

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Departamento de Ciencias Naturales
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Trabajo Final presentado
para optar al Grado de Lic. en Ciencias Biológicas

**TITULO: EFECTO DE LA BIOFERTILIZACIÓN COMBINADA DE
EXTRACTOS DEL ALGA (EA) *Macrocystis pyrifera* CON BACTERIAS
PGPR EN LA GERMINACION DE ESPECIES HORTICOLAS**

Cortés, Julieta

DNI: 25.686.755

Directora: Dra. Mariana Andrea Reginato

Codirectora: Dra. Virginia Luna

Río Cuarto - Córdoba

Mayo 2017

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno se propone alcanzar una meta tal como llevar a cabo una tesis, muchas son las personas que intervienen con tu enseñanza, información, experiencia, apoyo, consejo. A todas ellas quiero brindarles mi más reconocido agradecimiento:

A mis directoras, Dra. Virginia y Dra. Mariana Reginato por su dirección y aliento.

A mis evaluadores, Dra. Herminda Reinoso y Dr. Maximiliano Escalante por sus críticas constructivas y colaboración en el desarrollo de la tesis.

A mi familia por su comprensión y estímulo constante, además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A Mario por su ayuda, apoyo y motivación constante y por sobre todas las cosas por su amor incondicional.

A mi amiga Julia Iparraguirre por su apoyo constante, su motivación continua y su acompañamiento a lo largo de este camino.

A todos los compañeros del laboratorio, Oscar, Analía, Natalí, Vani, por los momentos compartidos.

A todos mis amigos y compañeros, que tuve la posibilidad de conocer a lo largo de mis estudios, siendo ellos un eslabón muy importante para poder llegar a la meta.

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto por permitir mi formación no solo profesional sino también personal.

***... Después me dijo un arriero
Que no hay que llegar primero
Pero hay que saber llegar...***

José Alfredo Jiménez Sandobal

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
La horticultura en Argentina	1
La horticultura en la Provincia de Córdoba	4
Agricultura orgánica	4
Microorganismos PGPR	6
Extractos de macroalgas para su uso en la agricultura orgánica	8
<i>Macrocystis pyrifera</i>	9
HIPOTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y METODOS	13
Material biológico	13
Metodología para la aplicación	17
Análisis estadísticos	19
RESULTADOS	20
Energía germinativa (EG) y poder germinativo (PG)	20
Parámetros de crecimiento temprano	24
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Cultivo de <i>Azospirillum brasiliense</i>	8
Fig. 2: Fotografía de <i>Macrocystis pyrifera</i>	11
Fig. 3: Plantas de lechuga	13
Fig. 4: Planta y flores de achicoria	14
Fig. 5: Planta de rabanito	15
Fig. 6: Plantas de tomate con sus frutos	16
Fig. 7: EG y PG germinativo de semillas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos	20
Fig. 8: EG y PG de semillas de tomate en relación a los diferentes tratamientos	21
Fig. 9: EG y PG de semillas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos	22
Fig. 10: EG y PG de semillas de achicoria en relación a los diferentes tratamientos	23
Fig. 11: Longitud de la parte área (LA) en plantas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos.	24
Fig. 12: Longitud radical (LR) en plantas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos.	25
Fig. 13: Longitud de la parte área (LA) en plantas de tomate en relación a los diferentes tratamientos.	26
Fig. 14: Longitud radical (LR) en plantas de tomate en relación a los diferentes tratamientos	27
Fig. 15: Peso fresco de la parte área (PFA) en plantas de tomate en	28

relación a los diferentes tratamientos.

Fig. 16: Peso fresco radical (PFR) en plantas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. 29

Fig. 17: Longitud de la parte área (LA) en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos 30

Fig. 18: Longitud radical (LR) en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos 31

Fig. 19: Peso fresco aéreo en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. 32

Fig. 20: Peso fresco radical (PFR) en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos 33

Fig. 21: Longitud de la parte aérea en plantas de achicoria relación a los distintos tratamientos 34

Fig. 22: Longitud radical (LR) en plantas de achicoria relación a los distintos tratamientos 35

Fig. 23: Peso fresco aéreo en plantas de achicoria en relación a los distintos tratamientos 36

Fig. 24: Peso fresco radical en plantas de achicoria relación a los distintos tratamientos. 37

RESUMEN

La evolución de la horticultura en los últimos años ha registrado una reducción de la superficie, pero un aumento en la producción intensiva basada en la incorporación de innovaciones tecnológicas, asociada principalmente a la biofertilización. El objetivo de este estudio fue analizar la respuesta de germinación de tomate, lechuga, rabanito y achicoria a la aplicación de extractos de la alga *Macrocystis pyrifera* individualmente, o junto con la inoculación de *Azospirillum brasilense*, para evaluar si ambos tipos de promotores ejercen una acción sinérgica sobre la energía de germinativa (EG) y el poder germinativo (PG). Las semillas de las cuatro especies hortícolas fueron inoculadas y colocadas en bandejas de germinación (100 semillas por bandeja y 4 bandejas por tratamiento) en cámara de crecimiento (Conviron PR48) con condiciones controladas: 80% de humedad relativa, 16 h de luz / 8 h de fotoperíodo oscuro y de 24 Y 20°C, respectivamente, por triplicado. EG y PG se determinaron de acuerdo con las reglas ISTA. Los resultados mostraron un efecto positivo del uso combinado de ambos biofertilizantes en los parámetros de germinación en algunas especies, principalmente en lechuga, en las que la co-inoculación produjo diferencias significativas. En otras especies la germinación fue estimulada principalmente por el extracto de algas. Estos resultados sugieren que el uso de extracto de algas individual o en combinación con PGPR puede ser utilizado como bio-fertilizantes en especies hortícolas, pero teniendo en cuenta que cada especie responde a cada fertilizante de una manera particular. El uso de biofertilizantes es de gran importancia en horticultura, para reemplazar a los agentes químicos para una producción de alimentos más sostenible.

Palabras clave: Horticultura, biofertilización, extractos de alga, PGPR

SUMMARY

The evolution of horticulture in recent years has recorded a reduction in acreage but an increase in intensive production based on the incorporation of technological innovations, mainly associated with biofertilization. The aim of this study was to analyze the germination response of tomato, lettuce, radish and chicory to the application of extracts from the alga *Macrocystis pyrifera* individually, or together with *Azospirillum brasilense* inoculation, to assess whether both types of promoters exert a synergistic action on the germination energy (GE) and the germination power (GP). Seeds from the four horticultural species were inoculated and placed on germination trays (100 seeds per tray and 4 trays per treatment) in growth chamber (Conviron PR48) with controlled conditions : 80% relative humidity, 16 h light / 8 h dark photoperiod and of 24 and 20° C respectively, in triplicate. GE and GP were determined according to ISTA rules. The results showed a positive effect of the combined use of both biofertilizers on the germination parameters in some species, mainly on lettuce, in which co-inoculation produced significant differences. In other species germination was mainly stimulated by the algal extract alone. These results suggest that the use of algal extract individually or in combination with PGPR may be used as bio-fertilizers in horticultural species, but taking into account that each species responds to each fertilizer in a particular way. The use of biofertilizers is of great importance in horticulture, to replace chemical agents for a more sustainable food production.

Key words: Horticulture, biofertilization, seaweed extracts, PGPR

INTRODUCCIÓN

Los sistemas actuales de producción se basan en una elevada provisión de "subsidijs de energía" necesarios para mantener funcionando el sistema con altos niveles de rendimiento (Coscia, 1998). Esto se traduce en la necesidad de mayor número de labranzas para romper capas de suelo compactadas, para favorecer la infiltración del agua de lluvia en suelos degradados, mayor número de pasadas del escardillo para control de malezas, aumento en el uso de fertilizantes sintéticos, operaciones que deterioran aún más el sistema generando así un mecanismo de "retroalimentación positiva" que incrementa la degradación del suelo (Casas, 2011).

Los aumentos demográficos proyectados y los cambios dietarios esperados, implican que para satisfacer la demanda de alimentos en el 2050, será necesario aumentar la producción entre 70 y 100 % (Godfray *et al.*, 2010) y duplicar la superficie agrícola (Kastner *et al.*, 2012). Por tal motivo, y para mantener los niveles de consumo calórico y proteico alimentarios en niveles adecuados será necesario obtener incrementos importantes en la producción agrícola mundial. La necesidad de aumentar los rendimientos/ha por falta de nuevas superficies productivas, está generando una alta demanda de incorporación de complementos nutricionales de origen químico/sintético altamente concentrados de aplicación al suelo y foliar, provocando una mayor contaminación ambiental que por otra parte no asegura una mayor eficiencia de los cultivos en la asimilación de estos nutrientes. Frente a este escenario, la adopción y uso eficaz de biofertilizantes en la agricultura, está llamada a ser una de las prácticas claves para asegurar la sustentabilidad y productividad de esta actividad tan importante mundialmente.

La horticultura en Argentina

La actividad hortícola en la República Argentina actualmente se desarrolla sobre una superficie de 250.000 hectáreas y logra una producción anual que supera los 5.000.000 de toneladas, generando empleo directo a más de 200.000 personas, y de manera indirecta a un número importante de trabajadores involucrados en la industria de la maquinaria agrícola, agroquímicos, herramientas, materiales de embalaje, plásticos, transporte y distribución (mayorista y minorista).

La horticultura en Argentina comenzó a principios del siglo XX por mano de obra migrante, principalmente europea, quienes trasladaron sus conocimientos y sus tradiciones campesinas en la producción de subsistencia. A inicios del siglo XXI, esta actividad fue ejecutada por inmigrantes provenientes de países limítrofes. En la actualidad, una corriente migratoria proveniente de Bolivia realiza mayormente esta actividad en casi todos los cinturones verdes del país, hegemonizando la mano de obra para la producción, y la comercialización. Los cinturones verdes se definen como aquel tipo de producción hortícola que se realiza en las quintas o huertas de tipo familiar que rodean grandes urbes (García y Kebab., 2008).

La horticultura en nuestro país se caracteriza por su amplia distribución geográfica, por la diversidad de especies que produce, tiene la capacidad para satisfacer la demanda interna y participa en la conformación del PBI (La horticultura en la Argentina, 2010). Los horticultores son generalmente de origen familiar, que contribuyen a la alimentación cotidiana de la población. Las provincias con mayor producción hortícola (ordenadas de mayor a menor superficie, según el CNA- censo nacional agropecuario- 2002) son:

- Buenos Aires (19,7% del total).
- Mendoza (15,0%)
- Córdoba (10,4%)
- Santiago del Estero (6,8%)
- Misiones (5,7%)

- Corrientes (4,9%)

Con respecto a la producción, sobresale con un 65% total el cultivo de papa, tomate, cebolla, batata, zapallo, zanahoria, lechuga y ajo; con un 20% total, acelga, mandioca, zapallito, choclo, berenjena y pimiento el restante 15% está representado por otras hortalizas.

El sector hortícola argentino se diferencia, según el tipo de producción, en:

- Producción de las “hortalizas pesadas y de raíz”
- Producción de “hortalizas de hojas y de frutos”
- Producción de “hortalizas crucíferas”

Para la producción de las hortalizas pesadas (papa, zanahoria), se requiere grandes espacios y su cosecha está en buena parte mecanizada, para lo cual se necesita de una gran inversión de capital. Para la producción de las hortalizas de hoja (lechuga, acelga) y de frutos (tomate, pimiento), y la de crucíferas (brócoli, coliflor, repollo) se requiere que se realice cerca de centros urbanos, con rápido acceso al mercado y no se necesita de grandes inversiones. También tienen diferente comportamiento y tratamiento según los cultivos sean realizados:

- “a campo”
- “forzados” (bajo cubierta)

El clima y el suelo tienen alta incidencia en los rendimientos, en las épocas de oferta y en el acceso a mercado, sean éstos nacionales e internacionales. Hay hortalizas de hojas y de frutos que además de ser cultivadas en sus zonas óptimas de producción, también se cultivan en los “cinturones hortícolas”, sea como cultivo a campo o como cultivo protegido, independientemente de que las condiciones de clima y suelo de esos cinturones no sean ideales.

