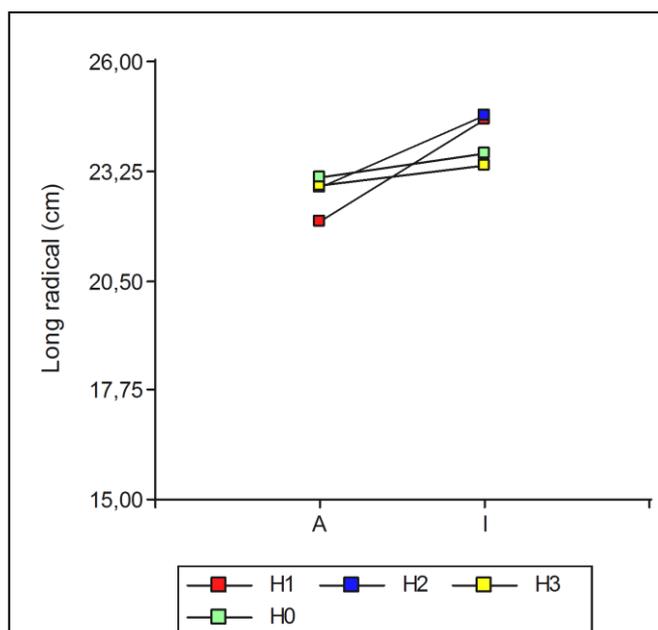


Figura 21: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud radical (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3:citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 21 se observa a nivel de la muestra que la interacción con las auxinas (H1), cuando las plántulas fueron inoculadas la longitud media radical fue mayor (IH1) en comparación a las plántulas que no fueron inoculadas (AH1), tal como se puede observar en la Tabla 14 del **Anexo 8**. En los tratamientos inoculados, se evidencia una diferencia mayor por la adición exógena de auxinas y giberelinas en comparación con el control inoculado. Esto muestra que la inoculación junto con la adición de auxinas y giberelinas que existe una tendencia de promover el crecimiento de la parte radical en comparación con el control. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se observó mayor longitud media sin la adición exógena de fitohormonas. En contrapartida, la menor longitud de la parte radical se manifestó cuando se le agregó auxinas. En cuanto a la mayor tendencia de aumento correspondió al tratamiento con adición exógena de auxinas (H1: 11,7 %); mientras que en el resto de los casos, la menor tendencia, se observó en la adición exógena de giberelinas (H2: 3 %), de citocininas (H3: 2,1%) y sin adición de hormonas (H0: 2,7%).

A excepción de las otras variables, en este caso, se pudo verificar ambos supuestos de Normalidad ($p= 0.7785$) y Homogeneidad de varianza ($p=0.4833$), se realizó el ANOVA para la variable en estudio. Los resultado en el **Anexo 8** muestran que no se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que existe interacción entre el tipo de inoculación (A o I) y tipo de hormonas ($p=0,5541$), por lo que se analizó cada factor por separado, donde no se encontraron evidencias estadísticas que indiquen que existe

diferencias entre las hormonas ($p=0,9031$) y se encontraron evidencias estadísticamente significativas que el tipo de inoculación (A o I) se comportan diferente ($p= 0,0210$), se realizó un test de comparaciones de medias con la prueba de Duncan que se encuentran en el **Anexo 8**. En resumen, se comprobó estadísticamente diferencia entre el tipo de inoculación, ya que se detectó que la longitud media radical de las semillas tratadas con Agua es diferente de la longitud media de las semillas tratadas con Inoculante como se observa en la Figura 22, por lo tanto se comprobó estadísticamente un efecto positivo de inocular a las semillas con *A. brasilense* Az39.

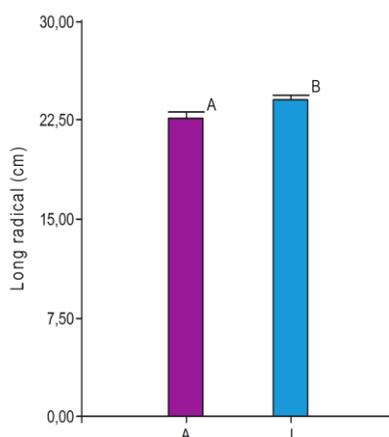


Figura 22: Longitud radical de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *Azospirillum* Az39, luego de 14 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Así, se puede resumir desde el punto de vista biológico, y a nivel del experimento que el agregado de auxinas y giberelinas tratadas con inoculantes y la inoculación de las semillas con *A. brasilense* Az39 sin el agregado de fitohormonas serían suficientes para promover el crecimiento de la parte radical.

5.2.4 Longitud total

La Figura 23 y Tabla 15 del **Anexo 9**, representan la variable longitud total en plántulas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 14 días desde la siembra

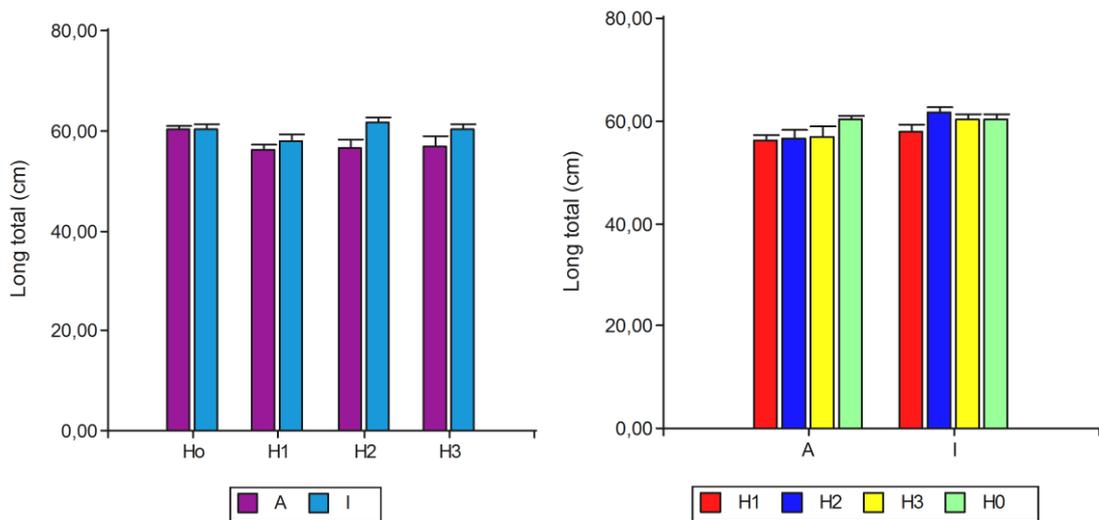


Figura 23: Evaluación de la longitud total de plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en la Figura 23 y en la Tabla 15 del **Anexo 9**, cuando las semillas fueron inoculadas se observó una tendencia de aumento en el crecimiento que aquellas no inoculadas, con un aumento de la longitud total cercano a una media de 60 cm. De manera particular, en los tratamientos inoculados, con la adición de auxinas mostró una tendencia a disminuir la longitud que se diferenció del control sin adición exógena (IH0: 60,1 cm; IH1: 57,8 cm). Con respecto a las semillas sin inocular, el tratamiento con adición de auxinas AH1 (56,14 cm) se observó una reducción del crecimiento, con respecto al control o a las semillas tratadas con giberelinas (H2: 56,57 cm) o citocininas (H3: 56,79 cm), que en ambos casos no fueron capaces de aumentar el valor de la variable en relación con el mismo tratamiento (HO: 60,1cm).

En la Figura 24 representan los valores medios de la variable longitud de la parte aérea y de la parte radical en plántulas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 14 días desde la siembra.

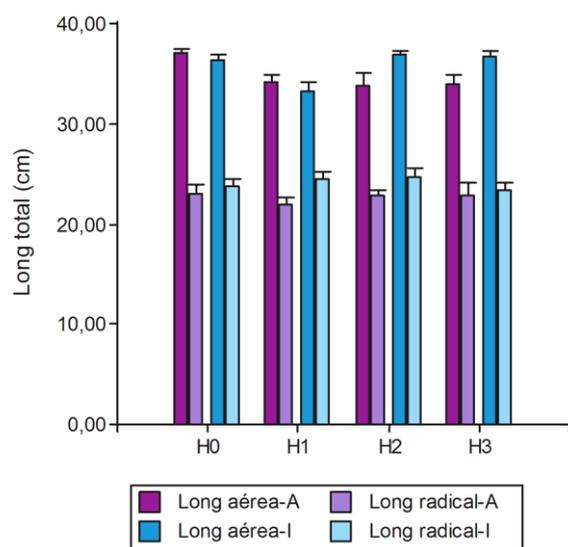


Figura 24: Longitud total (gr) de la parte aérea y radical en plántulas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3). La altura de las barras representa la media \pm el error estándar de la media.

Como se observa en esta Figura 24 y para resumir los datos anteriormente analizados se podría esperar que (1) la adición de inoculantes formulados con *A. brasilense* Az39 muestra una tendencia de generar una mayor longitud aérea y radical de semillas de maíz; (2) la adición de fitohormonas en el caso de las semillas sin inocular, hay una tendencia de mayor impacto en el crecimiento aéreo por la adición exógena de auxinas; (3) al igual que la inoculación junto con la adición exógena de cualquier fitohormona, mientras que en el caso de las auxinas, se determinó un efecto opuesto; si bien favorecería ambas variables en comparación con los controles, no determinarían un efecto sinérgico de ambos tratamientos.

En la Figura 25 y 26 se observa de manera ilustrativa plántulas de maíz sin inocular o inoculadas con *A. brasilense* Az39 más la adición exógena de fitohormonas en condiciones controladas de cultivo, luego de 14 días desde la siembra

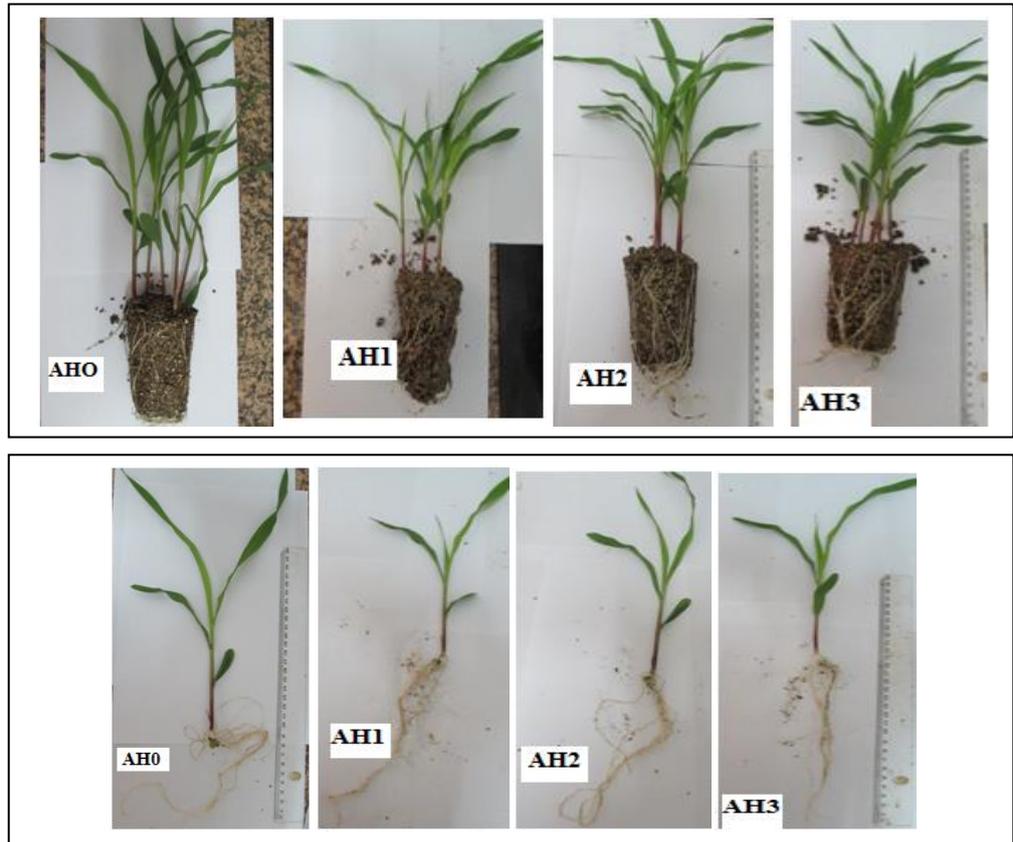


Figura 25: Plántulas de maíz emergidas no inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Arriba: todas las plantas del tratamiento. Abajo: plantas individuales. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas; A: agua.