Uno de los manejos comunes en cercanía de las ciudades, es el establecimiento de cinturones hortícolas “cinturones verdes”, que compiten favorablemente en abastecer parte del consumo local insatisfecho de las

poblaciones/ciudades que circundan. Esto se debe al corto período de perecibilidad de estos cultivos y el alto impacto del transporte en cuanto a la calidad y el costo del flete. Entre estas hortalizas se puede mencionar a la lechuga, la espinaca, la acelga, el tomate y el pimiento. Además, se trata de cultivos anuales, de muy corto ciclo de producción, como es el caso de la lechuga que tarda unos 60 días desde trasplante a cosecha, lo que posibilita que se hagan entre uno y cinco ciclos completos en el mismo suelo en un año (Colamarino *et al.*, 2006).

La horticultura en la Provincia de Córdoba

Córdoba participa con el 5% de la superficie nacional cultivada con frutas y hortalizas. En la provincia, la superficie total destinada a estos sistemas productivos es de aproximadamente 50 mil hectáreas. El principal cultivo es el de papa, con 35 mil hectáreas; el resto del área se cultiva con batata, lechuga, acelga, zanahoria, zapallito de tronco, zapallo, tomate, pimiento, entre otros. Las principales zonas productoras son: el Cinturón Verde de la ciudad de Córdoba (norte y sur); Cinturón Verde de la ciudad de Río Cuarto; Cinturón Verde de la ciudad de Villa María; Zona Rural de Río Primero; Zona Rural de Cruz del Eje; Zona Rural de Villa Dolores; Zona Rural de Colonia Caroya y Vicente Agüero. Particularmente, en el Cinturón Verde de Río Cuarto, los establecimientos productivos están ubicados en forma dispersa en los alrededores de la ciudad. Son aproximadamente 40 quintas las que se encuentran actualmente en producción de hortalizas de hoja, crucíferas, hortalizas livianas en general y en menor medida, zanahoria (Bima *et al.*, 2014).

Agricultura orgánica

En el mundo actual se presenta una mayor conciencia ecológica, cuidado del medioambiente y consumo de alimentos saludables, debido a un evidente cambio climático progresivo (Lotter, 2003). Esto ha generado en el agro, principalmente en la agricultura orgánica, una necesidad de adquirir aditivos naturales que incrementen su rendimiento (Gireesh *et al.*, 2011).

Con el fin de aumentar la producción, suele utilizarse una agricultura basada en el uso de una alta cantidad de insumos entre ellos plaguicidas. La O.I.T. (Organización Interamericana del Trabajo) define a los plaguicidas como “un grupo de productos agroquímicos destinados a destruir plagas de todo tipo o a luchar contra ellas” (OIT, 1993). Algunos aspectos negativos de los plaguicidas son:

- La persistencia del producto químico en el medio ambiente (suelo y agua)
- La capacidad de acumulación en las cadenas tróficas
- La aplicación no regulada de los plaguicidas.
- El modo de aplicación del producto químico
- La cantidad recomendada y la realmente aplicada del agroquímico.

La expansión en el uso de tóxicos está relacionada a la presión comercial de los vendedores de insumos, quienes priorizan el fin de lucro al manejo equilibrado de los cultivos. La venta de insumos a precios accesibles, el estilo de asesoramiento y la falta de conocimiento profundo acerca del efecto de estos tóxicos en el medio ambiente influyen en los casos de intoxicación.

Para contrarrestar los efectos nocivos de los plaguicidas surgió “la otra horticultura” o agricultura orgánica, que es aquella que promueve el mantenimiento de la diversidad biológica, el incremento de la fertilidad del suelo y el manejo integral de plagas. De este modo, se trata de llevar a la práctica sistemas productivos sustentables, viables económicamente y equitativos desde el punto de vista social.

Los cultivos hortícolas bajo producción sin agrotóxicos requieren de una serie de prácticas como la obtención de la semilla, la preparación del suelo para la siembra o trasplante, el abonado del suelo, el diseño del sistema de plantación, el control de hierbas, hongos, insectos y nematodos, así como raleos, tutorado para asegurar un crecimiento normal hasta la cosecha. Estas actividades, a diferencia de las actividades en la horticultura convencional, requieren mayor conocimiento del sistema productivo y la supervisión continua de las prácticas.

Hacia fines de la década del '80, el país atravesó una crisis económica, lo que produjo un aumento en el número de huertas familiares y /o comunitarias destinadas a producir alimentos para complementar la dieta familiar y estimular los hábitos de autoabastecimiento alimentario de personas de escasos recursos. Con esta finalidad, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) creó en 1990 el programa ProHuerta, quien se encarga de proveer de manera gratuita semillas de cultivos estivales e invernales a lo largo de todo el país y de promover “buenas prácticas agrícolas”. Hasta el año 2003, asistía a 445000 huertas familiares y 10000 huertas escolares, que permitían abastecer de hortalizas a unos 3 millones de personas (La Horticultura en la Argentina, 2010)

Retomando, las buenas prácticas agrícolas, mediante la fertilización ecológica se pretende cubrir el esperado déficit entre entradas y salidas de nutrientes en el suelo, con el objetivo de mantener o incrementar la fertilidad presente y futura del mismo, no malgastar recursos no renovables ni energía y no introducir tóxicos o contaminantes en el agroecosistema. Por ello, el manejo ecológico del suelo debe tener como finalidad, además de aportar los nutrientes que necesite el cultivo, aumentar o mantener la fertilidad, del suelo (SEAE, 2008). Para lo cual el productor tendrá que poner en marcha las siguientes medidas:

- Aporte de materia orgánica de origen animal y/o vegetal, mediante estiércol de ganado, compost, incorporación de los restos vegetales, cubiertas naturales, etc.
- Rotaciones y/o asociaciones de cultivo adecuadas, incluyendo leguminosas
- Las cubiertas vegetales y el uso de abonos verdes
- El manejo del suelo y la aplicación de fertilizantes ecológicos

Otra manera de realizar la fertilización del suelo es la utilización de distintos microorganismos.

Microorganismos PGPR

Nuestro país ha incorporado diversas tecnologías para mejorar la productividad de los cultivos y ha sido modelo para otros países en la implementación de la tecnología de inoculantes bacterianos sobre semillas. En la década del '70, se retomaron los estudios de los microorganismos que se asocian a las raíces de los vegetales (Ferlini *et al.*, 2005).

El ecosistema terrestre depende en gran medida de la actividad microbiana. Específicamente, la calidad del suelo y la productividad vegetal derivan de múltiples reacciones metabólicas que los microorganismos llevan a cabo en la zona rizosférica y la incorporación de microorganismos PGPR pueden afectar el crecimiento de la plantas. El término PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) se conoce desde 1978 y se acepta para describir a las bacterias que habitan en la rizósfera de las plantas y que ejercen un efecto positivo sobre los cultivos (Hernández Díaz & Chailloux Laffita, 2001). Dicho efecto radica en los diferentes mecanismos mediante los cuales ellas ejercen su acción, como la fijación biológica de nitrógeno, producción de compuestos tipo fitohormonas que aumentan la energía, el poder germinativo y el enraizamiento, secreción de compuestos que mejoran la estructura del suelo, captación de nutrientes y protección contra patógenos, entre otros. El grupo PGPR incluye varios géneros bacterianos dentro del cual se puede mencionar al género *Azospirillum* (Helman *et al.*, 2012).

El desarrollo de estas prácticas, crearon el concepto de BIOFERTILIZACIÓN, que es " la manera de suministrar a las plantas algún nutriente que ellas necesitan para su crecimiento, mediante un proceso biológico en el que intervienen diferentes microorganismos". En la actualidad existen diferentes tratamientos para lograr la biofertilización: uno de ellos, es la inoculación de gramíneas con bacteria diazótrofas fijadoras de nitrógeno atmosférico; otros microorganismos del género *Azospirillum* , *Azotobacter*, etc., no forman una asociación simbiótica mediante el desarrollo de una estructura especializada dentro de la planta, sino que su accionar, se produce de manera libre alrededor del área de las raíces (rizósfera) o endofítica dentro de la planta, produciendo sustancias promotoras del desarrollo radicular (fitohormonas) (Paredes, 2013).

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*, es una de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas más estudiadas. Se considera una bacteria del suelo de vida libre que tiene la capacidad de afectar el crecimiento de numerosos cultivos agrícolas en todo el mundo a través de la excreción de varias hormonas y la capacidad de la bacteria de fijación de nitrógeno. Muchos países utilizan inoculantes bacterianos que contienen *A. brasilense* (Fig. 1) solo o con otras bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (Loredo-Osti, 2004).

Aún en la actualidad hacen falta muchos estudios de investigación básica, tanto sobre la bacteria como en su interacción con la planta, para un mejor entendimiento de la asociación *Azospirillum*-planta. No obstante, la aplicación de *Azospirillum* como bioestimulante que incrementa la producción de los cultivos debería extenderse a todos aquellos lugares donde la aplicación de fertilizantes es nula o escasa, como lamentablemente ocurre en no pocos países que tienen una agricultura subdesarrollada. En las regiones donde se practica una agricultura moderna, la inoculación con *Azospirillum* permitiría reducir las elevadas cantidades de fertilizantes que generalmente se aplican y con ello disminuir tanto el costo de producción como los problemas derivados de su uso, principalmente la contaminación, sin detrimento de la producción (González *et al.*, 2002).



Fig. 1: Cultivo de *Azospirillum brasilense* en medio LB con rojo congo.

Sin embargo, una de las desventajas ecológicas de la inoculación bacteriana es que se utilizan compuestos de origen sintético como soporte. Con el fin de encontrar un soporte orgánico, comenzaron a utilizarse extractos de distintas algas.

Extractos de macroalgas para su uso en la agricultura orgánica

La explotación de las algas marinas en Argentina comenzó a desarrollarse recién a mediados del siglo pasado. Pero desde hace tiempo se comercializan en el mercado mundial productos en forma de extracto natural de algas soluble en polvo (principalmente de origen chino) que contienen nutrientes naturales y sustancias bioactivas que pueden proporcionar múltiples beneficios para mejorar los rendimientos, la calidad y el vigor de plantas de manera significativa, y que son a la vez no tóxicos y respetuosos del medio ambiente. Además, tienen un impacto muy positivo en la resistencia al estrés, las plagas y enfermedades. Varios estudios revelan los efectos beneficiosos de estos extractos cuando son aplicados sobre las plantas (Bertolotti *et al.*, 1987).

El ácido algínico, el compuesto más abundante en los extractos de algas, estimula la actividad de microorganismos del suelo, mejora la capacidad de retención de agua del suelo, protege a los fertilizantes químicos de lixiviación o inmovilización y ayuda a la conservación de la estructura del suelo. Este ácido, conjuntamente con el manitol presente en los extractos, actúan como agentes quelantes secuestrando cationes como aluminio y hierro que precipitan los fosfatos, incrementando la disponibilidad de fósforo para las plantas (Eyras *et al.*, 2008). Varios estudios revelan los efectos beneficiosos de estos extractos cuando son aplicados sobre las plantas. Por todo lo expuesto, las algas marinas y sus extractos se proyectan como productos capaces de promover el crecimiento de microorganismos beneficiosos para los cultivos y especies de interés, como las hortícolas.

En este sentido, los extractos de macroalgas son una alternativa como productos capaces de promover el crecimiento de microorganismos beneficiosos para los cultivos y especies de interés, como las hortícolas,

incrementando la producción del agro en general y, en particular, de la agricultura orgánica.

Macrocystis pyrifera

En las costas de Sudamérica se encuentra el alga parda (Boraso & Zaixso, 2011) *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh 1820 (Fig. 2). Es un alga de la Clase *Phaeophyceae*, Orden Laminariales. Su coloración es de amarillo pálido a marrón y puede llegar a medir hasta 30 m de longitud. En su estructura morfológica se distingue un disco de fijación o rizoide masivo; estípites largos, cilíndricos, flexibles y de ramificación dicotómica; y frondas o láminas que surgen de los estípites. Las láminas son lanceoladas y rugosas con márgenes dentados y aquellas cercanas a la base no presentan neumátóforos, que son estructuras globosas llenas de aire que proporcionan flotabilidad a la planta (Acleto, 1986). Las últimas láminas de cada ramificación son anchas y poseen el meristema apical que por escisión origina a nuevas láminas. Tiene un ciclo de vida con alternancia de generaciones heteromórficas, siendo el esporófito macroscópico y los gametófitos masculino y femenino microscópicos (Acleto y Zuñiga, 1998).



Fig. 2: Fotografía de *Macrocystis pyrifera*.

La evolución de la horticultura en los últimos años, registra una reducción de la superficie cultivada, y un aumento de la producción física. Este incremento de la productividad física global, tiene su fundamento en la incorporación de innovaciones tecnológicas, fundamentalmente aplicadas al proceso de producción. Se destacan entre otras, el uso de variedades mejoradas y la incorporación de híbridos, el mayor empleo de fertilizantes, mejoramientos en la tecnología de riego (riego por goteo) y la difusión del cultivo en invernáculos (Bima *et al.*, 2014).

Existen muy escasos antecedentes de este tipo de asociaciones en la literatura. Por todo lo expuesto, consideramos de gran importancia evaluar el efecto de la inoculación mixta de bacterias PGPRs con el extracto del alga en distintas especies hortícolas y de esta forma posibilitar la aplicación de una nueva práctica agronómica sustentable para el medio ambiente.

HIPOTESIS

La aplicación conjunta de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense*) con extractos de la macroalga *Macrocystis pyrifera* provoca un efecto positivo sinérgico favoreciendo la germinación de distintas especies hortícolas ya que provee un aporte exógeno de hormonas y nutrientes.

OBJETIVO GENERAL

Analizar las respuestas germinativas de distintas especies hortícolas a la aplicación de extractos del alga *Macrocystis pyrifera* de manera individual o en inoculación mixta con *Azospirillum brasilense*. Evaluar si ambos tipos de promotores ejercen una acción sinérgica sobre la energía germinativa (EG) y el poder germinativo (PG).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Evaluar el efecto de la aplicación del EA de *Macrocystis pyrifera* y la bacteria promotora del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* sobre semillas, de manera individual y en combinación, sobre los parámetros germinativos de diferentes especies hortícolas.

- 2- Evaluar el efecto de la aplicación de los diferentes promotores (EA y bacteria) de manera individual y en combinación, sobre el crecimiento temprano en distintas especies hortícolas mediante la inoculación de semillas.

MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico

1.1. Hortalizas utilizadas

Se utilizaron semillas de distintas especies hortícolas las cuales fueron provistas por el INTA Río Cuarto:

- **Lechuga**: (*Lactuca sativa* L.), Familia: Asteráceas. Algunos autores afirman que esta especie procede de la India, mientras que otros la sitúan en las regiones templadas de Eurasia y América del Norte, proveniente de la especie *Lactuca serriola*. El cultivo de la lechuga comenzó hace 2.500 años. Era una verdura ya conocida por persas, griegos y romanos. En la actualidad, la lechuga es cultivada al aire libre en zonas templadas de todo el mundo y también en invernaderos. Es un alimento que aporta muy pocas calorías por su alto contenido en agua, su escasa cantidad de hidratos de carbono, proteínas y grasas. Poseen vitaminas como folatos, provitamina A o beta-caroteno y vitaminas C y E (Fig. 3) (Sal *et al*; Agüero y Grosso, 2004).



Fig. 3: Plantas de lechuga.

- **Achicoria**: (*Chichorium in tybus* L.) Familia: Asteráceas. Conocida como radicheta, escarola o achicoria. El origen de esta especie se sitúa en las regiones mediterráneas. Plantas cosmopolitas, de excelente dispersión, prefiere suelos bien drenados, no necesariamente fértiles y ambientes soleados. Como vegetal de ensalada su uso se remonta sólo al siglo XIX, pues el marcado sabor amargo de la intibina que contiene hace que las hojas maduras no sean por lo general aptas para el consumo. Las variedades modernas han sido en gran medida seleccionadas para prevenir concentraciones muy altas de intibina, de todos modos, por lo que se consume hasta más entrado el año (Fig. 4) (Sal *et al*; Agüero y Grosso, 2004).



Fig. 4: Planta y flores de achicoria.

- **Rabanito**: (*Raphanus sativus* L.). Familia: Crucíferas. Se considera a China como el lugar de origen de los rábanos. Sin embargo, se sabe que los egipcios y babilonios ya lo consumían hace más de 4.000 años. Parece que fue hacia el año 400 a.C., cuando comenzó a consumirse en China y Corea. En la época de los griegos y romanos se convirtió en un alimento muy apreciado. Fueron éstos últimos quienes extendieron su cultivo por toda Europa. En la actualidad, es en los países del Lejano Oriente donde más se aprecia y se consume. El rabanito es un alimento con un bajo aporte calórico gracias a su alto contenido en agua. Tras el agua, su principal componente son los hidratos de carbono y la fibra. De su contenido vitamínico destaca la vitamina C y los folatos. En la composición de los

rábanos destaca la presencia de compuestos de azufre de acción antioxidante (Fig. 5) (Sal *et al*; Agüero y Grosso, 2004).



Fig. 5: Planta de rabanito.

- **Tomate:** (*Lycopersicon esculentum* L.) Familia: Solanáceas. Son pocas las Solanáceas comestibles, pero su relevancia en la alimentación humana es considerable. El tomate es el fruto de la tomatera, planta de origen americano. En concreto, se considera oriundo de Ecuador, Perú y la zona norte de Chile. Su introducción en Europa tuvo lugar desde México. No fue hasta el siglo XX cuando su cultivo se extendió por todo el mundo. Es una fuente interesante de fibra, minerales como el potasio y el fósforo, y de vitaminas, entre las que destacan la C, E, provitamina A y vitaminas del grupo B, en especial B1 y niacina o B3. Además, presenta un alto contenido en carotenos como el licopeno, pigmento natural que aporta al tomate su color rojo característico. El alto contenido en vitaminas C y E y la presencia de carotenos en el tomate convierten a éste en una importante fuente de antioxidantes, sustancias con función protectora de nuestro organismo (Fig. 6) (Sal *et al*; Agüero y Grosso, 2004).



Fig. 6: Plantas de tomate con sus frutos.

1.2. Extracto de Alga (EA)

La materia prima es el alga parda *Macrocystis pyrifera*, cosechada en las costas de la Provincia de Santa Cruz (Argentina). La cosecha se realiza en el mar desechando todo material que llega a la costa en forma natural (ya que se pierden muchos principios activos y no puede establecerse el tiempo que estuvieron fuera del agua). Se tiene en cuenta el estado de desarrollo del alga, ya que como otros vegetales, su constitución química depende del periodo de desarrollo en que se encuentre. El alga es secada en forma natural a la sombra hasta alcanzar una humedad del 18 %. Posteriormente es trasladada a Buenos Aires, donde la empresa Agropharma S.A. se encarga de la fabricación del extracto. Primero se hace un intenso lavado con agua desmineralizada para extraer el exceso de sodio, luego se realiza la extracción con solución hidro-alcohólica (80 % de agua desmineralizada y 20 % de propilenglicol). Más tarde se procede a una maceración natural y a bajas temperaturas (4° C) mediante un molino coloidal para lograr una completa homogenización. Finalmente, se rotula con fecha de cosecha y lote para su trazabilidad físico-química.

1.3. *Azospirillum brasilense* cepa Az39

Se utiliza un inóculo bacteriano fresco con la cepa AZ39 proveniente del instituto IMyZA INTA en medio de cultivo mínimo, NFb -Nitrogen Free Biotin- (Döbereiner *et al.*, 1976) carente de nitrógeno, que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente N₂. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono para bacterias del género *Azospirillum*. El inóculo utilizado posee una concentración de 1x10⁸ unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

2. Metodología para la aplicación

2.1. Inoculación de semillas

Las semillas utilizadas para la inoculación fueron previamente seleccionadas de acuerdo a su tamaño y se eliminaron las impurezas. Posteriormente, se determinó el peso de 100 semillas. En base a esto se calculó la dosis bacteriana utilizada por gramo de semilla. Para la inoculación se colocaron de 1 a 5 gr de semillas en bolsas de polipropileno estériles dejando un volumen de aire equivalente al ocupado por la semilla. Posteriormente, se inocularon con las correspondientes alícuotas según los tratamientos planteados (las dosis determinadas para la inoculación de semillas corresponde a 1,5 µl/g semilla) y se homogeneizaron manualmente cerrando la bolsa y agitando hasta lograr una correcta distribución del inoculante sobre las semillas durante no menos de 1 minuto. Todos los tratamientos se llevaron a un mismo volumen final mediante la adición de agua destilada estéril.

2.2. Tratamientos para la inoculación de semillas

I control: semillas sin inocular

I1: Semillas inoculadas con Az39, crecidas en medio NFb

I2: Semillas inoculadas con Az39 crecida en EA al 30% (formulado 30%)

I3: Semillas inoculadas con EA

Todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicado.

2.3. Determinación de la Energía germinativa (EG) y Poder germinativo (PG).

2.3.1. Prueba de germinación estándar

Para realizar este ensayo se utilizó el método de germinación en bandejas según lo establece el Manual ISTA (International Seed Testing Association) (2006). Se colocaron 100 semillas para cada especie y tratamiento (mencionado anteriormente), y se determinaron Energía germinativa (EG) y Poder germinativo (PG). Este ensayo fue realizado por triplicado y se repitió cuatro veces. Se entiende por EG (%EG) al porcentaje de semillas germinadas bajo condiciones óptimas de crecimiento y PG (% PG): es el porcentaje de semillas que germinó y desarrolló plántulas normales, cuando se colocó en condiciones ambientales óptimas para su crecimiento (ISTA, 2006).

Los recipientes utilizados para la siembra fueron bandejas plásticas de 12,5 cm x 18 cm x 6,5 cm. En el interior de cada una se colocó una capa de papel absorbente humedecido con 15 ml de agua destilada, y se distribuyeron de manera uniforme las semillas, colocando 10 hileras de 10 semillas cada una. Finalizada la siembra se cubrieron las semillas con papel absorbente y se agregaron 5 ml de agua destilada. Las bandejas se introdujeron en bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad desde el medio de crecimiento. Las bandejas se llevaron a una cámara de crecimiento (Conviron PR48) con condiciones controladas (humedad relativa del 80 %, fotoperiodo de 16 hs luz/ 8 hs oscuridad y temperatura de 24 y 20 °C respectivamente). Se registró la EG y el PG tomando el porcentaje de semillas germinadas (con más de 5 mm de radícula) y el porcentaje de semillas germinadas con fenotipo normal, respectivamente, a los días indicados para cada especie según Manual ISTA como se indica a continuación:

Lechuga (*Lactuca sativa* L.): EG 4 días; PG 7 días

Rabanito (*Raphanus sativus* L.): EG 4 días; PG 10 días

Achicoria (*Chichorium in tybus* L.): EG 5 días; PG 14 días

Tomate (*Lycopersicum esculentum* L.): EG 5 días; PG 14 días

2.3.2. Evaluación del crecimiento temprano

Al momento de evaluar el PG se tomaron de manera aleatorizada, 16 plántulas por bandeja a las cuales se les midieron los siguientes parámetros de crecimiento: longitud de la parte aérea y radical y el PF aéreo y radical. El peso seco, aéreo y radical, se obtuvo colocando cada muestra en estufa a 70°C durante 48hs, hasta que el tejido se encontrara totalmente deshidratado. Estos valores no fueron analizados en este estudio debido a que se encontraban por debajo de los rangos registrados por la balanza analítica Marca OHAUS (0.0mg). Estos ensayos de crecimiento temprano fueron realizados cuatro veces.

3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico INFOSTAT (2011 v.). Dependiendo de la variable respuesta analizada se compararon los tratamientos mediante ANOVA a una vía. Los test a posteriori utilizados fueron el Test de DGC para aquellos parámetros que cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Para la comprobación de dichos supuestos del ANOVA se utilizaron el test de Shapiro-Wilk y el Test de Levene respectivamente. En aquellos ensayos en los que no se cumplieron los supuestos se realizó un el análisis de varianza no paramétrico mediante el test de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados correspondientes al análisis de las pruebas en semillas inoculadas y de las variables de crecimiento temprano de plántulas con la aplicación de los diferentes tratamientos.

1. Energía germinativa (EG) y poder germinativo (PG)

1.1. Lechuga

En la Fig. 7 se observan los resultados para EG y PG de semillas de lechuga en los diferentes tratamientos. Se observa un incremento significativo en estas variables en las semillas inoculadas con la mezcla Az39 + EA (T2) y con EA (T3) con respecto a semillas controles y tratadas con Az39 (T1).