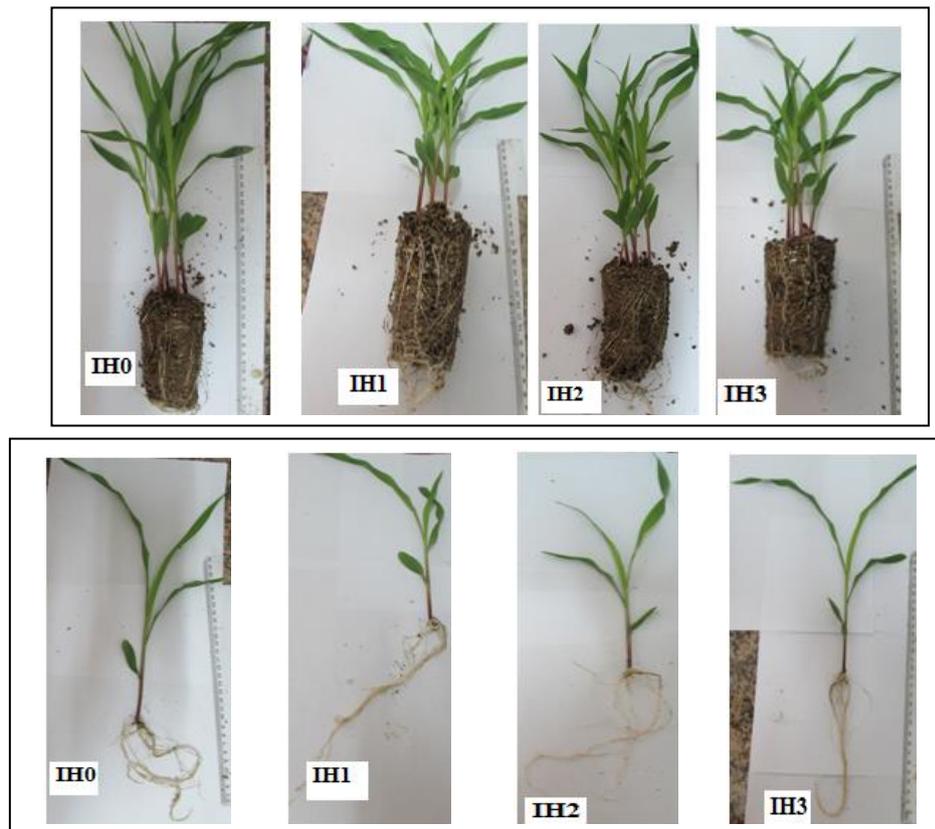


Figura 26: Plántulas de maíz emergidas inoculadas y tratadas con diferentes soluciones de hormonas, a los 14 días de crecimiento. Arriba: todas las plantas del tratamiento. Abajo: plantas individuales. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, I: inoculado.

La Figura 27 representa la interacción de los tratamientos de inoculación y aplicación de hormonas en plántulas de maíz.

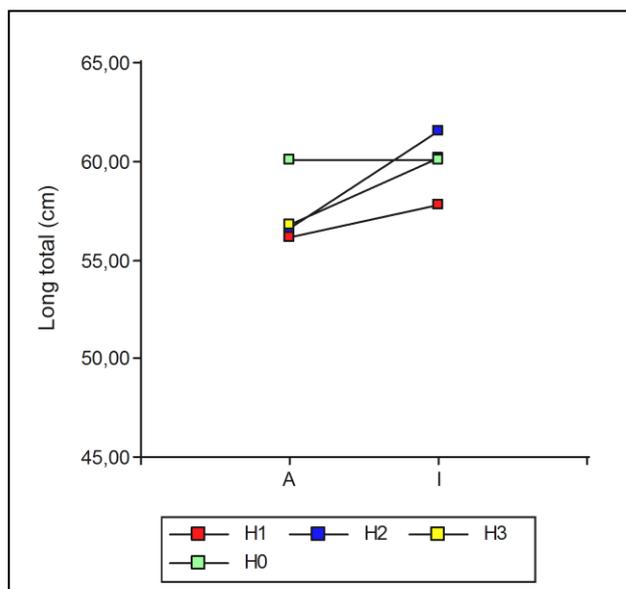


Figura 27: Gráfico de interacción entre hormonas e inoculación, para la variable longitud total (cm) en plántulas de maíz luego de 14 días de crecimiento. Los puntos indican la media por tratamiento. Referencias: H0: sin el agregado de hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3:citocininas; I: inoculado; A: agua.

En la Figura 27 de manera en general se observa que las hormonas no se comportan de la misma manera al aplicar inoculantes. Cuando los tratamientos fueron inoculados, se observa una tendencia de aumento de longitud total con la adición exógena de giberelinas (H2) y citocininas (H3) mostrando diferencia con el control (H0). Lo que muestra que la adición de giberelinas y citocininas, con la inoculación tendría una tendencia a generar un efecto positivo sobre el parámetro evaluado. Por otro lado, en los tratamientos sin inocular se observó una mayor longitud total con el control sin la adición de hormonas, manteniendo el mismo valor que el tratamiento inoculado. En contrapartida, la menor longitud total se manifestó cuando se le agregó cualquier fitohormona. En cuanto a la mayor tendencia de aumento correspondió al tratamiento con adición exógena de giberelinas (H2: 8,8%), mientras que en segundo lugar se observa el tratamiento con adición de citocininas (H3: 5,91%), seguido con la adición de auxinas (H1: 2,95%). Para el caso del tratamiento control sin adición de hormonas se determinó que no hubo tendencia de aumento debida a la inoculación.

Los resultados descriptos en el **Anexo 9** determinaron que para el tratamiento con fitohormonas, en ambos casos (A o I) no se encontraron evidencias estadísticamente significativas de que al menos una hormona produjera un efecto diferente ($p=0.1380$;

p=0.2741). En resumen, podemos indicar que no se encontraron evidencias estadísticas entre los dos tipos de inoculación, ni entre las hormonas.

Así, podemos resumir que a nivel de ensayo, el agregado de giberelinas y citocininas tratadas con inoculantes y la inoculación de las semillas sin el agregado de fitohormonas existiría una tendencia de producir un efecto sobre este parámetro.

En la Figura 28 y en la Tabla 16 se resumen los principales resultados de este trabajo para semillas de maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de las siguientes fitohormonas: auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3).

Tabla 16: Resumen de los resultados presentados en maíz tratadas con agua (A) o inoculadas (I) con *A. brasilense* Az39 y tratadas de manera exógena e individual con auxinas, giberelinas y citocininas

ENSAYO DE GERMINACIÓN [I]	
1. BACTERIA	<p style="background-color: #d9ead3; padding: 2px;"><u>Germinación:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Promoción de la germinación por la inoculación con Az39. Adición exógena de cualquier hormona disminuyó el porcentaje de germinación y fue más severo con citocininas. Sinergismo por la inoculación y adición de auxinas/giberelinas. <p style="background-color: #d9ead3; padding: 2px;"><u>Long. del Coleoptile:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Promoción del crecimiento por la inoculación con Az39. Mayor longitud por adición de giberelinas y citocininas. Menor longitud por la adición de auxinas. La inoculación y adición de auxinas modifica este parámetro (menor longitud). <p style="background-color: #d9ead3; padding: 2px;"><u>Long. radical:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Tendencia de aumento por la inoculación con Az39. Mayor longitud por adición de giberelinas/citocininas. Menor longitud por la adición de auxinas. Tendencia de aumento por la adición de hormonas. <p style="background-color: #d9ead3; padding: 2px;"><u>Long. Total:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Mayor crecimiento por la inoculación con Az39. La aplicación de citocininas o giberelinas generó efectos positivos sobre el crecimiento. La aplicación exógena de auxinas mostró un efecto opuesto. Tendencia de aumento por la adición de cualquier hormona.
<i>A. brasilense</i> Az 39 (I)	
2. HORMONAS	
Auxinas (H1)	
Giberelinas (H2)	
Citocininas (H3)	
3. B + H	
Az 39 (I) + Citocininas (H3)	
Az 39 (I) + Auxinas (H1)	
Az 39 (I) + Giberelinas (H2)	

ENSAYO DE CRECIMIENTO TEMPRANO [II]

<p>1. BACTERIA</p> <p><i>A. brasilense</i> Az 39 (I)</p>	<p><u>N° de plántulas emergidas:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mayor número de planta por la inoculación con Az39. 2. Disminución por la adición de cualquier hormona y mayor severidad por citocininas. 3. Tendencia de aumento por la adición de cualquier hormona.
<p>2. HORMONAS</p> <p>Auxinas (H1)</p> <p>Giberelinas (H2)</p> <p>Citocininas (H3)</p>	<p><u>Crecimiento aéreo:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tendencia de disminución por la inoculación con Az39. 2. Reducción del crecimiento por la adición de cualquier fitohormona. 3. Tendencia de aumento por la inoculación y adición de giberelinas/citocininas. Efecto antagónico por la aplicación de auxinas.
<p>3. B +H</p> <p>Az 39 (I) + Auxinas (H1)</p> <p>Az 39 (I) + Giberelinas (H2)</p> <p>Az 39 (I) + Citocininas (H3)</p>	<p><u>Crecimiento radical:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aumento por la inoculación con Az39. 2. Disminución por la adición de cualquier hormona y mayor severidad por auxinas. 3. Aumento de tamaño por la adición de auxinas y tendencia de aumento por la adición de giberelinas. <p><u>Crecimiento Total:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. No se observó promoción por la inoculación con Az39. 2. Disminución por la adición de cualquier fitohormona. 3. Tendencia de aumento por adición de giberelinas/citocininas.

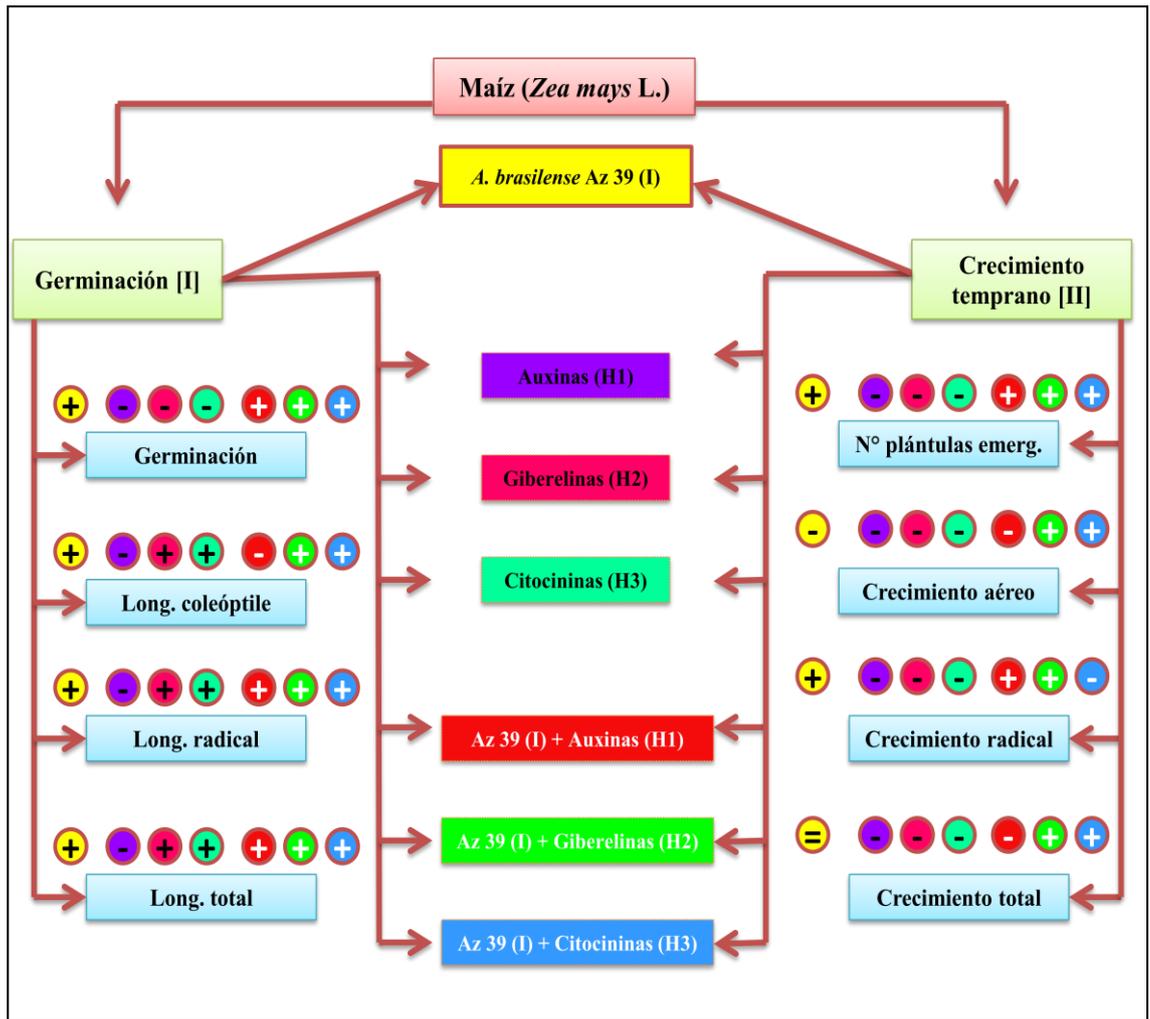


Figura 28: Resumen de la respuesta de semillas de maíz a la inoculación con *A. brasilense* Az39 (arriba); el tratamiento con fitohormonas (medio) y el tratamiento combinado (abajo) a nivel de la germinación y el crecimiento temprano. Signo \oplus , \ominus o \equiv : aumento, disminución o sin cambios de variables por la inoculación con Az 39 (I); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de auxinas (H1); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de giberelinas (H2); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la adición de citocininas (H3); Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Az 39 y H1; Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Az39 y H2; Signo \oplus o \ominus : aumento o disminución de las variables por la combinación de Az39 y H3.

6. DISCUSION

El cultivo de maíz es de gran importancia económica a nivel mundial, este cereal se transformó en el cultivo más producido del mundo. Debido al aumento de la producción y a las múltiples posibilidades de utilización en diversos procesos industriales, en donde se obtiene una amplia gama de productos derivados, en este trabajo se buscó mejorar los procesos de germinación, implantación y crecimiento temprano en semillas de maíz (*Zea mays L.*) con tratamiento biológico combinado de rizobacterias promotoras del crecimiento del género *Azospirillum* y fitohormonas. Teniendo en cuenta este objetivo, algunas prácticas agronómicas se han relacionado con el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal e formulaciones definidas como inoculantes (Boiero, *et al.* 2007; Perrig *et al.* 2007) y/o moléculas reguladores del crecimiento vegetal (fitoestimulantes) (Davies, 1995). En tal sentido, en este trabajo se dividió en concepto de germinación y crecimiento temprano, se abordó el estudio del tratamiento combinado de semillas de maíz con inoculantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento del género *Azospirillum* capaces de mejorar su implantación y productividad en condiciones óptimas; y soluciones bioestimulantes de compuestos reguladores del crecimiento del grupo de las auxinas, giberelinas y citocininas, como una alternativa tecnológica para mejorar la respuesta de los cultivos en los estadios iniciales del crecimiento y aprovechar eficientemente los recursos disponibles.

En este trabajo, el análisis de germinación y la evaluación del número de plántulas emergidas determinó que la adición exógena de cualquier hormona a semillas de maíz sin inocular, generaba un menor porcentaje de germinación y disminuía el número de plántulas emergidas, particularmente por la adición exógena de citocininas. Por otro lado, la inoculación y la aplicación de auxinas o ácido giberélico presentaron un mayor porcentaje de germinación y un aumento del número de plántulas establecidas. Desde el punto de vista biológico, esto podría implicar que la inoculación con *A. brasilense* Az39 determinaría una tendencia de promover la germinación de maíz, pero que este efecto podría mejorarse a través de un efecto de tipo sinérgico, por la adición exógena de auxinas o giberelinas. Resultados similares fueron encontrados por Constantino, *et al.* (2010) en papaya (*Carica papaya L.*) inoculadas con *A. brasilense*, donde la aplicación de este microorganismo incrementó el porcentaje de germinación sobre el control sin inocular y la aplicación combinada del microorganismo con ácido giberélico, aumentó la velocidad de germinación y presentó una mayor homogeneidad de emergencia de plántulas. Kloepper *et al.* (1991) proclamó que las rizobacterias promotoras del crecimiento, podrían mejorar la germinación a través de la producción y liberación de algunas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal del tipo fitohormona, tales como auxinas, citocininas o giberelinas, tanto en medio de

cultivo químicamente definidos, como en asociación con las plantas (Janzen *et al.*, 1992; Cassán *et al.*, 2009 a).

El ácido giberélico es uno de los biorreguladores más usados comercialmente en todo el mundo y está directamente relacionado con la terminación de la latencia del embrión, la velocidad de germinación y el crecimiento inicial de las plántulas (Hartmann y Kester, 1987). Bécquer *et al.* (2013), no descartaron que la causa más probable del efecto positivo de la germinación de *Sporobolus cryptandrus* (hierba de semilla caída) podría deberse a la producción de ácido giberélico por parte de rizobacterias promotoras del crecimiento utilizadas para su inoculación. Resultados similares fueron obtenidos por Baldini (1992), quien señaló que la aplicación exógena de giberelinas en semillas de numerosas especies modifica su "balance hormonal" y permite una pronta germinación. La aplicación exógena de ácido gibérelco también ha sido asociada con la ruptura de dormancia y aumento de la velocidad de germinación en especies forrajeras como caulote (*Guazuma ulmifolia*), leucoaena (*Leucaena leucocephala*), (Hermosillo *et al.*, 2008), chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanabana (*Annona muricata* L.) (Lobo *et al.*, 2007), brócoli (*Brassica oleraceae* L.) (Gonzáles *et al.*, 2007), cardo gigante (*Onopordum nervosum*) (Fernández *et al.*, 2002) muña (*Minthostachys mollis*) (Suárez *et al.*, 2011) y en algunas plantas de importancia comercial de la familia Solanáceas como tabaco de Virginia (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Peng y Harberd, 2002). En otros ensayos, Puente y Bashan (1993) encontraron que inoculación de semillas de cardón gigante (*Pachycereus pringlei*) con *Azospirillum* sp. reducía el tiempo de germinación y aumentaba el crecimiento de las plántulas inoculadas. Esto adicionalmente se comprobó en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas con *A. brasilense* que evidenciaron incrementos significativos en el poder germinativo (Ayrault, 2002). Por otro lado, semillas de zanahoria (*Daucus carota* cv.) inoculadas con *A. brasilense* Sp245 aumentaron tanto su energía germinativa como poder germinativo debido al mismo tratamiento biológico.

En este trabajo se pudo observar que tanto la inoculación con *A. brasilense* Az39, así como el tratamiento combinado de inoculación con adición exógena de giberelinas aumentó el porcentaje y la velocidad de germinación de semillas de maíz, en comparación los controles sin inocular y sin la aplicación exógena de la hormona.

Diversos autores han mencionado que la inoculación con *Azospirillum* sp. antes de la siembra, mejoraría la germinación y el crecimiento de maíz, debido a que estas bacterias, además de fijar nitrógeno atmosférico, sintetizan sustancias biológicamente activas sobre el crecimiento, tales como aminoácidos, vitaminas, ácido indol acético (AIA) y giberelinas

(González-López *et al.*, 2005; Perrig *et al.*, 2007). Nezarat y Gholami (2009) reportaron que la inoculación de semillas de maíz con *A. brasilense* y *A. lipoferum* incrementó significativamente el porcentaje de germinación en esta especie. En un trabajo similar, Puente *et al.* (2007), determinaron que la velocidad de germinación de semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense* Sp245 era mayor que el control y tales resultados fueron coincidentes con los de Cassán *et al.* (2009 b) y Ribas (2009), en los que además se comprobó un efecto de promoción del crecimiento temprano, tanto en semillas de esta especie, como en soja.

Con respecto a la promoción del crecimiento temprano, el análisis de la longitud del coleóptile y de la parte aérea en semillas de maíz hubo un aumento significativo debido a la inoculación con *A. brasilense* Az39 y una tendencia de aumento en aquellas semillas inoculadas y tratadas exógenamente con giberelinas y citocininas. Desde el punto de vista de la bacteria, la promoción del crecimiento aéreo ha sido previamente reportada para *Azospirillum* sp. como consecuencia directa de la producción bacteriana de giberelinas. Lucangelli y Bottini. (1997) presentaron evidencia relacionada con la capacidad de *Azospirillum* sp. para revertir el enanismo genético de plántulas de arroz y maíz mostrando un fenotipo similar al presentado por la aplicación exógena de ácido giberélico en tales mutantes. En este trabajo, la inoculación con *A. brasilense* Az39 mostró una tendencia de promoción del crecimiento del coleóptile y de la parte aérea de manera independiente a la adición de fitohormonas, por lo que se podría suponer que existe la posibilidad que la producción de giberelinas por parte de la bacteria sería suficiente para determinar un efecto de promoción, y si bien, no se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de giberelinas o citocininas, se determinó una tendencia que favorecería esta hipótesis de interacción entre ambos tratamientos. En tal sentido, Perrig *et al.* (2007) determinaron la capacidad de *A. brasilense* Az39 para producir giberelinas y citocininas en medio de cultivo químicamente definido y posteriormente Cassán *et al.* (2009 a) propuso que la promoción del crecimiento del coleóptile de plántulas de maíz inoculadas con Az39, podría deberse al menos en parte a la producción bacteriana de tales moléculas. Resultados similares fueron obtenidos por Barassi *et al.* (2006) quien demostró efectos significativos en la promoción del crecimiento de la parte aérea y radical de plántulas de maíz dulce obtenidas por la inoculación con *A. brasilense* Sp245. Al respecto Bashan *et al.* (2004) mencionan que los efectos de la inoculación con *Azospirillum* sp. serían especialmente significativos durante los primeros estadios del desarrollo vegetal debido a la capacidad de esta bacteria para producir fitohormonas y afectando el pool endógeno de la planta para modificar así su morfología, tanto a nivel radical como de la parte aérea. En tal

sentido uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal, estaría relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir hormonas del tipo giberelinas (Bottini *et al.* 2004).

En cuanto al análisis de la longitud radical, el tratamiento de las semillas con la aplicación de giberelinas o citocininas, pero sin inocular, promovió el crecimiento de la radícula a diferencia de la aplicación exógena de auxinas, que redujo significativamente el desarrollo de este órgano. En lo que respecta a esta observación, Dobbelaere *et al.* (1999) demostraron que la aplicación de auxinas en forma exógena a semillas de trigo producía una fuerte disminución de la longitud radical (a continuación) pero con un marcado aumento de la longitud y densidad de pelos radicales, como se observa en la Figura 29.



Figura 29: Efecto de la morfología radicular en semillas de trigo con adición exógena de auxinas. A la izquierda represente el control sin inocular. Las otras raíces, las semillas fueron tratadas de izquierda a derecha con 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M de AIA.

Resultados similares fueron publicados por Zelena *et al.* (1988) en los que encontraron que la aplicación exógena de ácido indol-acético (IAA) a plántulas de maíz aumentaba significativamente el número de raíces laterales. En otros ensayos, Kolb y Martin (1985) comprobaron que la inoculación de la remolacha (*Beta vulgaris sp.*) con *A. brasilense* aumentaba tanto el número como la longitud de raíces laterales, y esto se correlacionó con la identificación de altos niveles de AIA presentes en el medio de cultivo de la bacteria. Adicionalmente, la aplicación exógena de AIA, causó un efecto similar al de las plántulas inoculadas. En este trabajo el agregado de auxinas en las semillas sin inocular, tuvo una reducción en la longitud del órgano en comparación al de las plántulas inoculadas. En cuanto a la inoculación con *A. brasilense* Az39 en este trabajo, la bacteria promovió el crecimiento radical ya que se comprobó estadísticamente evidencia de sinergismo entre la inoculación y la adición exógena de auxinas con una diferencia mayor por el agregado de citocininas junto a la inoculación. Las plantas, responden a la adición exógena de citocininas. Desde el punto de vista fisiológico, existe poca información que pueda relacionar en forma directa el efecto