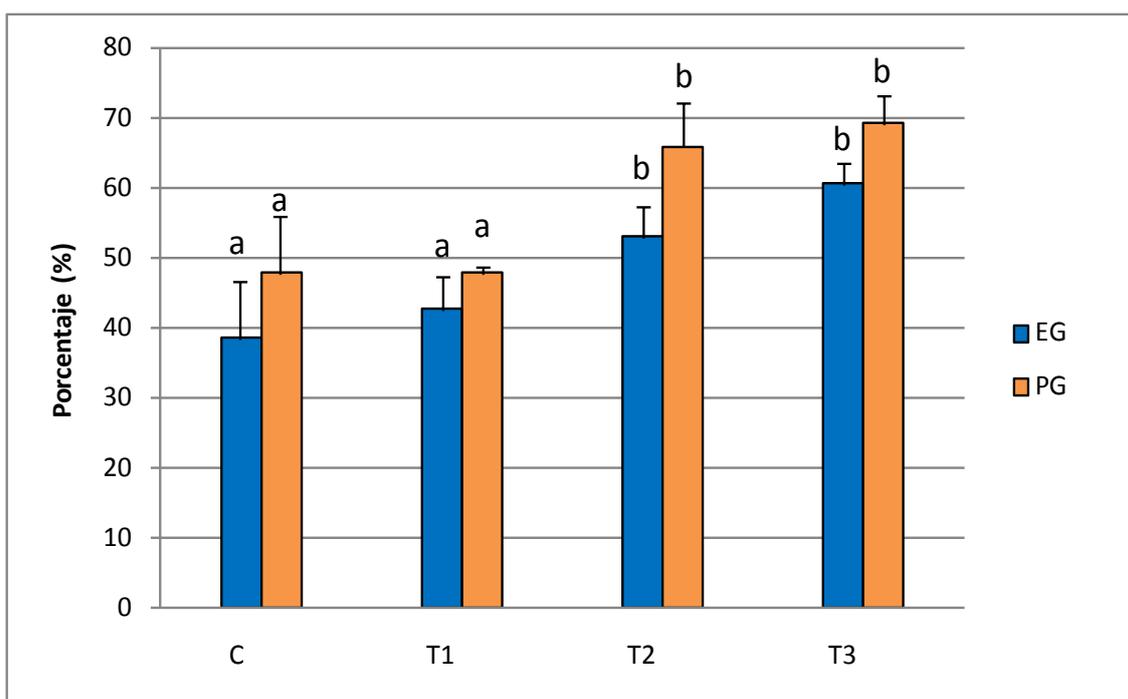


Fig. 7: EG y PG germinativo de semillas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

1.2. Tomate

Las semillas de tomate no mostraron diferencias significativas en cuanto a EG y PG entre los diferentes tratamientos (Fig.8).

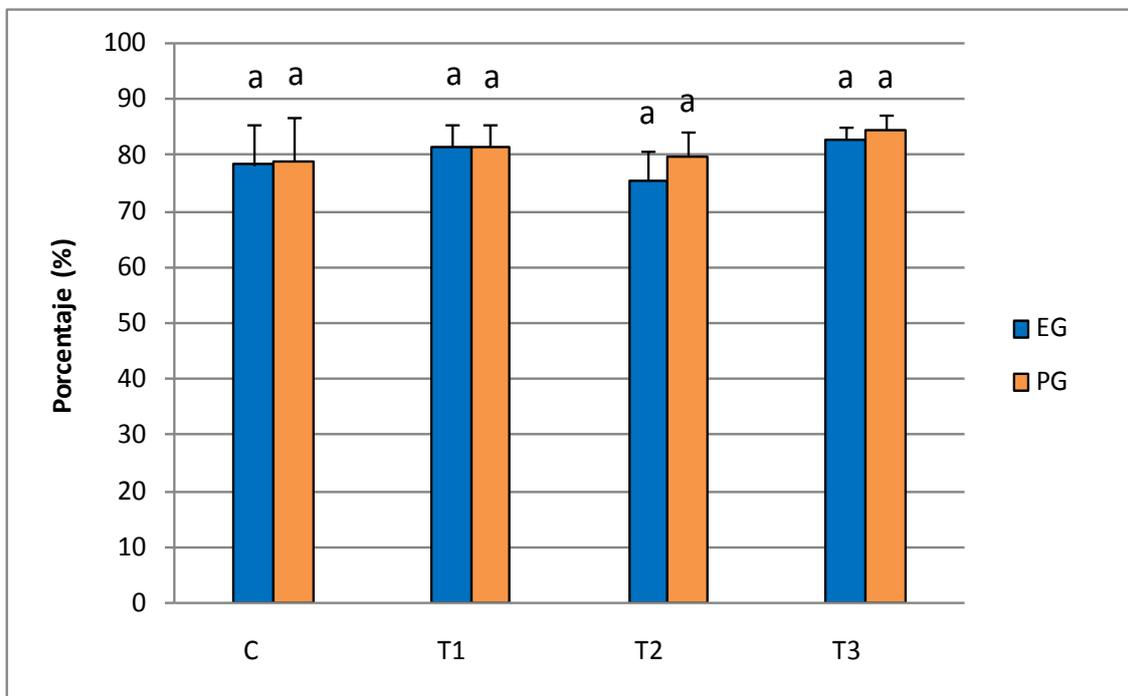


Fig. 8: EG y PG de semillas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

1.3. Rabanito

El comportamiento de EG y PG en rabanito fue similar al de lechuga. Aquellos tratamientos inoculados con la mezcla Az39 + EA (T2) y con EA (T3) mostraron un incremento significativo con respecto a semillas controles y tratadas con Az39 (T1) (Fig. 9).

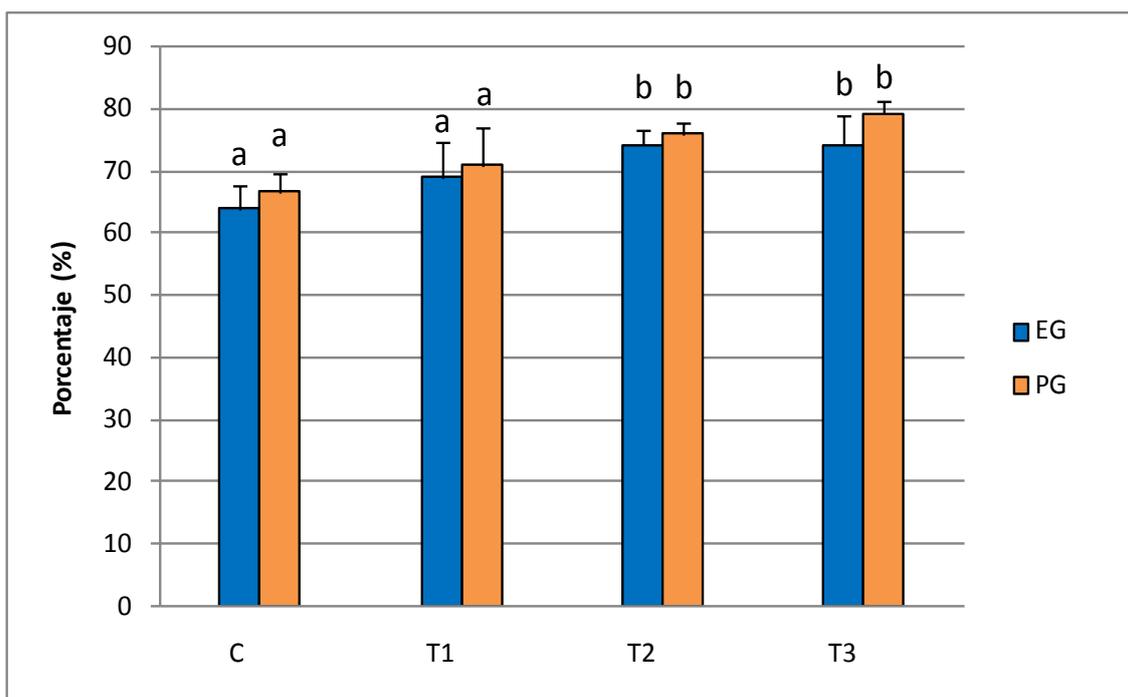


Fig. 9: EG y PG de semillas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

1.4. Achicoria

En la Fig. 10 se observa la EG y PG de semillas de achicoria en los diferentes tratamientos. Se observa, al igual que en el cultivo de rabanito, que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

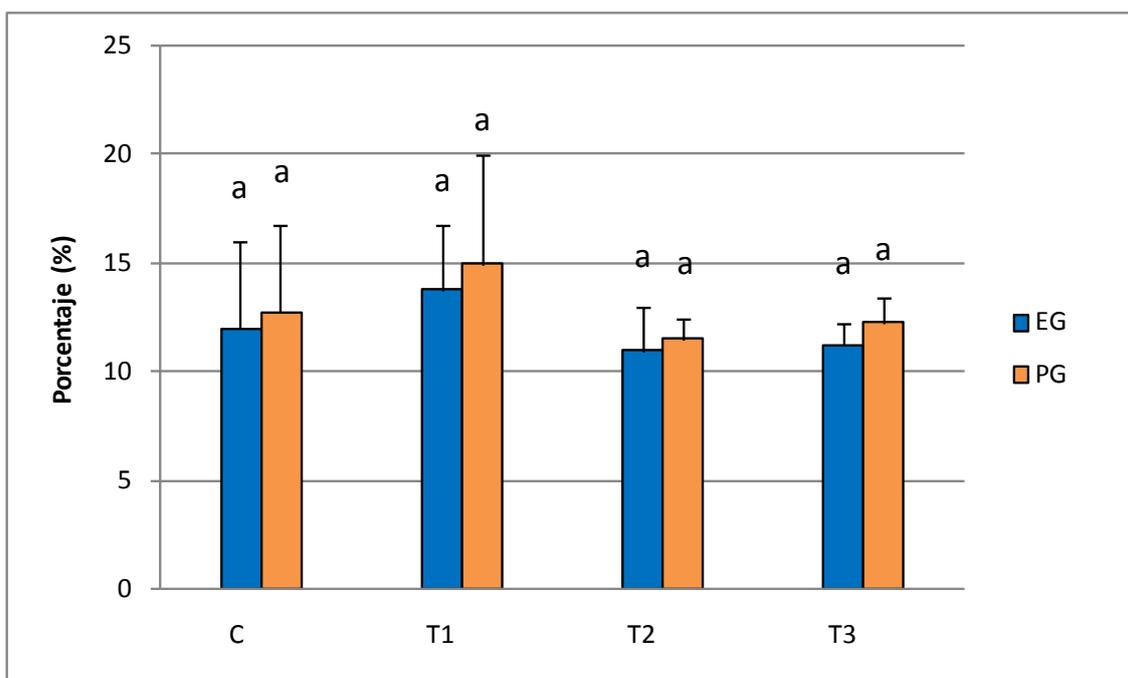


Fig. 10: EG y PG de semillas de achicoria en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

2. Parámetros de crecimiento temprano

2.1. Lechuga

En la Fig. 11 se observa la longitud de la parte aérea (LA) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas.

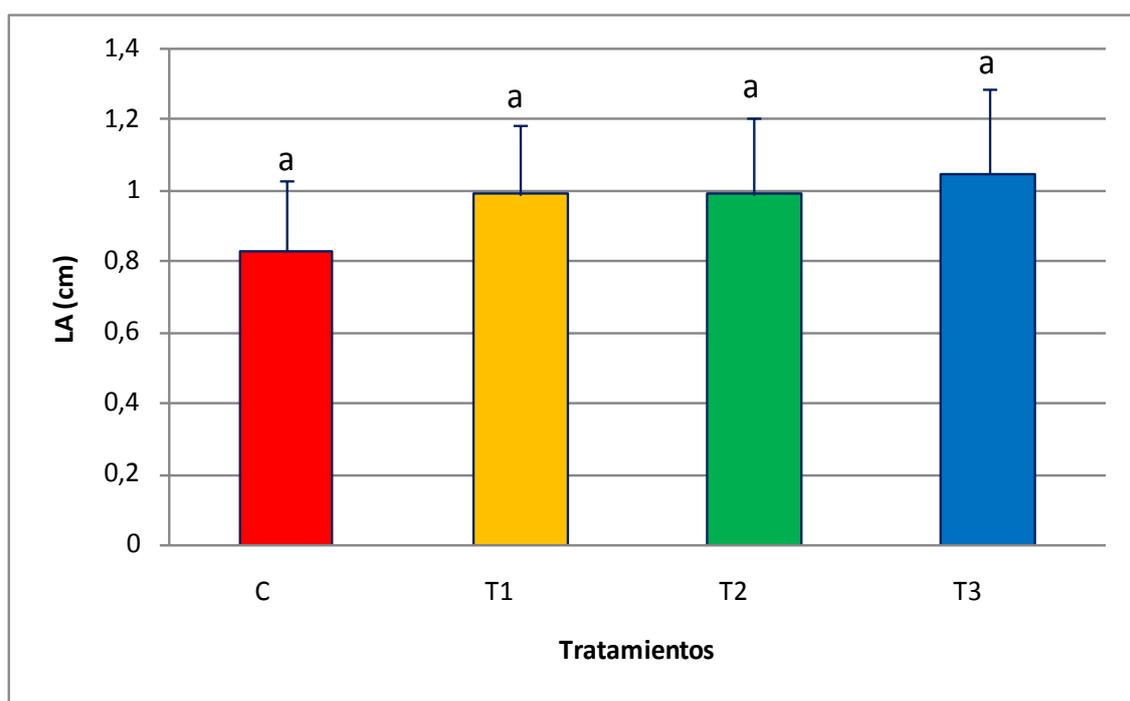


Fig.11: Longitud de la parte aérea (LA) en plántulas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 12 se observa la longitud radical (LR) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas.