de la aplicación combinada de *Azospirillum* sp., y citocininas. Un trabajo relacionado fue de Pan *et al.* (1999) quienes reportaron que la aplicación exógena de 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de citocininas en semillas de maíz, en forma conjunta con la inoculación de una bacteria promotora del crecimiento, *Serratia liquefaciens*, incrementaban el tamaño y peso de las raíces. Bothe *et al.* (1992) probaron que la inoculación de plantas de trigo (*Triticum* sp.) con *A. brasilense* aumentaba significativamente la formación de raíces laterales y la formación de pelos radicales, mientras que la aplicación exógena de AIA aumentaba significativamente el peso seco radical, pero no tenía ningún efecto sobre la formación de raíces laterales. En otros trabajos, Tien *et al.* (1979) y Hubbell *et al.* (1979) probaron que la aplicación exógena de auxinas, giberelinas y citocininas en mijo perla (*Pearl millet*) y sorgo (*Sorghum* sp.) respectivamente producían los mismos cambios en la morfología de raíz que en las plántulas inoculadas con *A. brasilense*, observando un incremento en el número de raíces laterales y en la densidad de los pelos radicales, parte de esta respuesta era atribuida a la inoculación y a las citocininas producidas y liberadas por las bacterias. En forma simultánea, Kucey (1988) comprobó que la inoculación de trigo (*Triticum* sp.) con *A. brasilense* simulaba el efecto del tratamiento exógeno con auxinas (AIA) y ácido giberélico (GA_3) a nivel del patrón de crecimiento de tallo y raíz. También en plantas de trigo (*Triticum* sp.), Zimmer *et al.* (1998) probaron que la adición exógena de AIA (completamente) y NO_2^- (parcialmente) eran sustituidas por la inoculación con *A. brasilense*. En otro interesante trabajo, Barbieri *et al.* (1988) demostraron que la inoculación con una cepa de tipo salvaje de *A. brasilense* (activa productora de AIA) aumentó el número y longitud de raíces laterales en plantas de trigo (*Triticum* sp.) y que la inoculación con una mutante para la producción de AIA no conseguía modificar el desarrollo radical. Posteriormente, Barbieri *et al.* (1991) mostraron que plántulas de trigo inoculadas con un mutante pobre productora de auxinas (AIA), mostraban una reducida capacidad de promover el crecimiento del sistema radical y que esto se traducía en una menor capacidad de las plántulas, para tomar nutrientes del medio de cultivo. En este trabajo, el ensayo de crecimiento temprano a los 14 días de crecimiento se comprobó que las semillas inoculadas en general tenían un aumento de la longitud radical en relación con el control sin inocular. Resultados similares fueron reportados por Ribas (2009) donde obtuvo mayor longitud radical en semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39 en maíz, trigo y soja; al igual que Cassán *et al.* (2009 a) en un trabajo realizado con semillas de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con Az39 obtuvo un aumento significativo en la longitud radical en comparación con el control. Otros resultados similares fueron obtenidos por Barassi *et al.* (2006) mostró efectos significativos en la promoción del crecimiento de la parte aérea con un incremento con respecto al control, en la longitud del coleoptile y radical en plántulas de maíz dulce obtenidas a partir de semillas inoculadas con *A. brasilense*. Estos resultados son

coincidentes con Rodríguez Cáceres *et al.* (1996) quienes demostraron que las especies con mayor respuesta a la inoculación con *A. brasilense* Az39 en el largo de raíces fueron pasto pangola (*Digitaria eriantha*, grama rhodes (*Chloris gayana*), buffel grass (*Cenchrus ciliaris* cvs. Texas y Molopo) y el género *Brachiaria*. En otros cultivo como en girasol, Puente *et al.* (2005) obtuvo también una promoción de crecimiento radicular. Otros trabajos relacionados por los mismos autores, obtuvieron que la inoculación con *Azospirillum brasilense* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) promovió incrementos significativos en el largo de raíz y plántulas a los 9 días (Puente *et al.* 2007).

A nivel de la inoculación y la producción de auxinas Dobbelaere *et al.* (1999) como Spaepen *et al.* (2008) realizaron un estudio con semillas de trigo donde presentaron evidencias concluyentes sobre el papel de AIA y su efecto fitoestimulador por la inoculación con *Azospirillum sp.* mediante el uso de cepas salvajes y deficientes en la biosíntesis de AIA, así como tratamiento exógenos con las hormonas. Ellos demostraron que la inoculación produce una clara disminución de la longitud y un aumento en el volumen radical, como se observa en la Figura 30. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración de la bacteria en el inóculo, donde el crecimiento de este parámetro se promueve a niveles óptimos, tiene efectos inhibitorios a niveles superiores y no causa ningún efecto a dosis bajas. En tal sentido, en este trabajo se utilizó un nivel óptimo de inoculación (dosis agronómica) como reportaran previamente Fallik *et al.* (1988) y Perrig *et al.* (2007). Según Barbieri *et al.*, 1988; Bashan, 1986; Bashan, 1990 una concentración de inóculo de superior a la óptima generalmente inhibe el desarrollo radicular. Así mismo, Baca y Elmerich (2007), demostraron que en *Azospirillum sp.* la promoción o inhibición del crecimiento radical depende de la concentración celular del inóculo de manera análoga a lo que ocurre con la aplicación exógena de AIA, la cual estimula el crecimiento de la raíz a bajas concentraciones y lo inhibe en altas.

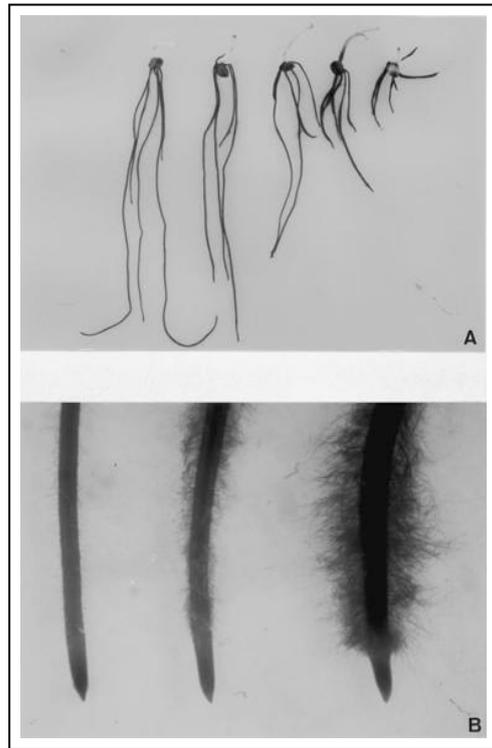


Figura 30: A. Efecto de la longitud y desarrollo radicular en semillas de trigo inoculadas con *A. brasilense* a los 7 días. A la izquierda represente el control sin inocular. Las otras raíces, las semillas fueron inoculadas 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 UFC/mL, de izquierda a derecha. B. Efecto de las semillas inoculadas con formación de pelos radicales y variación del diámetro de la raíz. A la izq. representa el control sin inocular y el resto con 5×10^7 y 5×10^8 ufc/mL respectivamente.

Por lo tanto se puede decir que el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar y seleccionar una cepa promotora del crecimiento vegetal. El rápido establecimiento de la planta en el suelo, mediado por la proliferación de las raíces laterales y adventicias, resulta ventajoso desde el punto de vista adaptativo, porque aumenta su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en estadíos críticos del desarrollo vegetal.

Con respecto al análisis de la longitud total, en ambos ensayos, la aplicación de citocininas o giberelinas en semillas sin inocular generó un mayor impacto sobre el crecimiento. En el caso de las semillas inoculadas con *A. brasilense* Az39, no hubo evidencias estadísticas para afirmar que el efecto de que alguna hormona fuera distinto entre sí o con su control. Por lo que se determinó que la inoculación de las semillas sin el agregado de fitohormonas habría una tendencia de producir efectos sobre este parámetro. Resultados similares fueron obtenido por Ribas, (2009) quien comprobó que *A. brasilense* cepa Az 39

posee la capacidad potencial de promover el crecimiento en semillas de maíz, trigo y soja, donde se encontraron diferencias significativas en la longitud total. Según Kloepper (1994), quien realizó una revisión de diversos trabajos en donde se discute acerca de los aspectos de promoción de crecimiento de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), los efectos de la promoción se producen principalmente en las etapas tempranas del crecimiento de cultivos y no necesariamente se traducen en incrementos en el rendimiento. Dentro de los efectos pre-rendimiento pueden incluirse mejoramiento de la emergencia de la semilla, del stand final, mayor vigor vegetativo, altura de planta, biomasa de raíces y tallos, contenido de nutrientes en el tejido vegetal, etc. Estos resultados, coinciden con algunos estudios de campo realizados con cereales para los que se llegó a observar una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1983). De acuerdo con Heulin *et al.* (1989); Hurek *et al.* (1988) y Tarrand *et al.* (1978) todas las cepas silvestres de *Azospirillum sp.* fijan nitrógeno atmosférico, ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas, y participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno. Después de la inoculación, hay un incremento en el nitrógeno total de brotes y granos de plantas inoculadas (Andrews *et al.* 2003). Así mismo, Ribaudó *et al.* (2001), con plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum* mostraron mayor concentración de nitrógeno (N) en hojas, longitud de raíces y de follaje y producción total de biomasa fundamentalmente entre 2 y 3 semanas luego de su siembra. De aquí que la fijación de nitrógeno es el primer mecanismo principal sugerido para explicar el incremento del crecimiento vegetal por *Azospirillum*.

7. CONCLUSION

La utilización de inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* Az39, así como de moléculas reguladoras del crecimiento tales como las auxinas, giberelinas y citocininas, podrían ser consideradas como herramientas biotecnológicas de interés para mejorar la germinación, implantación y crecimiento temprano en el cultivo de maíz. Los resultados de este trabajo indican que la inoculación con *A. brasilense* Az39 demuestra una tendencia a promover la germinación y el crecimiento temprano en semillas de esta especie; mientras que la combinación de esta bacteria con ciertas fitohormonas modificaría este comportamiento de manera dependiente del órgano y del tipo de molécula adicionada. El análisis de la interacción entre la bacteria y los reguladores determinó una tendencia de aumento del parámetro evaluado (como sinergismo) por la combinación de la bacteria con ácido giberélico o citocininas y de disminución (como sinergismo) para el caso del ácido indol-3-acético. En base a estos resultados se recomendaría continuar con este tipo de estudios para contar con datos más precisos sobre la interacción de estas hormonas y la inoculación. A modo de resumen, podemos mencionar que este trabajo permitió establecer que *A. brasilense* Az39 tiene la capacidad potencial de modificar la germinación y el crecimiento temprano de plántulas de maíz, y a su vez sería posible hacer sinérgica esta capacidad por el agregado de fitohormonas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDO, G. 2012. *Cultivos y sabores de nuestra América. Autoría colectiva de la red Pro-huerta latinoamericana*. Ed. Paula Berenguer. 4-5 p.
2. AGROPANORAMA. 2014. Producción Mundial de Maíz. En: www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm. Consultado: 07 /07/2014.
3. ALVAREZ, C. y E. MULLIN 2004 Enciclopedia de la nueva Agricultura. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires. Ed. Artes gráficas Rioplatenses SA.: 201-204.
4. AMADOR, K.A.; A.J. DIAZ; S. GONZALEZ y E.Y. BIVIÁN-CASTRO. 2013. Efecto de diferentes reguladores del crecimiento vegetal sobre la germinación y desarrollo de plántulas de dos especies de *ferocaptus* (Captaceas). *Polibotánica*. 35: 109-131.
5. ANDRADE F.; A. CIRILO; S. UHART; M. OTEGUI. 1996. Ecofisiología del cultivo de Maíz. Ed. La Barrosa-EEA Balcarce. Bs As. 292 p.
6. ANDREWS M.; E. JAMES; S. CUMMINGS; A. ZAVALIN; L. VINOGRADOVA and B. MCKENZIE. 2003. Use of nitrogen fixing bacteria inoculants as a substitute for nitrogen fertilizer for dryland Gramineous crops: progress made, mechanisms of action and future potential. *Symbiosis* 35:209-229.
7. AYRAULT G. 2002. Estudios sobre la factibilidad del uso de *Azospirillum* para mejorar la capacidad germinativa y el establecimiento de *Lactuca sativa* y *Daucus carota* bajo estrés salino. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. 90 p.
8. AZCON-BIETO, J. y M. TAYLON. 2003. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid, España. Interamericana Mc Graw-Hill. 58p.
9. AZCON- BIETO J. y M. TAYLON. 2008. *Fundamentos de Fisiología vegetal*. 2^{da} ed. Ed. Foro Europa, S.A. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. 656p.
10. BACA, B.E. y C. ELMERICH. 2007. Microbial production of plant hormones. En: Elmerich C., Newton WE (eds). *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer, Dordrecht. p: 113-143.
11. BIANCO, C.A.; T. KRAUS y C.NUÑEZ. 2004. Botánica Agrícola. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria.426p.
12. BALDINI, E. 1992. Arboricultura general. Madrid, España. Mundi-Prensa. 379p.