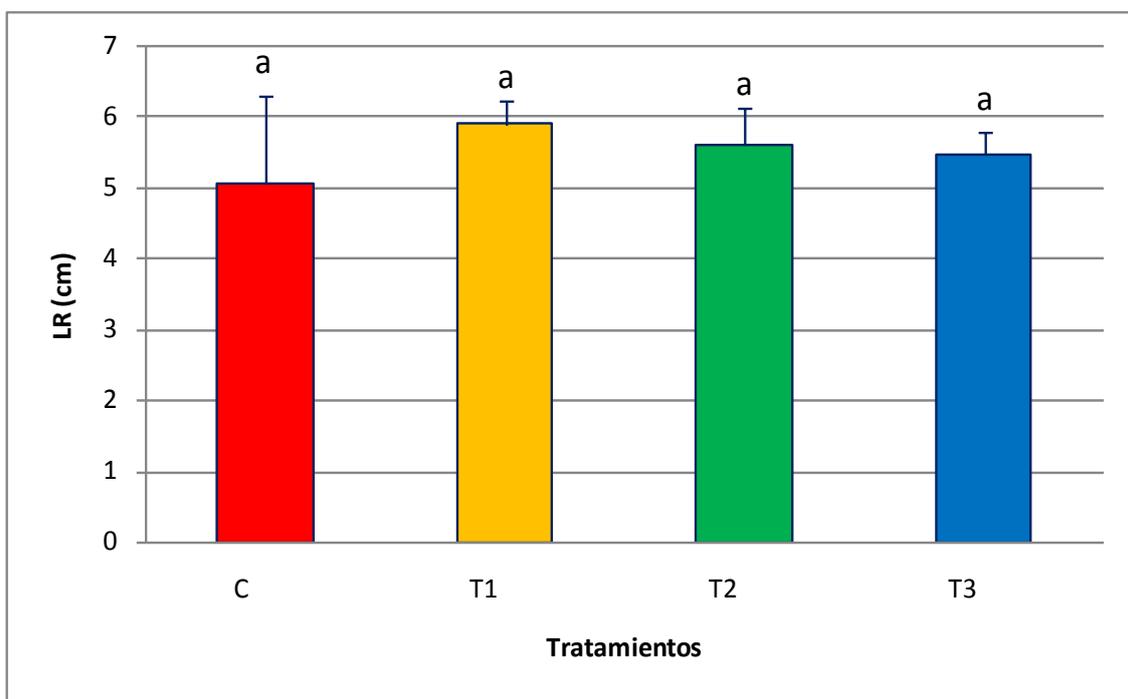


Fig.12: Longitud radical (LR) en plántulas de lechuga en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

2.2. Tomate

En la Fig. 13 se observa la longitud de la parte área (LA) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre ellos.

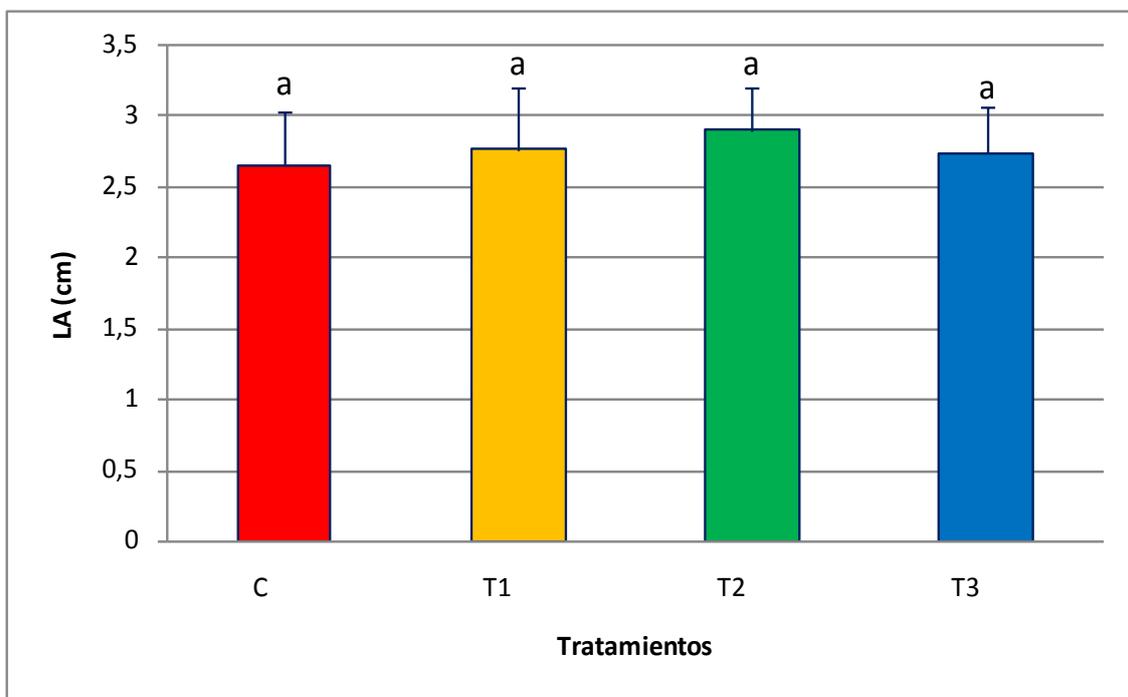


Fig.13: Longitud de la parte área (LA) en plántulas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 14 se observa la longitud radical (LR) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre ellos.

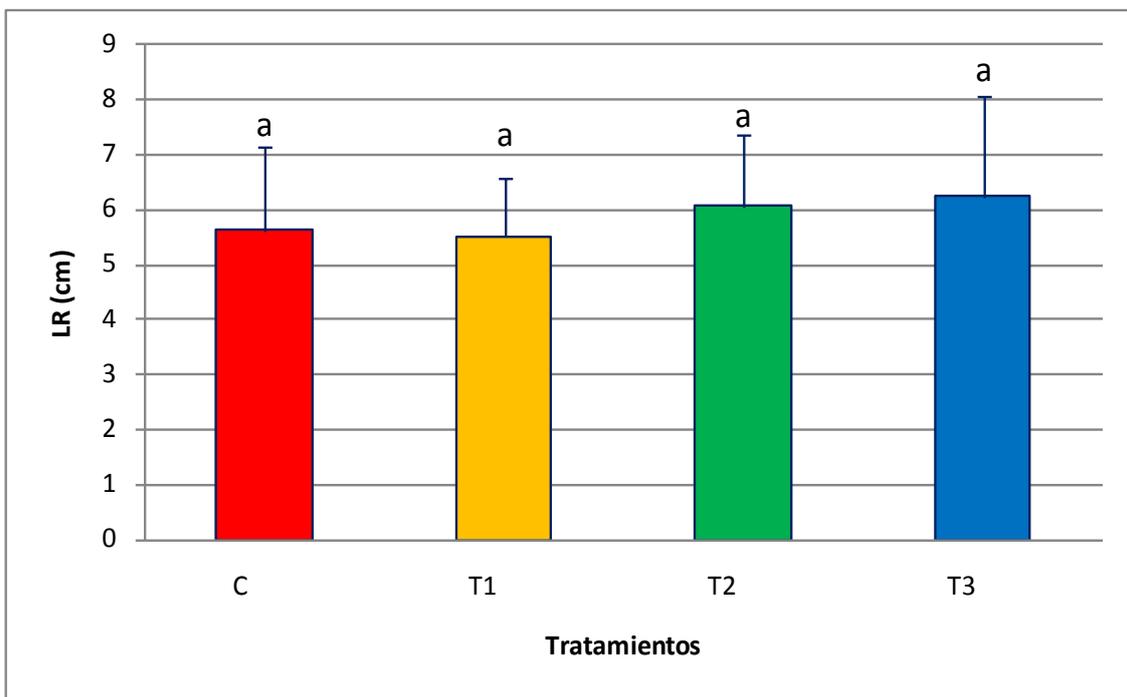


Fig.14: Longitud radical (LR) en plántulas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 15 se observan los pesos frescos de la parte aérea (PFA) en relación a los distintos tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C Y T1 y entre los tratamientos T2 Y T3. Se observaron diferencias significativas entre el T2 Y T3 en relación al C.

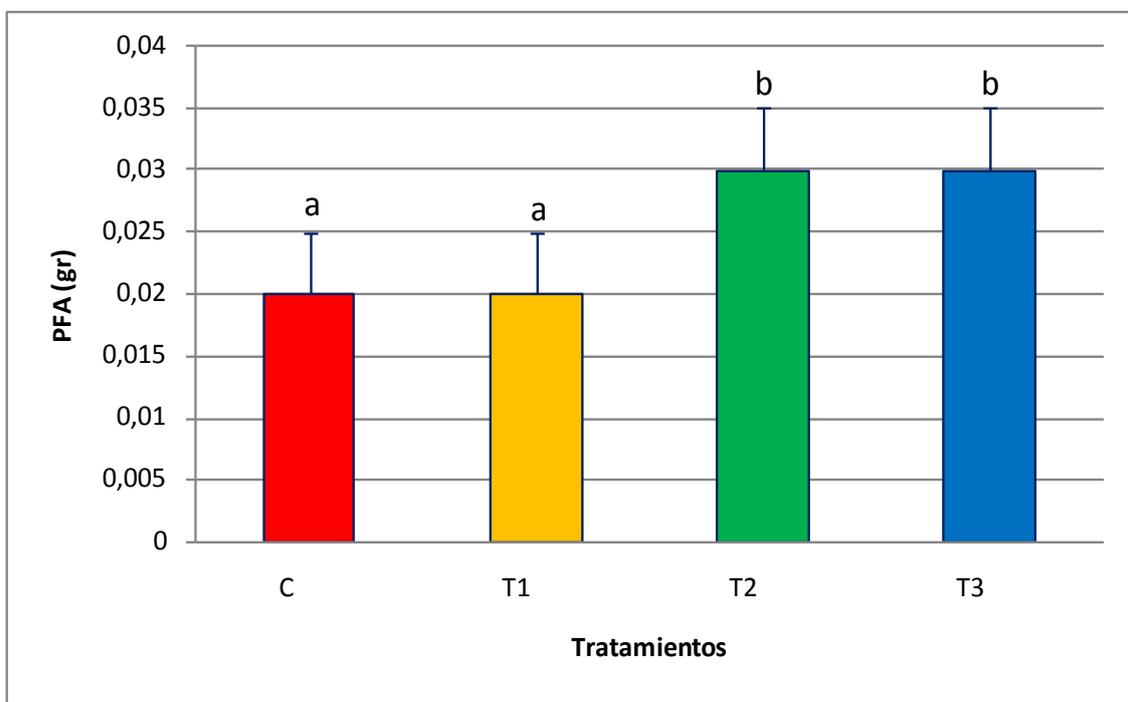


Fig.15: Peso fresco de la parte aérea (PFA) en plántulas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 16 se observa los pesos frescos radicales (PFR) en los distintos tratamientos. El tratamiento de semillas con Az39 + EA mostró un incremento significativo en el PFR, con los mayores valores registrados. El tratamiento T3 (EA) mostró también diferencias significativas con el C, T1 y T2. No se observaron diferencias significativas entre el C y el T1.

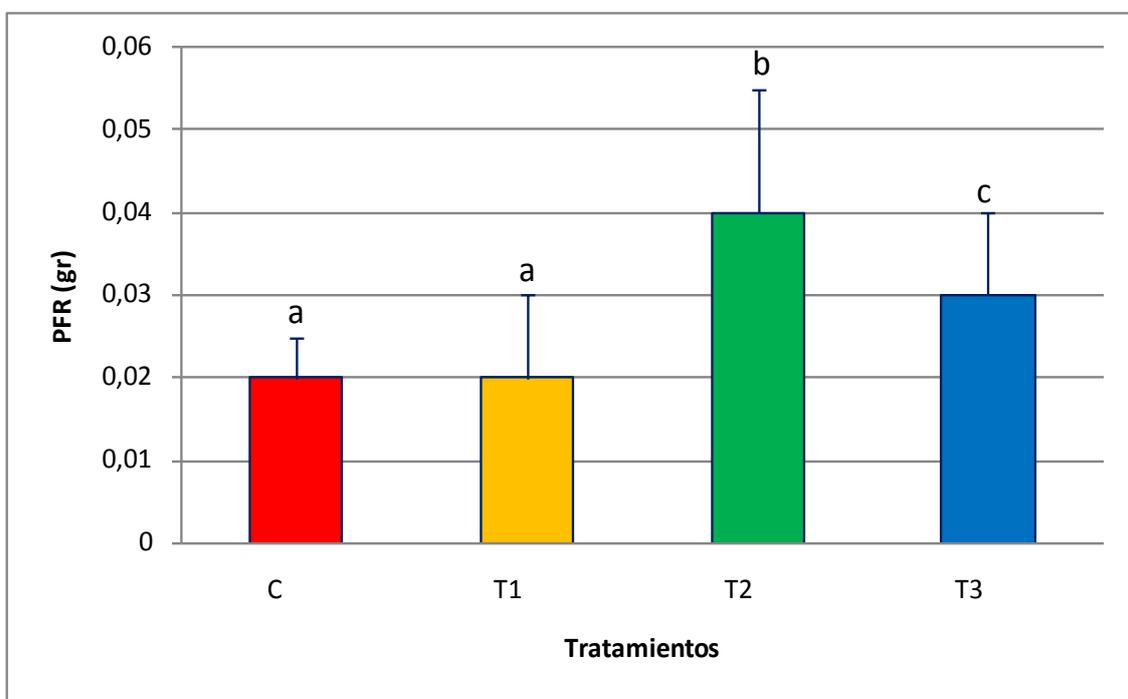


Fig. 16: Peso fresco radical (PFR) en plántulas de tomate en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

2.3. Rabanito

En la Fig. 17 se observa la longitud de la parte aérea (LA) en los distintos tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre C con el resto de los tratamientos. También mostró diferencias significativas T1 con los tratamientos T2 y T3. Los mayores valores se registraron en T2 y T3. No se encontraron diferencias significativas entre T2 y T3.

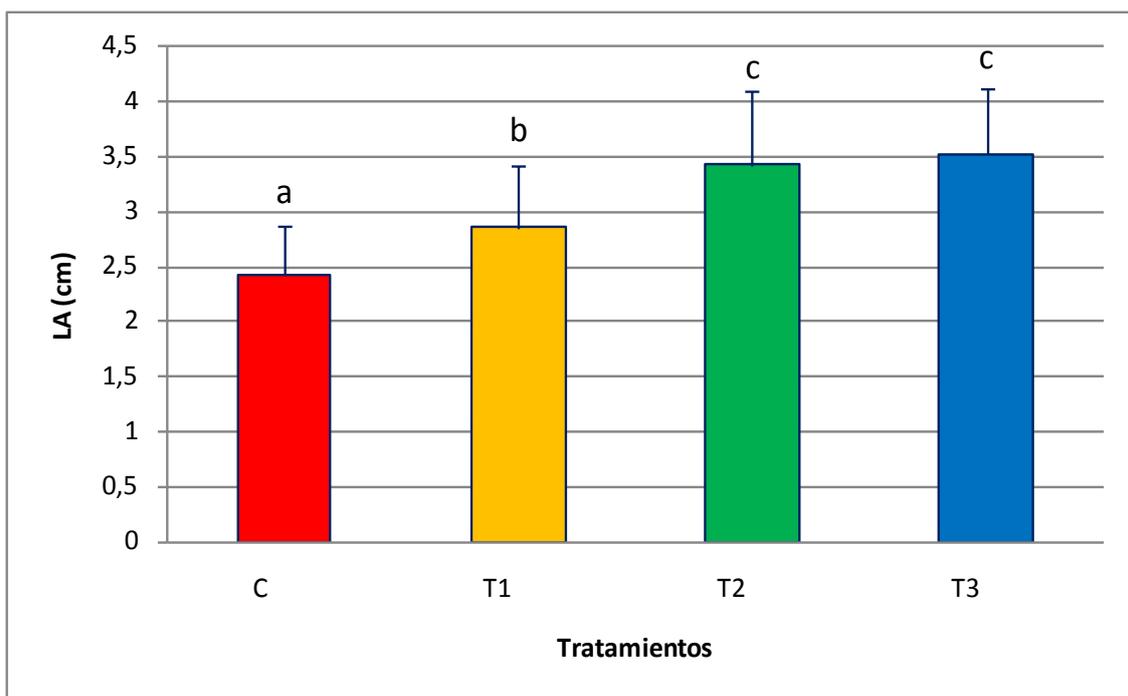


Fig. 17: Longitud de la parte aérea (LA) en plántulas s de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 18 se observa la longitud radical (LR) en los distintos tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre el C y el resto de los tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre los T1, T2 y T3.

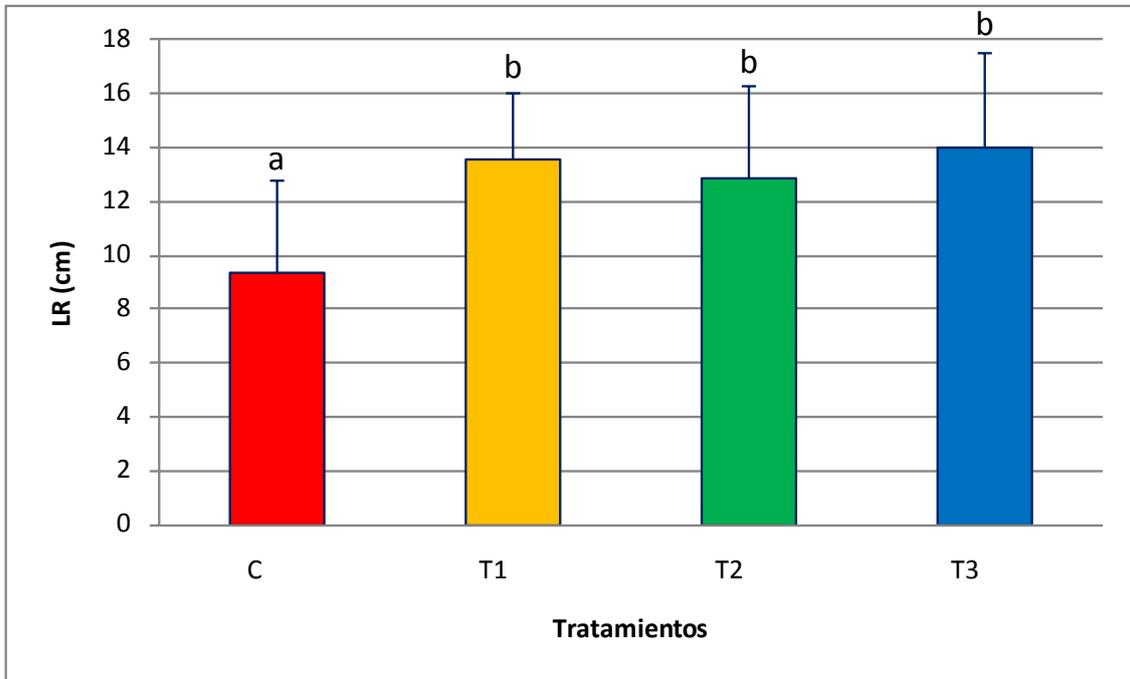


Fig. 18: Longitud radical (LR) en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 19 se observa los pesos frescos aéreos en los distintos tratamientos, no se observaron diferencias significativas entre el T2 y el T3. Se presentaron diferencias significativas entre C y el resto de los tratamientos. El tratamiento T1 mostró diferencias significativas con los tratamientos T2 y T3. Los tratamientos T2 y T3 no mostraron diferencias significativas.

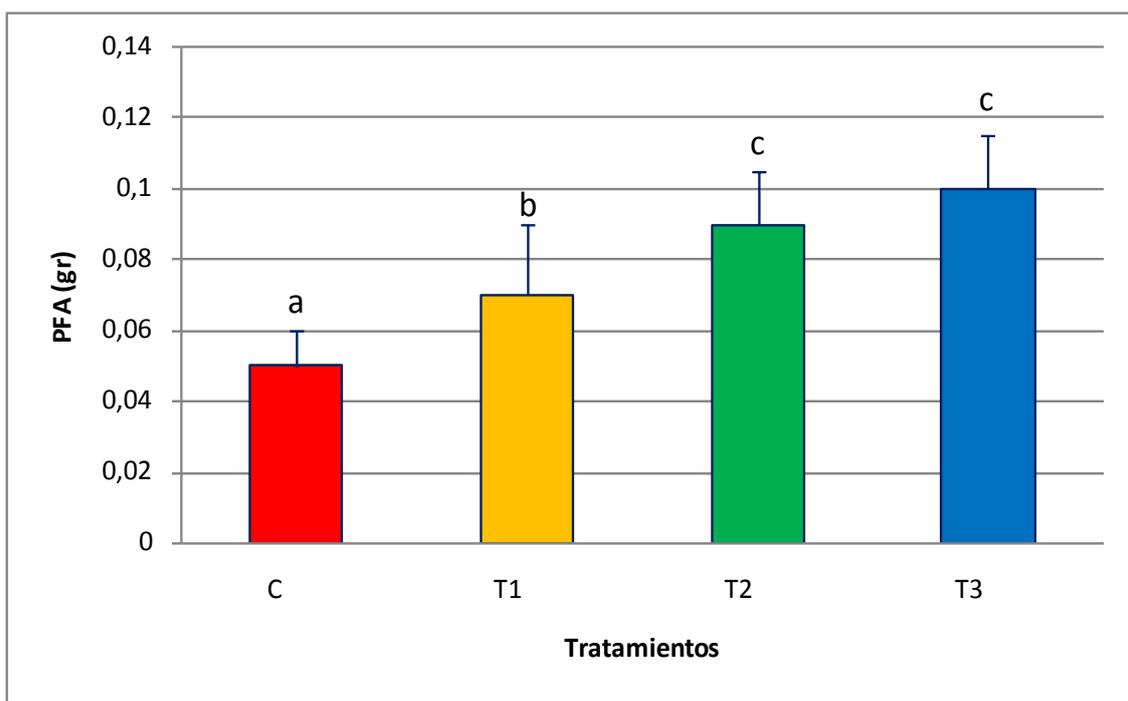


Fig. 19: Peso fresco aéreo en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 20 se observa el peso fresco radical (PFR) en relación a los distintos tratamientos. Se observaron diferencias significativas entre el C y el resto de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre T1, T2 y T3.