13. BALZARINI, M.; L. GONZALEZ; M. TABLADA; F. CASANOVES; J. DI RIENZO y C. ROBLEDO. 2011. Info-Stat: Software para análisis estadístico de aplicación general. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
14. BARASSI, C.; R. SUELDO; C. CREUS; L. CARROZZI; E. CASANOVAS y M. PEREYRA. 2006. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. En *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Facultad de Ciencias Agrarias. EEA INTA Balcarce, Balcarce., Argentina. Cap 3. p: 49-56.
15. BARBIERI, P.; A. BERNARDI; E. GALLI and G. ZANETTI. 1988. Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat roots development. *In: Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*. Ed. W. Klingmüller. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag. p. 181-188.
16. BARBIERI, P.; C. BAGGIO; M. BAZZICALUPO; E. GALLI; G. ZANETTI and M. NUTI. 1991. *Azospirillum*-graminae interaction: effect on indole-3-acetic acid. *Developments in plant and Soil Science* 48: 161-168.
17. BARCELO COLL, J.; G. NICOLAS RODRIGO; B. SABATER GARCIA y R. SANCHEZ TAMES. 1992. Fisiología Vegetal, 6^{ta} ed. Ed. Pirámide, Madrid, España. 662 p.
18. BASHAN Y. 1986. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 1067-1071.
19. BASHAN Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 419-425.
20. BASHAN Y. and G. HOLGUÍN. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1225-1228.
21. BASHAN, Y.; G. HOLGUIN y L. DE-BASHAN. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577.
22. BASTIÁN, F.; A. COHEN; P. PICCOLI; V. LUNA y R. BOTTINI. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A3 and A1 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulators*. 24: 7-11.
23. BECQUER C.; B. SALAS; J. SLASKI; D. ARCHAMBAULT y A. ANYA. 2013. Influencia de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento inicial de *Sporobolus cryptandrus*. *Revista cubana de ciencias agrícolas* 47: 4.

24. BOLSA DE COMERCIO DE ROSARIO (BCR). 2014. Guía estratégica para el agro. Estimaciones de producción. En: <https://www.bcr.com.ar/pages/gea/estimaProd.aspx>. Consultado: 08-07-2014
25. BOIERO, L.; D. PERRIG; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN y V. LUNA. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum*, and possible physiological and technological implications. *Applied Microbial and cell Physiology*. 74: 874-880.
26. BOTHE, H.; H. KÖRSGEN; T. LEHMAHER and B. HUNDESHAGEN. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis* 13: 167-179.
27. BOTTINI, R.; M. FULCHIERI; D. PEARCE y R. PHARIS. 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. *Plant Physiology*. 90: 45-47.
28. BOTTINI, R y V. LUNA. 1993. Bud dormancy in deciduous fruit trees. *Curr Top Plant Physiol* 1:147-159.
29. BOTTINI, R.; F. CASSAN y P. PICCOLI. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 497-503.
30. BOWEN, G.D. y A.D. ROVIRA. 1999. The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advance in Agronomy* 66: 1-102.
31. BRAGACHINI, M; A. VON MARTINI; A. MÉNDEZ; F. PACIONI; M. ALFARO. 2002. Siembra de maíz, eficiencia de implantación y su efecto sobre la producción de grano. INTA.Carlos Paz, Córdoba. Procisur IICA.AR. 9 p.
32. CABELLO M.L; T. RUIZ y J.A. DEVESA. 1998. Ensayo de germinación en endemismos ibéricos. *Acta Botánica Malacitana* 23: 59-69.
33. CASSÁN F, BOTTINI R, PICCOLI P. 2001. In vivo gibberellin A₉ metabolism by *Azospirillum* sp in dwarf rice mutants seedlings. *Proceedings of the Plant Growth Regulation* 28:124-129.
34. CASSÁN, F., D. PERRIG, V. SGROY, O. MASCIARELLI, C. PENNA y V. LUNA. 2009 a. *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.
35. CASSÁN, F.; S. MAIALE; O. MASCIARELLI; A. VIDAL; V. LUNA y O. RUIZ .2009 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.

36. CONSTANTINO M.; R. GÓMEZ-ÁLVAREZ, J. D. ÁLVAREZ-SOLÍS ; J. PAT-FERNÁNDEZ y G. ESPÍN. 2010. *Effect of biofertilization and bioregulators on germination and growth of Carica papaya L.* Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México, México. 24 p.
37. CONTRERAS, A.; A. RODRÍGUEZ DORANTES; S. VILLAFÁN; S. JIMÉNEZ; A. TOVAR y L. GUERRERO ZÚÑIGA. 2010. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon L.* por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibatánica* 29: 131-147.
38. CROWLEY, D.E.; Y.C. WANG; C.P.P. REID y P.J. SZANISZLO. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil*. 130: 179-198.
39. DAVIES, P. 1995. *Gibberellins: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. En: Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts. 833 p.
40. DOBBELAERE, S.; A.CROONENBORGHES; A. THYS, A. VANDE BROEK y J. VANDERLEYDEN. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil* 212: 155–164.
41. DÖBEREINER, J. y F. PEDROZA. 1987. *Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants*. Sci. Tech. Publishers/Springer Verlag, Madison, Wis. USA. 155p.
42. ESCANDE A. 2005. Mal de Río Cuarto (MRC). E.E.A.INTA Balcarce. 2 p.
43. EYHERABIDE, G. H. 2006. Mejoramiento genético de maíz y su trayectoria en la Argentina. En: *Maíz y nutrición, informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina. 2: 14-21.
44. FALLIK, E., Y. OKON and M. FISCHER. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 45-49.
45. FALLIK E. Y OKON. E EPSTEIN. A GOIDMAN and M. FISCHER. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 147-153.
46. FERNÁNDEZ, H.; C. PÉREZ; M. REVILLA y F. PÉREZ. 2002. The levels of GA₃ and GA₂₀ may be associated with dormancy release in *Onopordum nervosum* seeds. *Plant Growth Regulation*. 38: 141-143.
47. FYO.2014. El maíz en la Argentina y el mundo. En: <http://portal.fyo.com/especiales/maiz/mapa.html> . Consultado: 08-04-14.

48. FULCHIERI, M.; C. LUCANGELI; and R. BOTTINI. 1993. Inoculation with *A. lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedlings roots. *Plant Cell Physiology*. 34: 1305-1309.
49. GARATE A. e I. BONILLA. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Eds. Azcón- Bieto and Talón E. Madrid. p. 113-130.
50. GEAR, J. R. 2006. El cultivo de maíz en la Argentina. En: *Maíz y nutrición, informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal*. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, 2: 4-8.
51. GLICK, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-114.
52. GONZÁLEZ-LÓPEZ, L.; B. RODELAS; C. POZO, V. SALMERÓN-LÓPEZ; M. MARTÍNEZ-TOLEDO y V. SALMERÓN. 2005. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. *Amino Acids*. 28: 363-367.
53. GONZÁLES, L.M.; C. CAYCEDO; M.F. VELÁSQUEZ; V. FLORES y M.R. GARZÓN. 2007. Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de coliflor (*Brassica oleraceae* L.) var. Botrytis DC. *Agronomía Colombiana*. 25(1): 54-61.
54. HARTMANN, H. y E. KESTER. 1987. Propagación de plantas: principios y prácticas. Ed. CECSA. México.p.759.
55. HEDDEN P. and H. PHILLIPS. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530.
56. HERMOSILLO, Y.; J. AGUIRRE; R.A. RODRÍGUEZ; C. ORTEGA; A. GÓMEZ y R. MAGAÑA. 2008. Métodos inductivos para maximizar la germinación de semilla de germoplasma nativo en vivero para sistemas silvopastoriles en Nayarit, México. *Zootecnia Tropical*. 26(3): 355-358.
57. HEULIN, T.; M. RAHMAN; A. OMAR; Z. RAFIDISON; J.C. PIERRAT y J. BALANDREAU. 1989. Experimental and mathematical procedures for comparing N₂-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *J. Microbiol. Meth.* 9:163-173.
58. HUBBELL D.; T. TIEN; M. GASKINS AND J. LEE. 1979. Physiological interaction in the *Azospirillum*-grass root association. *Associative N₂-fixation*. p.1-6.
59. HUREK, T.; B. REINHOLD; E.G. NIEMANN y I. FENDRIK. 1988. N₂-dependent growth of *Azospirillum* spp. in batch cultures at low concentrations of oxygen. *In: Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*, ed. W. Klingmüller. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. p. 115-121.
60. INFOAGRO. 2012. El cultivo de maíz. En: www.infoagro.com/herbaceos/cereales/maiz.htm. Consultado: 03-03-2012.

61. INTA. 2012. Actualización en evaluación de calidad de simiente de maíz: prueba de viabilidad de capa de Aleurona. En: <http://inta.gob.ar/documentos/actualizacion-en-evaluacion-de-calidad-de-simiente-de-maiz-prueba-de-viabilidad-de-cap-a-de-aleurona/>. Consultado: 02-03-2012.
62. International Seed Test Association. (ISTA) 2007. *International Rules for Seed Testing*. ISTA Editorial. USA. p. 538.
63. JANZEN, R.; S. ROOD; J. DORMAAR and W. MCGILL. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically defined medium and in co-culture on straw. En: *Soil Biology and Biochemistry* 24: 1061-1064.
64. KAPULNIK, Y.; S. SARIG; I. NUR and Y. OKON. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 895-899.
65. KENDE H. y J ZEEVART. 1997. The five “classical” hormones. *Plant Cell* 9:1197-1210.
66. KLEE, H. y M. ESTELLE. 1991. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 529-551.
67. KLOEPPER J.; R. LIFSHITZ and R. ZABLOTOWICZ. 1989. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology* 7: 39-44.
68. KLOEPPER, J., R. ZABLOKOVICZ, E. TIPPING y R. LIFSHITZ. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. **The rhizosphere and plant growth**. Ed. D. L. Keister & P. B. Cregan. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 315-326.
69. KLOEPPER J. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents En: *Soil Microbial Ecology*. Ed. F. B. Metting Jr. Springer Verlag. Germany. pp. 255-274.
70. KLOEPPER, J. W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). *Azospirillum/ plant associations*. Ed. Okon Y. CRC Press, Boca Ratón. p. 111-118.
71. KOLB W. and P. MARTIN. 1985. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. Ed. W. Klingmüller, Springer-Verlag, Berlin. p. 215–221.
72. KUCERA, B.; M.A. COHN y G. LEUBNER-METZGER. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.
73. KUCEY, R. 1988. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 34:735-739.

74. LETHAM, D. 1963. Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Science* 8:569–573
75. LOBO, M.; O. DELGADO; J.R. CARTAGENA; E. FERNANDEZ y C.I. MEDINA. 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola L*) y guanábana (*Annona muricata L*), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agronomía Colombiana*. 25(2): 231-244.
76. LLUNA DUVAL R. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Industria Hortícola* 196: 22-26.
77. LUCANGELLI C. and R. BOTTINI. 1997. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays L.*) treated with Uniconazole. *Symbiosis* 23: 63-72.
78. MANDER L. 1991. Recent progress in the chemistry and biology of gibberellins. *Science Progress Oxford* 75: 33-50.
79. MARCHI, I.R.A., F.A. REBELO, E. FERNANDES DA ROSA y A. MAIOCHI. 2007. Síntese e avaliação da propriedade reguladora de crecimiento vegetal de compostos indólicos derivados do sofrol. *Química Nova* 30: 763-767.
80. MILLER, C.; F. SKOOG; M. VON SALTZA y F. STRONG. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392.
81. MURALIDHARA R.; P. RAI. 1986. Plant growth regulators produced by diazotrophic bacteria. National seminar on microbial ecology. *Journal of Plant Growth Regulation* 33:440–459 457
82. NEZARAT, S. y A. GHOLAMI. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pakistan Journal of Biological Science* 12: 26-32.
83. OKON, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnology* 3: 223-228.
84. OKON, Y. y Y. KAPULNIK. 1986. Development and function of *Azospirillum*-Inoculated roots. *Plant Soil*. 90: 3-16.
85. OKON, Y. y C.A. LABANDERA-GONZALEZ. 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1591-1601.
86. PALIWAL, R. 2001. Introducción al maíz y su importancia. En: *El Maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Ed. FAO. Roma, Italia.
87. PAN B.; Y. BAI; S. LEIBOVITCH and D. SMITH. 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11:179–186.