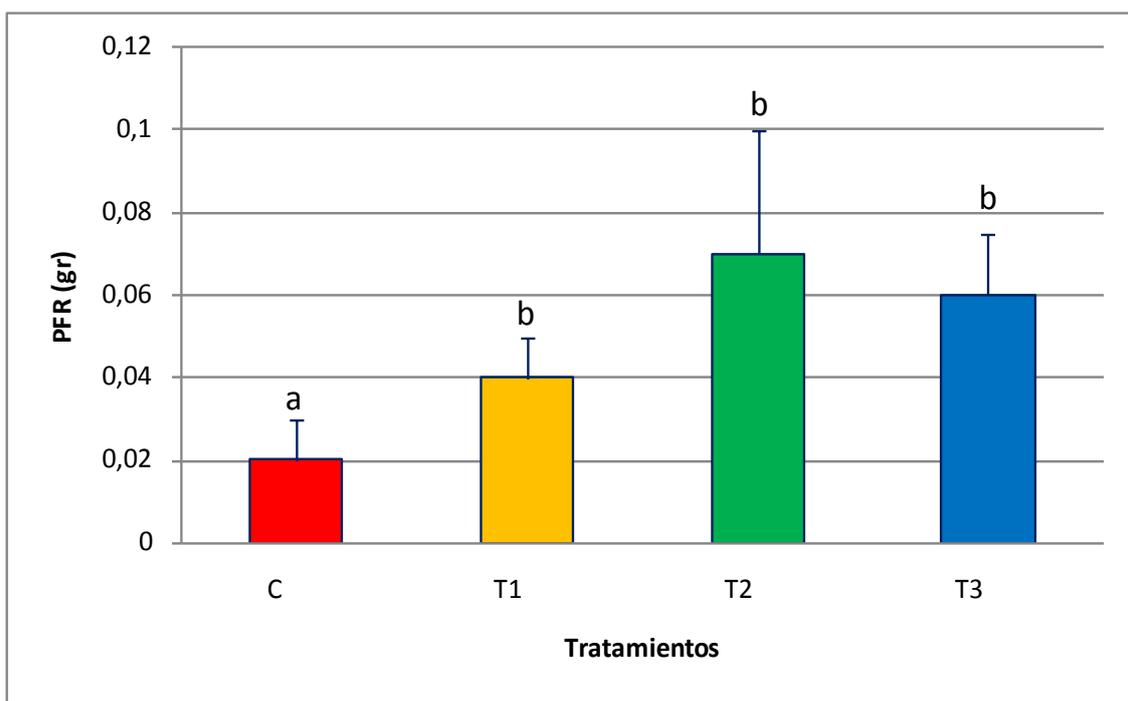


Fig.20: Peso fresco radical (PFR) en plantas de rabanito en relación a los diferentes tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

2.4. Achicoria

En la figura 21 se observa la longitud de la parte aérea (LA) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre ellos.

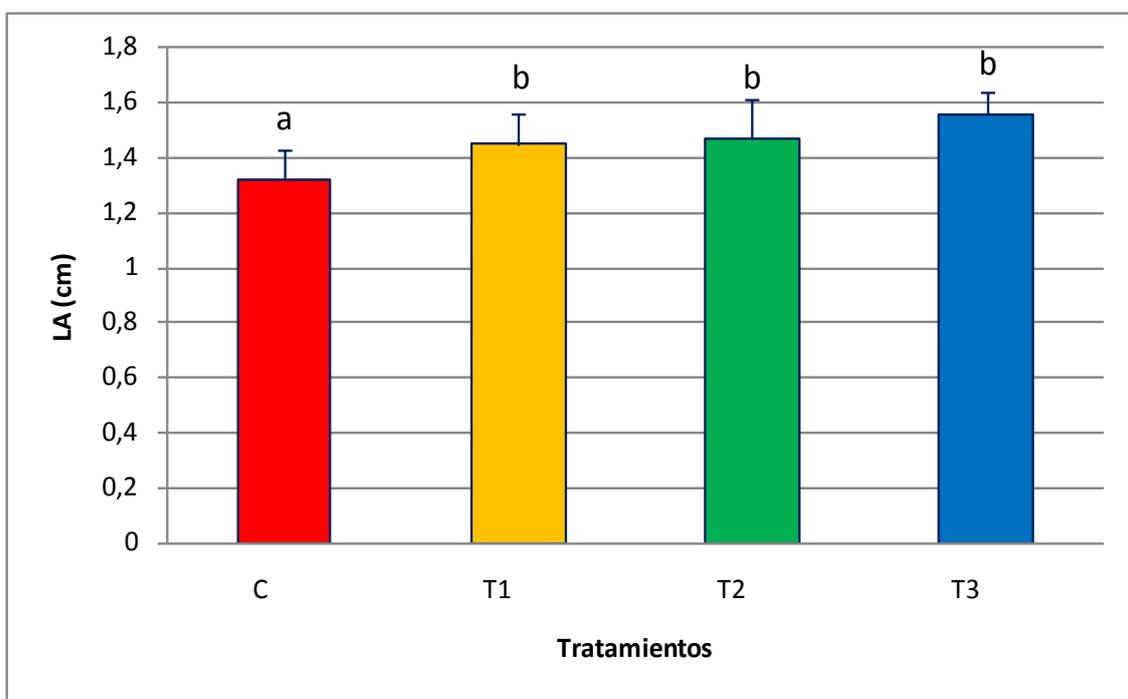


Fig. 21: Longitud de la parte aérea en plantas de achicoria relacion a los distintos tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la figura 22 se observa la longitud área en cm (LR) en los distintos tratamientos, no encontrando diferencias significativas entre ellos.

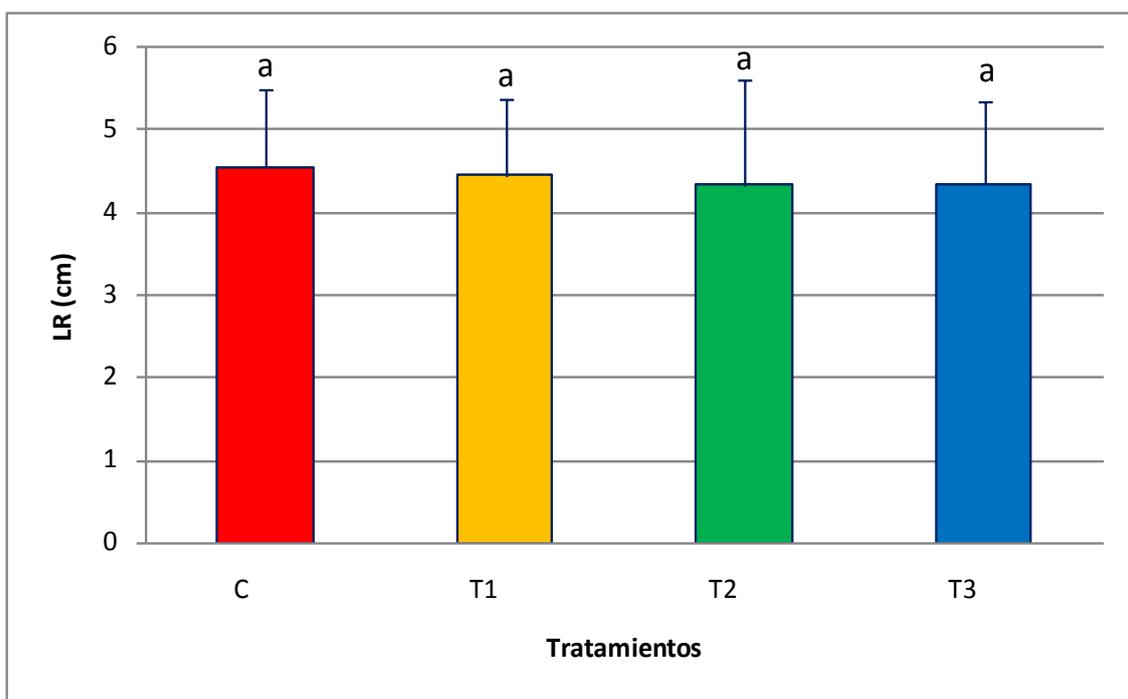


Fig. 22: Longitud radical (LR) en plantas de achicoria relacion a los distintos tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 23 se observa en peso fresco aéreo (PFA) en los distintos tratamientos. La aplicación de EA provocó un incremento significativo en el PFA para T3 respecto al resto de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas entre el C, T1 y T2.

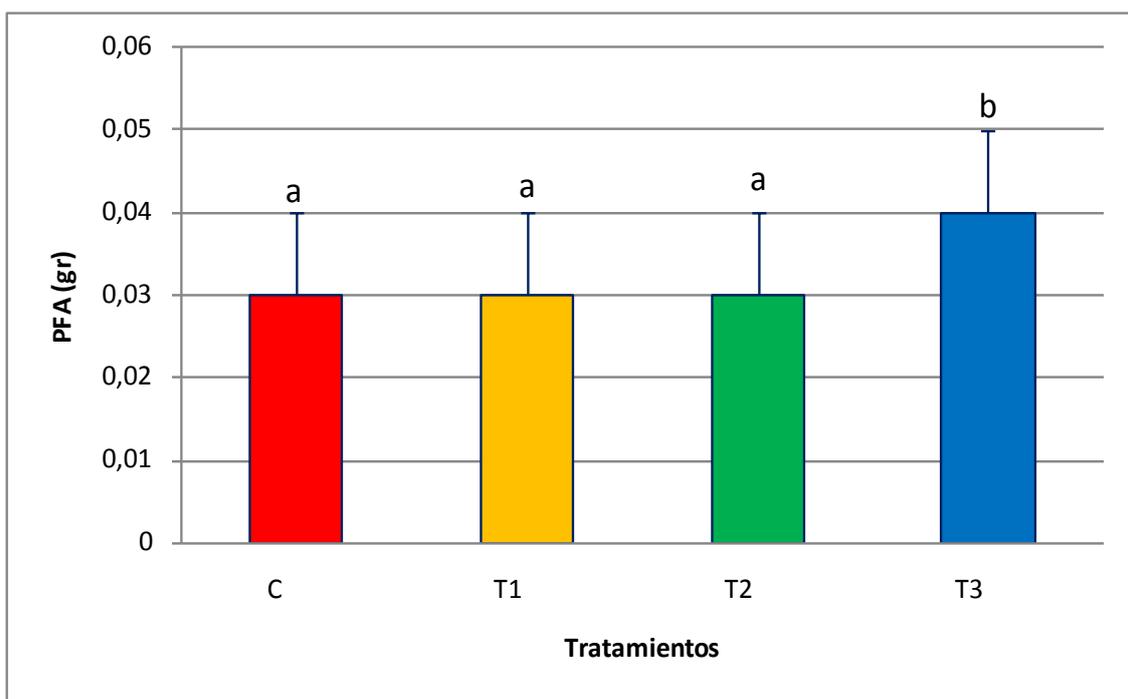


Fig. 23: Peso fresco aereo en plantas de achicoria en relación a los distintos tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

En la Fig. 24 se observa el peso fresco radical (PFR) en los distintos tratamientos, no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

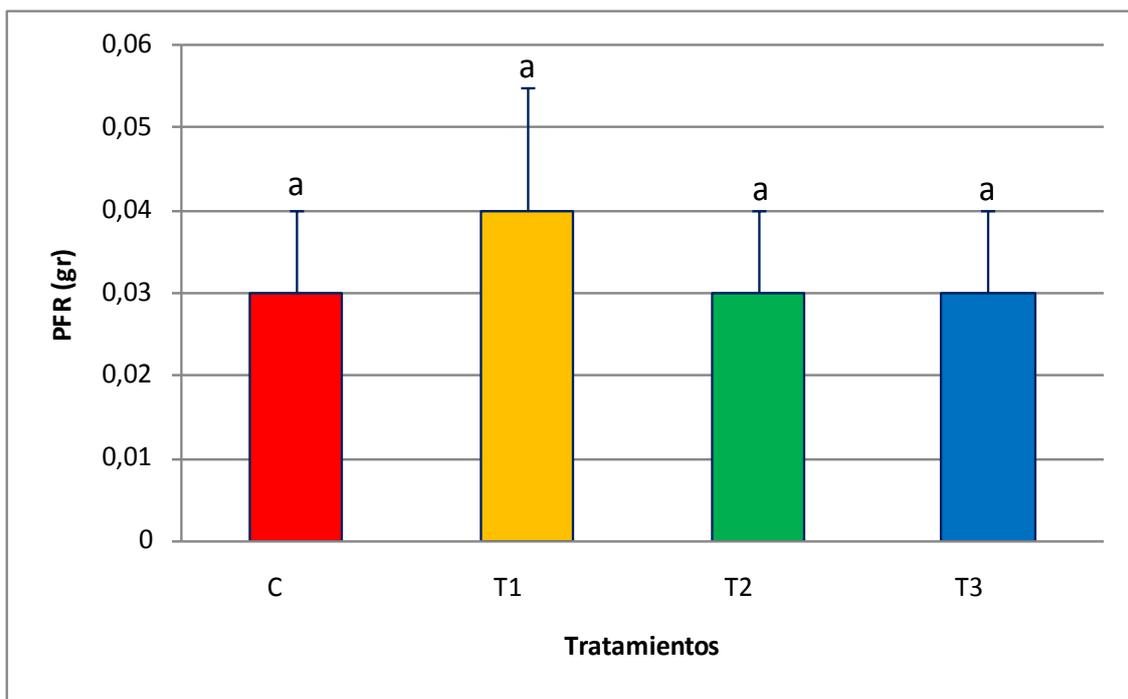


Fig.24: Peso fresco radicalen plantas de achicoria relacion a los distintos tratamientos. Tratamientos: Control: semillas sin inocular; T1: semillas inoculadas solo con AZ39; T2: semillas inoculadas con Az39 + EA; T3: semillas inoculadas solo con EA. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \geq 0,05$).