88. PASTOR C. 2004. Clusters Regionales de Maíz para la producción de Proteínas de Origen Animal. En: www.maizar.org.ar/documentos/clusterspastor.doc. Consultado 20/10/2012.
89. PECE M.G; C. GAILLARD; M. ACOSTA; C. BRUNO; S. SAAVEDRA Y O. BUVENAS. 2010. Germinación de Tipuana tipu (Benth.), O. Kuntze (tipa blanca) en condiciones de laboratorio. *Quebracho Vol. 18*: 5-15.
90. PENG, J. y N.P. HARBERD. 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Plant Biology* 5: 376–381.
91. PEREZ, D. y F. VOLPI. 2004. Cultivo de Soja en el centro este de Entre Ríos. Resultados 2003/04. EEA Concepción del Uruguay. En: Boletín Técnico. Serie Producción Vegetal N° 45.
92. PERRIG, D.; L. BOIERO; O. MASCIARELLI; C. PENNA; F. CASSÁN and 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.
93. PICCOLI, P.; C. LUCANGELI; G. SCHNEIDER and R. BOTTINI. 1998. Hydrolysis of 17 β - Gibberellin A and 17, 17- A Esther by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regulation*. 23: 179-182.
94. PROBANZA, A; J. GARCÍA; M. PALOMINO; B. RAMOS; F. MANERO. 2002. Pinus pinea L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus (B. licheniformis CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20:75–84
95. PUENTE, M.E. and Y. BASHAN. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*. 15: 49-60.
96. PUENTE, M.; M. DÍAZ-ZORITA y A. PERTICARI. 2005. Respuesta de plántulas de girasol inoculadas con *Azospirillum brasilense*. Póster, actas 3° Congreso Argentina de Girasol, Buenos Aires, Argentina.
97. PUENTE, M., J. GARCÍA y A. PERTICARI. 2007. Respuesta a la inoculación con *Azospirillum brasilense* en maíz. En: <http://www.agro-noticias.com>. Consultado: 18-10-2014.
98. REINOSO, H; C. DAURÍA; V. LUNA; R. PHARIS and R. BOTTINI. 2002. Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds VI. Effects of gibberellins and an acylcyclohexanedione (Cimectacarb) on bud morphogenesis in field experiments with orchard trees and on cuttings. *Canadian Journal of Botany* 80:656–663

99. RIBAUDO C.; D. RONDANINI; J. CURA and A. FRASCHINA. 2001. Response of Zea mays to the inoculation with *Azospirillum* on nitrogen metabolism under greenhouse conditions. ***Biologia Plantarum***. 44: 631-634.
100. RIBAS, A. 2009. *Promoción de la germinación y crecimiento temprano de semillas de maíz, trigo y soja por la inoculación con Azospirillum brasilense Az 39*. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 39 p.
101. RODRÍGUEZ CÁCERES, E.; C. DI CIOCCO y J. C. PACHECO BASURCO. 1996. Influencia en la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. ***Ciencia del suelo***. 14:110-112.
102. ROSAS, S.; M. NEIDERHAUSER, C. BETTERA y E. BOSCH . 2013. Biofertilizers. From the craft to Industrial Production. Its application in Argentina. En: *Microbiología Agrícola. Un aporte de la Investigación en Argentina*. 2^{da} edición. Editorial Magna, Argentina, Tucumán. p : 437-450.
103. ROSS J.; D. O'NEILL; J. SMITH; L. KERCKHOFF and R. ELLIOT. 2000. Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea. ***Plant Journal***. 21: 547-552.
104. SAKABIBARA, H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. ***Annu. Rev. Plant Biol.*** 57: 431-49.
105. SATORRE, E.H.; R.L. BENECH ARNOLD; G.A. SLAFER; E.B. DE LA FUENTE; D.J. MIRALLES; M.E. OTEGUI y R. SAVIN. 2003. *Producción de Granos*. 1^{ra} edición Editorial Facultad de Agronomía, Argentina, Buenos Aires. p: 11-13.
106. SPAEPEN, S.; S. DOBBELAERE; A. CROONENBORGHES and J. VANDERLEYDEN. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. ***Plant Soil***. 312: 15-23.
107. SUÁREZ, D.; J.L. FERNÁNDEZ y L.M. MELGAREJO. 2011. Efecto de la luz y el ácido giberélico (AG3) en la germinación de *Minthostachys mollis* Kunth. Griseb (Labiatae). ***Acta Biológica Colombiana***. 16(2): 149-154.
108. TARRAND, J.; N. KRIEG y J. DÖBEREINER. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. ***Canadian Journal of Microbiology*** 24: 967-980.
109. TEROUCHI, N. y K. SYONO. 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. ***Plant Cell Physyogy*** 31: 119-127.
110. TIEN, T. M.; M. H. GASKINS, y D. H. HUBBELL. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet

- (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 37:1016-1024.
111. TREWAVAS , A. 2000. Signal perception and transduction. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, p 930–987.
112. VESSEY, J. K. 2003. Plant grown promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255: 571-586.
113. ZELENA, E.; M. KUTACEK and V. CERMAK. 1988. Fate of root applied indolylacetic acid and its influence on the growth of intact plants, In: Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants, *SPB Academic Publishing*. p. 371–376.
114. ZAHO, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.
115. ZIMMER, W.; M. WESCHE and L. TIMMERMANS. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. *Current Microbiology*. 36: 327-331.

9. ANEXOS

Anexo 1. Diagramas de cajas (box-plot) de las variables medidas:

Longitud del coleoptile en ensayo de germinación

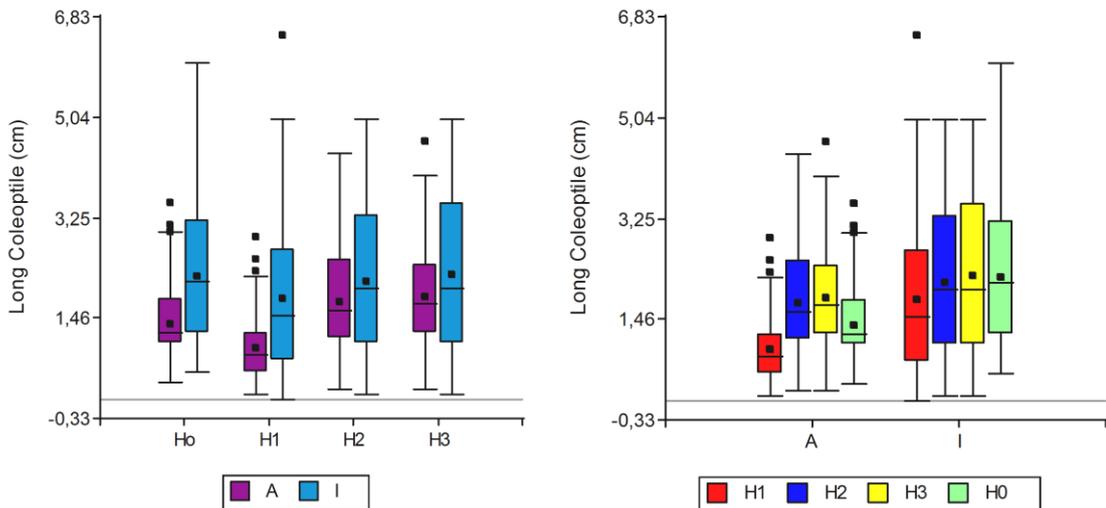


Figura 31: Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud coleoptile (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana y el punto la media; los puntos fuera de la caja representan los datos atípicos para cada tratamiento. El tamaño de los bigotes indica la dispersión de los datos del 25% de los datos inferiores y superiores.

En la Figura 31, se observa que la longitud del coleoptile como parámetro de crecimiento, mostró una alta dispersión en todos los casos. En algunos tratamientos (AH0; AH1; AH3 e IH1) se observaron datos atípicos, así como una mayor dispersión, sobre todo en el 25% de los valores superiores. En resumen, los tratamientos no inoculados mostraron una mayor cantidad de datos atípicos que aquellos inoculados

Longitud radical en ensayo de germinación

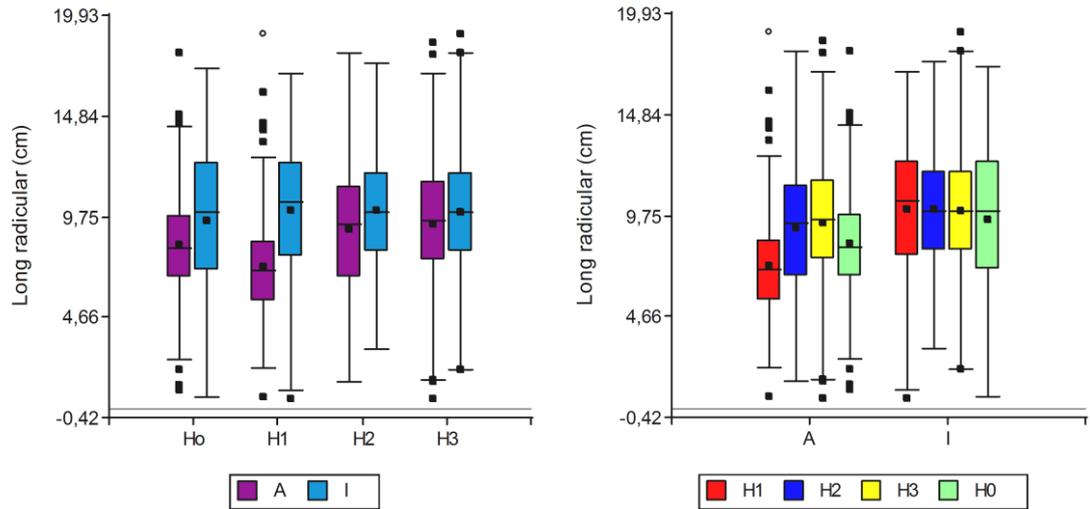


Figura 32: Diagramas de cajas (box-plot) para la variable longitud de la raíz (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana y el punto la media; los puntos fuera de la caja representan los datos atípicos para cada tratamiento. El tamaño de los bigotes indica la dispersión de los datos del 25% de los datos inferiores y superiores.

Como se observa en la Figura 32, la longitud de la raíz (cm), como parámetro de crecimiento, tuvo una alta dispersión en todos los tratamientos. En la mayoría de los casos se observaron datos atípicos, excepto en aquellos de los tratamientos inoculados y sin adición de fitohormonas (IH0) y en todos los casos tratados con giberelinas (AH2 e IH2). Las semillas sin inocular mostraron una mayor cantidad de datos atípicos que aquellas inoculadas.

Longitud total en ensayo de germinación

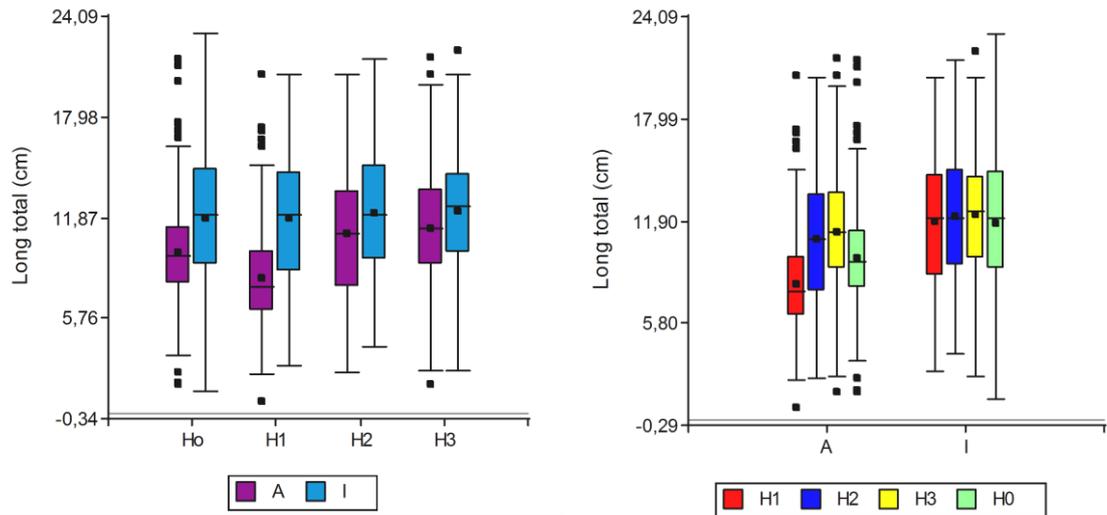


Figura 33: Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud total (cm) en semillas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 7 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana y el punto la media; los puntos fuera de la caja representan los datos atípicos para cada tratamiento. El tamaño de los bigotes indica la dispersión de los datos del 25% de los datos inferiores y superiores.

Como se observa en la Figura 33, la longitud total (cm), como parámetro de crecimiento, mostró una alta dispersión en todos los tratamientos. Las semillas sin inocular mostraron una mayor cantidad de datos atípicos que aquellas inoculadas que además tuvieron un valor de media y mediana mayores. En resumen, las semillas inoculadas mostraron un aumento sobre el crecimiento en longitud con respecto a las no inoculadas y además presentaron menos variabilidad de los datos con respecto a las semillas sin inocular.

Longitud aérea en ensayo de crecimiento

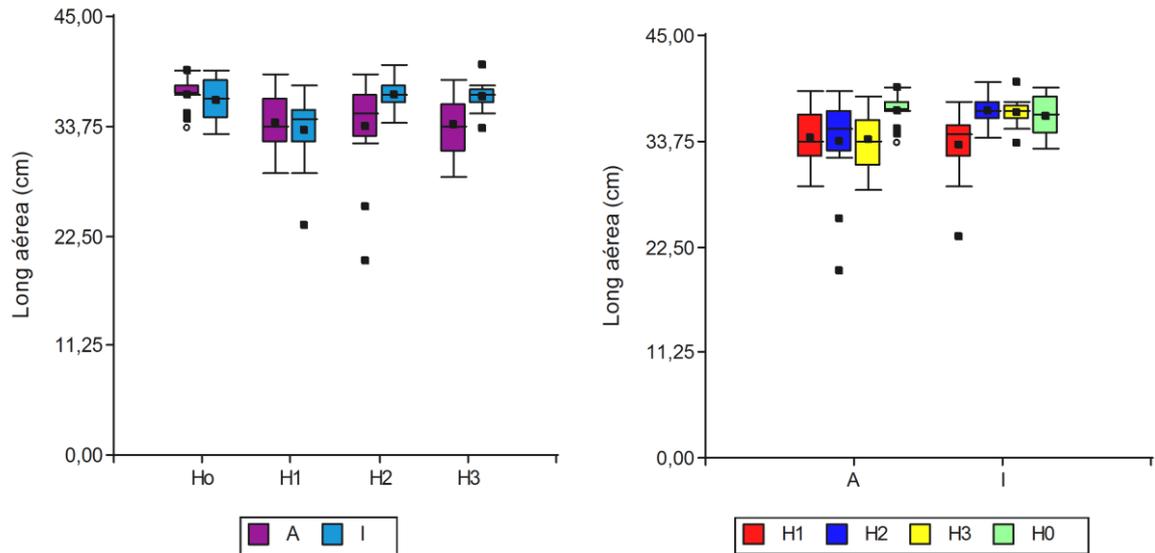


Figura 34: Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud aérea (cm) en plántulas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana y el punto la media; los puntos fuera de la caja representan los datos atípicos para cada tratamiento. El tamaño de los bigotes indica la dispersión de los datos del 25% de los datos inferiores y superiores.

Como se observa en la Figura 34, como parámetro de crecimiento temprano, mostró en algunos tratamientos (AH0; IH1; AH2 e IH3) datos atípicos y un comportamiento disperso de la variable, tanto en los valores superiores como inferiores.

Longitud radical en ensayo de crecimiento

En la siguiente Figura 35 representa el diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud radical (cm) en plántulas de maíz (*Zea mays* L.), a los 14 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo, cuando a las semillas se las embebió en agua o inoculante a base de *A. brasilense* Az39 y se les agregó diferentes hormonas.

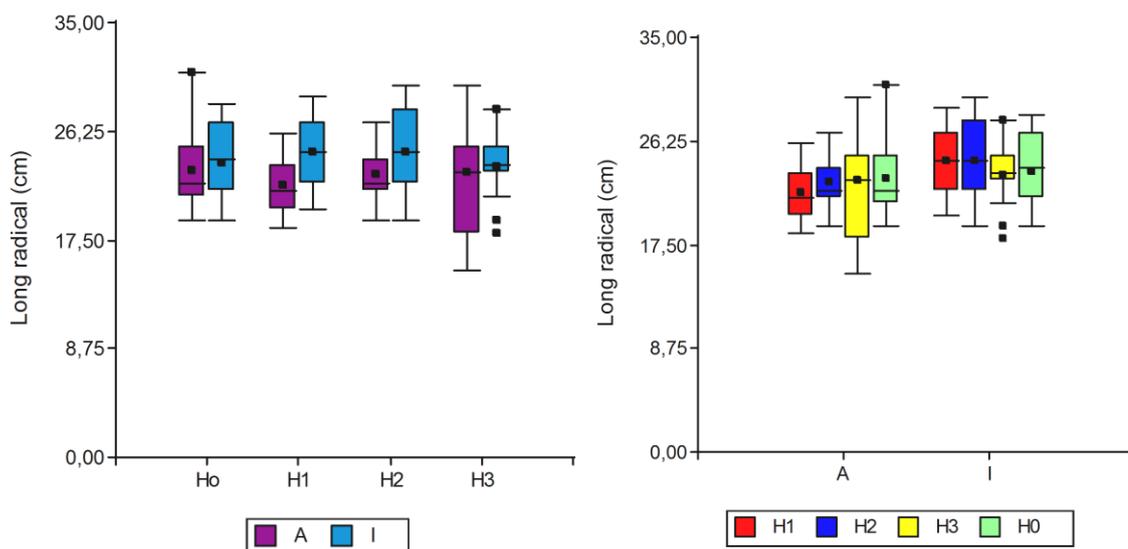


Figura 25: Diagrama de cajas (box-plot) para la variable longitud radical (cm) en plántulas de maíz inoculadas (I) o sin inocular (A) y tratadas de manera exógena e individual con soluciones de auxinas (H1), giberelinas (H2) y citocininas (H3), luego de 14 días de crecimiento. La línea dentro de las cajas representa la mediana y el punto la media; los puntos fuera de la caja representan los datos atípicos para cada tratamiento. El tamaño de los bigotes indica dispersión de los datos del 25% de los datos inferiores y superiores.

Como se observa en la Figura 25 la longitud radical, mostró en dos tratamientos (AH0 e IH3) datos atípicos. La distribución de la variable en cada tratamiento, presentan una cierta asimetría todos tienen una dispersión semejantes de los datos, tanto en los valores superiores como inferiores; excepto en algunos (AH0 y AH3) hubo mayor dispersión de datos en el 25% de los valores superiores. Las semillas inoculadas y con la adición de auxinas y giberelinas se observaron a nivel de la media y la mediana un aumento sobre el crecimiento en longitud al igual que el control. En cuanto a las semillas no inoculadas, el tratamiento con la adición de auxinas y citocininas mostró un valor mayor de la mediana en comparación con el control.

Anexo 2. Descripción de las variables energía y poder germinativo

En la Tabla 1 se presentan los promedios de las variables Energía y Poder Germinativo (EG-PG), para la combinación de factores, tal como tipo de tratamiento (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y aplicación de hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas) a los 4 y 7 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 1: Medidas Resumen de la variable Energía y Poder Germinativo (EG-PG), en semillas de maíz (*Zea mays L*) a los 4 días y 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

Emb	Horm	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
A	H0	EG	2	97,00	1,41	1,46	96,00	98,00
A	H0	PG	2	97,00	0,00	0,00	97,00	97,00
A	H1	EG	2	96,50	0,71	0,73	96,00	97,00
A	H1	PG	2	96,50	0,71	0,73	96,00	97,00
A	H2	EG	2	95,50	2,12	2,22	94,00	97,00
A	H2	PG	2	95,50	2,12	2,22	94,00	97,00
A	H3	EG	2	93,00	0,00	0,00	93,00	93,00
A	H3	PG	2	93,00	0,00	0,00	93,00	93,00
I	H0	EG	2	99,00	1,41	1,43	98,00	100,00
I	H0	PG	2	99,00	1,41	1,43	98,00	100,00
I	H1	EG	2	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
I	H1	PG	2	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
I	H2	EG	2	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
I	H2	PG	2	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
I	H3	EG	2	98,00	0,00	0,00	98,00	98,00
I	H3	PG	2	98,00	0,00	0,00	98,00	98,00

Referencias: A: agua; I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; EG: Energía Germinativa; PG: Poder Germinativo; n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo.

Análisis estadístico del poder germinativo

Hormonas por tipo de inoculación (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 6).

Se compara dentro de cada tipo de Embebido cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
a	PG	H0	2	97,00	0,00	97,00	4,54	0,2000
a	PG	H1	2	96,50	0,71	96,50		
a	PG	H2	2	95,50	2,12	95,50		
a	PG	H3	2	93,00	0,00	93,00		

Referencias: A: agua; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: No hubo evidencias estadísticamente significativas para decir que el efecto de las hormonas fue diferente cuando las semillas fueron embebidas con agua, $p=0,2$.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron embebidas con inoculante.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron embebidas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
I	PG	H0	2	99,00	1,41	99,00	3,67	0,4286
I	PG	H1	2	100,00	0,00	100,00		
I	PG	H2	2	100,00	0,00	100,00		
I	PG	H3	2	98,00	0,00	98,00		

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: No hubo evidencias estadísticamente significativas para decir que el efecto de las hormonas fue diferente cuando las semillas fueron embebidas con inoculante, $p=0,42$.

Anexo 3. Descripción y análisis estadística de la variable de longitud del coleoptile

En la **Tabla 2** se presentan las medidas resumen de la variable longitud del coleoptile (cm), para la combinación de factores tipo de embebido (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas), a los 7 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 2: Medidas Resumen de la variable longitud del coleoptile (cm) en semillas de maíz (*Zea mays* L.) a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

Emb	Horm	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Long Coleopt	186	0,92	0,48	51,79	0,10	2,90	0,80
A	H2	Long Coleopt	186	1,74	0,76	43,32	0,20	4,40	1,60
A	H3	Long Coleopt	186	1,83	0,79	43,48	0,20	4,60	1,70
A	Ho	Long Coleopt	186	1,35	0,58	42,88	0,30	3,50	1,20
I	H1	Long Coleopt	186	1,81	1,26	69,47	0,00	6,50	1,50
I	H2	Long Coleopt	186	2,11	1,35	64,16	0,10	5,00	2,00
I	H3	Long Coleopt	186	2,23	1,32	59,21	0,10	5,00	2,00
I	Ho	Long Coleopt	186	2,21	1,18	53,18	0,50	6,00	2,10

Long coleopt: Longitud del coleoptile; n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: A: agua; I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Análisis estadístico de la longitud del coleoptile

Hormonas por tipo de inoculación (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 8).

Se compara dentro de cada tipo de Embebido cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	LONG COLEOPT	H1	186	206,45	3	184,72	<0,0001
A	LONG COLEOPT	H2	186	455,99			
A	LONG COLEOPT	H3	186	476,71			
A	LONG COLEOPT	Ho	186	350,85			

Referencias: A: agua; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo evidencias estadísticamente significativas para decir que el efecto de las hormonas fue diferente cuando las semillas fueron embebidas con agua, $p < 0.0001$.

- **Inoculante**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron embebidas con inoculante.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron embebidas con inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Prom. rangos	gl	H	p
I	LONG COLEOPT	H1	186	324,73	3	13,82	0,0031
I	LONG COLEOPT	H2	186	372,38			
I	LONG COLEOPT	H3	186	395,12			
I	LONG COLEOPT	Ho	186	397,77			

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo evidencias estadísticamente significativas para decir que el efecto de las hormonas fue diferente cuando las semillas fueron embebidas con inoculante, $p = 0,003$.

Anexo 4. Descripción y análisis estadístico de la variable de longitud de la radícula

En la **Tabla 5** se presenta las medidas resumen de la variable longitud radical (cm), para la combinación de factores tipo de embebido (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas) a los 7 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 5: Medidas de resumen de la variable longitud radical (cm) en semillas de maíz a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

Emb	Horm	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Long Rad.	186	7,23	2,66	36,81	0,60	19,00	7,00
A	H2	Long Rad.	186	9,11	3,56	39,09	1,40	18,00	9,35
A	H3	Long Rad.	186	9,39	3,27	34,79	0,50	18,50	9,50
A	H0	Long Rad.	186	8,36	2,84	33,98	1,00	18,00	8,15
I	H1	Long Rad.	186	10,05	3,35	33,30	0,50	17,00	10,50
I	H2	Long Rad.	186	10,07	2,93	29,10	3,00	17,50	10,00
I	H3	Long Rad.	186	9,99	3,00	29,98	2,00	19,00	10,00
I	H0	Long Rad.	186	9,56	3,54	36,98	0,60	17,20	10,00

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; A: agua ; I: inoculante.

Análisis estadístico de la longitud de la radícula

Hormonas por tipo de inoculación (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 10).

Se compara dentro de cada tipo de Embebido cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	Long Rad.	H1	186	275,59	3	62,61	<0,0001
A	Long Rad.	H2	186	410,93			
A	Long Rad.	H3	186	440,29			
A	Long Rad.	H0	186	363,19			

Referencias: A: agua; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo evidencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para decir que el efecto de las hormonas fue diferente con las semillas embebidas con agua.

- **Inoculante**

H_0 : No hubo efecto debido a hormona, cuando las semillas se aplicaron Inoculante

H_1 : Hubo efecto debido a hormona, cuando las semillas se aplicaron Inoculante.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	Long Rad.	H1	186	386,56	3	1,80	0,6145
I	Long Rad.	H2	186	375,42			
I	Long Rad.	H3	186	370,95			
I	Long Rad.	Ho	186	357,06			

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: No hubo evidencias estadísticas para afirmar que el efecto de alguna de las hormonas es distinto, cuando las semillas son embebidas con Inoculante, ($p=0,61$)

Anexo 5. Descripción y análisis estadística de la variable de longitud total de la plántula

En la **Tabla 7** se presentan las medidas resumen de la variable longitud total (cm), para la combinación de factores tipo de embebido (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas), a los 7 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 7: Medidas de resumen de la variable longitud total (cm) en semillas de maíz (*Zea mays L.*) a los 7 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

Emb	Horm	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
A	H1	Long total	186	8,16	2,99	36,65	0,70	20,60
A	H2	Long total	186	10,85	4,15	38,26	2,50	20,50
A	H3	Long total	186	11,22	3,67	32,72	1,70	21,60
A	Ho	Long total	186	9,71	3,23	33,29	1,70	21,50
I	H1	Long total	186	11,86	4,11	34,69	2,90	20,50
I	H2	Long total	186	12,18	3,87	31,77	4,00	21,50
I	H3	Long total	186	12,22	3,55	29,09	2,60	22,00
I	Ho	Long total	186	11,77	4,02	34,13	1,30	23,00

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: con auxina; H2: con giberelina; H3: con citocinina; A: agua ; I: inoculado.

Análisis estadístico de la longitud total

Hormonas por tipo de Embebido (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 13).

Se compara dentro de cada tipo de Embebido cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H0: No hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

H1: Hubo efecto debido a hormonas, cuando las semillas fueron tratadas con agua.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	Long total	H1	186	257,31	3	89,4	<0,0001
A	Long total	H2	186	420,42			
A	Long total	H3	186	452,99			
A	Long total	Ho	186	359,28			

Referencias: A: agua; I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo evidencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para decir que el efecto de las hormonas fue diferente con las semillas sin inocular.

- **Inoculante**

H_0 : No hubo efecto debido a hormona, cuando las semillas fueron inoculadas

H_1 : Hubo efecto debido a hormona, cuando las semillas fueron inoculadas.

Prueba de Kruskal Wallis

Emb	Variable	Horm	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	Long total	H1	186	365,57	3	1,22	0,7486
I	Long total	H2	186	377,63			
I	Long total	H3	186	384,05			
I	Long total	Ho	186	362,76			

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: No hubo diferencias estadísticas para afirmar que el efecto de alguna de las hormonas es distinto, cuando las semillas son embebidas con Inoculante, ($p=0,7486$)

Anexo 6. Descripción estadística de la variable N° de plántulas emergidas y N° hojas/plántula

En la **Tabla 9** se presenta las medidas resumen de la variable N° plántulas emergidas, para la combinación de factores tipo de embebido (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas) a los 7 y 14 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 9: Medidas de resumen de la variable N° de plántulas emergidas en semillas de maíz a los 7 y 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

EMB	HORM	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Emerg (7)	14	4,64	0,50	10,71	4,00	5,00	5,00
A	H1	Emerg (14)	14	4,71	0,47	9,94	4,00	5,00	5,00
A	H2	Emerg (7)	14	4,36	0,50	11,41	4,00	5,00	4,00
A	H2	Emerg (14)	14	4,71	0,47	9,94	4,00	5,00	5,00
A	H3	Emerg (7)	12	4,17	0,83	20,04	3,00	5,00	4,00
A	H3	Emerg (14)	12	4,17	0,83	20,04	3,00	5,00	4,00
A	Ho	Emerg (7)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
A	Ho	Emerg (14)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	H1	Emerg (7)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	H1	Emerg (14)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	H2	Emerg (7)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	H2	Emerg (14)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	H3	Emerg (7)	13	4,38	0,51	11,55	4,00	5,00	4,00
I	H3	Emerg (14)	13	4,38	0,51	11,55	4,00	5,00	4,00
I	Ho	Emerg (7)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00
I	Ho	Emerg (14)	15	5,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; A: agua ; I: inoculante.

En la **Tabla 10** se presenta las medidas resumen de la variable N° de hojas/plántula para la combinación de factores como tipo de tratamiento (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y aplicación de hormonas (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas).

Tabla 101: Medidas de resumen de la variable N° de hojas/plántula en plántulas de maíz a los 7 y 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

EMB	HORM	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	N° hojas (7)	14	1,86	0,36	19,55	1,00	2,00	2,00
A	H1	N° hojas (14)	14	3,93	0,27	6,80	3,00	4,00	4,00
A	H2	N° hojas (7)	14	1,71	0,73	42,37	0,00	2,00	2,00
A	H2	N° hojas (14)	14	3,93	0,27	6,80	3,00	4,00	4,00
A	H3	N° hojas (7)	12	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00
A	H3	N° hojas (14)	12	3,83	0,39	10,15	3,00	4,00	4,00
A	Ho	N° hojas (7)	15	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00
A	Ho	N° hojas (14)	15	4,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00
I	H1	N° hojas (7)	15	1,93	0,26	13,36	1,00	2,00	2,00
I	H1	N° hojas (14)	15	3,87	0,35	9,10	3,00	4,00	4,00
I	H2	N° hojas (7)	15	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00
I	H2	N° hojas (14)	15	4,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00
I	H3	N° hojas (7)	13	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00
I	H3	N° hojas (14)	13	4,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00
I	Ho	N° hojas (7)	15	2,00	0,00	0,00	2,00	2,00	2,00
I	Ho	N° hojas (14)	15	4,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; A:agua ; I: inoculante.

Anexo 7. Descripción y Análisis estadístico de la longitud aérea

En la **Tabla 11** se presenta las medidas resumen de la variable longitud aérea (cm), para la combinación de factores tipo de embebido (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* AZ39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas), a los 14 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 11: Medidas de resumen de la variable longitud aérea (cm) en plántulas de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

EMB	HORM	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Long aérea	14	34,18	2,86	8,37	29,00	39,00	33,75
A	H2	Long aérea	14	33,75	5,19	15,38	20,00	39,00	35,00
A	H3	Long aérea	12	33,92	3,21	9,47	28,50	38,50	33,75
A	Ho	Long aérea	15	37,03	1,60	4,31	33,50	39,50	37,00
I	H1	Long aérea	15	33,27	3,62	10,88	23,50	38,00	34,50
I	H2	Long aérea	15	36,93	1,56	4,22	34,00	40,00	37,00
I	H3	Long aérea	13	36,77	1,64	4,46	33,50	40,00	37,00
I	Ho	Long aérea	15	36,40	2,08	5,72	33,00	39,50	36,50

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; A: agua ; I: inoculado.

Análisis estadístico de la longitud aérea

Hormonas por tipo de inoculación (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 19).

Se compara dentro de cada tipo de Embebido cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H_0 : No hay efecto debido a hormona

H_1 : Hay efecto debido a hormona.

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	Long aérea	H1	14	23,00	3	10,01	0,0181
A	Long aérea	H2	14	26,07			
A	Long aérea	H3	12	22,42			
A	Long aérea	H0	15	38,93			

Referencias: A: agua; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo diferencias estadísticamente significativas para afirmar que cuando las semilla no son inoculadas, las hormonas producen efectos diferentes en estado de plántulas.

- **Inoculante**

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	Long aérea	H1	15	15,37	3	14,60	0,0021
I	Long aérea	H2	15	35,93			
I	Long aérea	H3	13	35,31			
I	Long aérea	H0	15	32,17			

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: Hubo evidencias estadísticamente significativas para afirmar que cuando las semillas son Embebidas en Inoculante, las hormonas producen efectos diferentes.

Anexo 8. Descripción y Análisis estadístico de la longitud radical

En la **Tabla 14** se presenta las medidas resumen de la variable longitud radical (cm), para la combinación de factores tipo de inoculación (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y hormona (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas), a los 14 días desde la siembra en condiciones controladas de cultivo.

Tabla 14: Medidas de resumen de la variable longitud radical (cm) en plántulas de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

EMB	HORM	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Long radical	14	21,96	2,48	11,28	18,50	26,00	21,50
A	H2	Long radical	14	22,82	2,33	10,23	19,00	27,00	22,00
A	H3	Long radical	12	22,88	4,43	19,37	15,00	30,00	23,00
A	H0	Long radical	15	23,07	3,47	15,06	19,00	31,00	22,00
I	H1	Long radical	15	24,53	2,79	11,36	20,00	29,00	24,50
I	H2	Long radical	15	24,63	3,46	14,03	19,00	30,00	24,50
I	H3	Long radical	13	23,38	2,82	12,07	18,00	28,00	23,50
I	H0	Long radical	15	23,70	2,89	12,19	19,00	28,50	24,00

n: Número de observaciones; D.E.: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H0: sin el agregado de hormona; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas; A: agua; I: inoculado.

Supuestos:

*Normalidad: **Shapiro-Wilks (modificado)**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Long radical	113	0,00	3,02	0,98	0,7785

Los valores se distribuyen normalmente con un $p=0,7785$.

*Homogeneidad: **Prueba de Levene**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Long radical	113	0,06	0,00	74,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,14	7	3,02	0,93	0,4833

EMB	0,43	1	0,43	0,13	0,7173
HORM	3,86	3	1,29	0,40	0,7548
EMB*HORM	17,55	3	5,85	1,81	0,1498
Error	339,37	105	3,23		
Total	360,52	112			

Referencias: EMB: A: Agua e I: inoculante; HORM: H0 (sin hormonas); H1 (auxinas) H2 (giberelinas) H3 (citocininas).

Las varianzas son homogéneas con un $p=0,4833$.

Dado que se verifican ambos supuestos, Normalidad $p=0,7785$ y homogeneidad de Varianza, $p=0,4833$, se realiza el ANOVA para la variable con en estudio.

Análisis de la varianza de la longitud radical (ANOVA)

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
<u>Long radical</u>	<u>113</u>	<u>0,07</u>	<u>0,01</u>	<u>13,34</u>

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	81,95	7	11,71	1,20	0,3090
EMB	53,55	1	53,55	5,49	0,0210
HORM	5,56	3	1,85	0,19	0,9031
EMB*HORM	20,48	3	6,83	0,70	0,5541
Error	1023,98	105	9,75		
Total	1105,93	112			

Referencias: EMB: A: Agua e I: inoculante; HORM: H0 (sin hormonas); H1 (auxinas) H2 (giberelinas) H3 (citocininas).

Medidas Resumen por Embebido

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 9,7521 gl: 105

<u>EMB</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
A	22,68	55	0,42	A
I	24,06	58	0,41	B

Referencias: A: agua; I: inoculante, Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Anexo 9. Descripción y análisis estadístico de la longitud total a los 14 días de crecimiento

En la **Tabla 15** se presenta las medidas descriptivas de la variable longitud total (cm), para la combinación de factores como tipo de tratamiento (A: agua e I: inoculante a base de *A. brasilense* Az39) y aplicación de hormonas (H0: sin hormona, H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas).

Tabla 152: Medidas de resumen de la variable longitud total (cm) en plántulas de maíz a los 14 días desde la siembra, para los ocho tratamientos.

EMB	HORM	Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Mediana
A	H1	Long total	14	56,14	4,00	7,12	50,50	64,00	57,00
A	H2	Long total	14	56,57	6,59	11,65	39,00	65,00	57,25
A	H3	Long total	12	56,79	7,18	12,64	43,50	67,00	55,50
A	Ho	Long total	15	60,10	3,87	6,44	54,00	68,50	59,00
I	H1	Long total	15	57,80	5,15	8,92	43,50	64,50	58,00
I	H2	Long total	15	61,57	4,38	7,11	55,00	68,50	60,50
I	H3	Long total	13	60,15	3,73	6,20	54,00	66,00	60,50
I	Ho	Long total	15	60,10	4,46	7,43	52,00	67,00	60,00

Long total: longitud total de la parte aérea y radical; n: Número de observaciones; DE: Desvío Estándar; CV: Coeficiente de Variación; Mín: Valor Mínimo y Máx: Valor Máximo. Referencias: H1: auxinas, H2: giberelinas, H3: citocininas, H0: control sin hormonas, I: inoculado y A: agua.

Análisis no paramétrico de Kruskal - Wallis de la longitud total

Hormonas por tipo de inoculación (A e I), basado este análisis en el Gráfico de Línea (Figura 32).

Se compara dentro de cada tipo de tratamiento de inoculación cual/es de las Hormonas se comportó mejor:

- **Agua**

Hipótesis a probar:

H_0 : No hay efecto debido a hormona H_1 : Hay efecto debido a hormona.

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Promedio rangos	gl	H	p
A	Long total	H1	14	22,43	3	5,50	0,1380
A	Long total	H2	14	26,93			
A	Long total	H3	12	26,00			
A	Long total	H0	15	35,80			

Referencias: A: Agua; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

- **Inoculante**

Prueba de Kruskal Wallis

EMB	Variable	HORM	N	Promedio rangos	gl	H	p
I	Long total	H1	15	23,13	3	3,87	0,2741
I	Long total	H2	15	35,20			
I	Long total	H3	13	30,31			
I	Long total	H0	15	29,47			

Referencias: I: inoculante; H0: sin hormonas; H1: auxinas; H2: giberelinas; H3: citocininas.

Conclusión: No hubo diferencias estadísticamente significativas para afirmar que el efecto de alguna de las hormonas es distinto, tanto cuando no se inocula ($p=0.1380$) como cuando se aplica inoculantes ($p=0.2741$).