DISCUSIÓN

La utilización de importantes volúmenes de fertilizantes y/u otros productos químicos, es parte de una rutina de acuerdo a la época del año en el ámbito hortícola. La necesidad de aumento en las dosis de productos y en el número de aplicaciones es una práctica común en estos tiempos. En muchos casos estos productos utilizados son altamente tóxicos para el suelo y aguas subterráneas y no se respetan los tiempos de carencias (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

Sin embargo, existen otras alternativas a estas prácticas, como la biofertilización y el uso de distintos organismos y microorganismos, como algas y/o bacterias, que dentro del panorama agrícola, han tenido éxito y no contaminan (Iglesias *et al.*, 2000). Por lo tanto, profundizar en el uso de bacterias y algas como técnicas para incrementar la producción vegetal es un objetivo de importante relevancia en la actualidad.

Al respecto, los resultados de este trabajo con distintas especies hortícolas, muestran que el tratamiento de las semillas con soluciones conteniendo algas y bacterias incrementa la energía y poder germinativo de las semillas de algunas de las especies estudiadas, tales como el rabanito y lechuga, lo que podría permitir un mejor establecimiento de la planta a la hora del trasplante. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Hernández-Herrera *et al.*, (2014) con extractos de algas pardas, en el que se encontró un mayor porcentaje de germinación cuando se aplicaron tratamientos con *Ulva lactuca* y *Padina gymnospora*.

Los efectos beneficiosos de los extractos de algas marinas pueden deberse a que brindan una mayor humedad de las semillas (Weges y Karsssen, 1990); además, los cambios en el pH y la conductividad eléctrica de los extractos pueden afectar la bioactividad de semillas, como así también a la presencia de fitohormonas, comúnmente encontradas en estos extractos (Briceño -Domínguez, 2011).

En cuanto a los resultados de crecimiento temprano obtenidos en este trabajo, se observó que en la mayoría de las hortalizas analizadas existieron diferencias significativas en los parámetros fisiológicos medidos, principalmente en el peso fresco radical y aéreo. Los tratamientos deco-inoculación con *Azospirillum-Macrocyctis* y con *Macrocyctis* de manera individual produjeron un mayor crecimiento aéreo en rabanito y achicoria, lo mismo sucedió con la longitud radical de rabanito. En el resto de los cultivos los pesos frescos, tanto aéreo como radicales se incrementaron en relación a los controles. Así, esta respuesta podría deberse a que los extractos de algas contienen gran cantidad de nutrientes y reguladores de crecimiento, tales como auxinas, las cuales poseen la función fisiológica de estimular el crecimiento radical.

Si bien se conoce la importancia de estos reguladores o fitohormonas sobre procesos fisiológicos en plantas, el rol fisiológico de estas sustancias en el crecimiento y diferenciación de las algas y por ende la producción de estos compuestos en macroalgas es aún poco conocido (Evans y Trewavas, 1991; Yokoya y Handro, 1997). Existen algunos datos en la literatura en los cuales se ha demostrado la producción de fitohormonas por parte de las algas, tales como auxinas, en concentraciones similares a aquellas registradas en plantas (Reddy *et al.*, 2008).

La identificación de fitohormonas en los extractos de macroalgas (Tarakhovskaya *et al.* 2007; Zhang y Schmidt, 2000) ha llevado a pensar durante mucho tiempo que serían las responsables de todas las respuestas beneficiosas observadas en las plantas. En el cultivo de rabanito se observó una influencia positiva de la bacteria *Azospirillum brasilense* cepa AZ39 de manera individual en todos los parámetros determinados. Este aumento en el crecimiento se presentó en tratamientos conjuntos de alga y bacteria, y bacteria y alga de manera individual, lo que pone de manifiesto que no sólo el alga, sino también las bacterias poseen un efecto estimulador del crecimiento en esta especie. En este sentido, es ampliamente conocido que algunas bacterias promueven el crecimiento vegetal mediante sustancias promotoras, principalmente fitohormonas. Sarabia Ochoa *et al.*, (2010) sugieren que las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) afectan el crecimiento de las plantas ya que proporcionan

compuestos ya sintetizados por ella misma, produciendo beneficios para las plantas. El resultado de esto son compuestos importantes como: nitrógeno, fitohormonas y otros nutrientes como el hierro y el fósforo que se originan naturalmente.

El género *Azospirillum* es productor de fitohormonas como giberelinas, auxinas y citocininas, las cuales promueven el crecimiento vegetal (Helman *et al.*, 2012). Particularmente, *Azospirillum brasilense* cepa Az39 fue seleccionado como uno de los PGPR más eficaz, y se recomienda para su uso en la formulación de inoculantes. Numerosos experimentos a campo han demostrado desde entonces la capacidad de Az39 para aumentar la productividad de los cultivos de cereales como el trigo, el maíz y el sorgo (Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Díaz-Zorita & Grove, 2006). Cuando se evaluaron los mecanismos putativos promotores del crecimiento de plantas con Az39 cultivadas en medio químicamente definido (Perrig *et al.*, 2007), la producción de fitohormonas fue identificada de nuevo como el factor más importante.

Por lo tanto, los resultados de este trabajo confirman el efecto beneficioso y la posibilidad de utilización de *Azospirillum brasilense* cepa Az39 en distintas hortalizas.

Es importante mencionar que la mezcla de algas + bacterias, produjo un incremento en el crecimiento de las plantas de rabanito y tomate si bien no fue mayor al observado con los extractos puros de algas que también produjo efectos benéficos.

La presencia de algas podría servir de soporte para el mantenimiento del estado metabólico y fisiológico de las bacterias. De esta manera, podría servir de estabilización y protección de las células microbianas durante el almacenamiento y transporte (Xavier *et al.*, 2004). Las macroalgas marinas producen ácido algínico el cual es un polímero que es empleado como uno de los materiales sintéticos de elección para la mayoría de las encapsulaciones de microorganismos (Draget *et al.* 2002; Yabur *et al.* 2007). Este ácido es el compuesto más abundante en los extractos de algas, estimula la actividad de microorganismos del suelo, mejora la capacidad de retención de agua del suelo, protege a los fertilizantes químicos de lixiviación o inmovilización y ayuda

a la conservación de la estructura del suelo. Este ácido, conjuntamente con el manitol presente en los extractos, actúan como agentes quelantes secuestrando cationes como aluminio y hierro que precipitan los fosfatos, incrementando la disponibilidad de fósforo para las plantas (Eyras *et al.*, 2008). Varios estudios revelan los efectos beneficiosos de estos extractos cuando son aplicados sobre las plantas.

Por todo lo expuesto, las algas marinas y sus extractos se proyectan como productos capaces de promover el crecimiento de microorganismos beneficiosos para los cultivos y especies de interés, como las hortícolas.

CONCLUSIONES

- 1) La energía y poder germinativo de semillas de lechuga y rabanito aumenta con la inoculación mixta alga-bacteria y extracto de alga de manera individual.

- 2) Los tratamientos de inoculación mixta y extracto de alga de manera individual favorecieron todos los parámetros de crecimiento temprano en rabanito (10 días después de la siembra) ejerciendo un efecto positivo en el crecimiento de dichas plantas

- 3) Los tratamientos de inoculación mixta y extracto de alga de manera individual favorecieron el peso fresco aéreo y radical en cultivo de tomate a los 14 días después de la siembra.

- 4) Los tratamientos de inoculación mixta, extracto de alga y *Azospirillum* de manera individual favorecieron la longitud aérea y el peso fresco aéreo en el cultivo de achicoria a los 14 días después de la siembra.

- 5) El extracto de algas puede servir y ser utilizado como agente de soporte para el mantenimiento del estado fisiológico de las bacterias, probablemente por la capacidad de las algas de producir alginatos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Agricultural importance of algae. *African Journal of Biotechnology*, 11(54), 11648-11658.
- Acleto, O. (1986). *Algas Marinas del Perú de Importancia Económica*. 2da Ed. Pub. Museo Historia Natural Serv. Divul. No 5-1-140.
- Acleto, O. C., & Zuñiga, R. (1998). *Introducción a las algas*. Editorial Escuela Nueva.
- Agardh, C. A. (1820). *Species algarum*, vol. 1. iv+ 168 pp. Berling, Lund.
- Agüero, D., & Grosso, L. (2004). *El sector hortícola del cinturón verde de Río Cuarto*. Río Cuarto: Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN: 950-665-266-x.
- Bertolotti, M. I., Piergentili, G. V., & Cabut, D. A. (1987). El sector pesquero argentino. *Investigación Pesquera*, 52(sup. 2), 193-221.
- Bima, P.; Fontán, H.; Ocampo, A. (2014). *Sistemas de producción de cultivos intensivos*. Fac. de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Boraso, A., & Zaixso, J. M. (2011). Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y el Mar Argentino. *Algas marinas bentónicas*, 1-28.
- Casas, R. (2011). Los procesos de degradación y la conservación de suelos. *Revista Materiales* 4:1-5.
- Colamarino, I.; N. Curcio, F. Ocampo y C. Torrande (2006). *La Producción Hortícola en la Argentina*. SAGPyA.
- Coscia, A. (1998). La agriculturización en la región pampeana. En: *Degradación de suelos por intensificación de la agricultura*. Informe del Taller

organizado por el CONICET. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación Miscelánea N° 47.

Díaz-Zorita M., J. Grove. (2006). Wheat grain response to nitrogen fertilization and field inoculation with a liquid formulation of *Azospirillum brasilense*, ASA-CSSA-SSSA Abstracts of International Annual Meetings, Indianapolis, U.S.A. 25031.

Díaz-Zorita M., R. Baliña, M. Fernández-Canigia, C. Penna, A. Peticari. (2004). Field inoculation of wheat and maize with a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* in the Pampas, Argentina, ASA-CSSA-SSSA Abstracts of International Annual Meetings, Seattle, U.S.A. 4898.

Draget K.I., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. (2002). Alginates from algae. In: Steinbüchel A, De Daets S, Vandame EJ (eds) Biopolymers. vol. 6: Polysacharides II. Wiley-VCH, Weinheim, pp 215–240.

Evans, L. V., y Trewavas, A. J. (1991) Is algal development controlled by plant growth substances?. *Journal of Phycology*. 27, 322 -326.

Evans, L.V. y A.J. Trewavas (1991). Is algal development controlled by plant growth substances? *J. Phycol.* 27:322-326.

Eyras, B.; Defosse, M.; Dellatorre, F. (2008). Seaweed compost as an amendment for horticulture soils in Patagonia, Argentina. *Compost Sci. Util.* 16:119-124.

Ferlini, H. A., Díaz, S. C., Traut, C. O., & Fe–Argentina, S. (2006). Beneficios del uso de inoculantes sobre la base de *Azospirillum brasilense* en cultivos extensivos de granos y forrajes. Dpto. Castellanos-Pcia. de Santa Fe) disponible en línea: [http://www. engormix. com/MA-agricultura/soja/articulos/beneficios-uso-inoculantes-sobret795/415-p0.htm](http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/beneficios-uso-inoculantes-sobret795/415-p0.htm)). Consultado, 18(11), 2010.

García, M., & Kebat, C. (2008). Transformaciones en la horticultura platense.

- Gireesh, R., C. K. Haridevi, and J. Salikutty. (2011). "Effect of *Ulva lactuca* Extract on the Growth and Proximate Composition of *Vigna unguiculata* L. Walp." *Journal of Reseach in Biology* 1 (8): 624–30.
- Godfray, H.C. J.; Beddington J.R.; Crute, I.R.; Haddad, I.; Lawrence I., Muir, J.F. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327(5967):812-818.
- González, L. M. (2002). Reflexiones sobre los mecanismos generales de adaptación de las plantas a la salinidad y a otros tipos de estrés, alimentaria. *Dic.* 339: 99-102
- Helman Y, Burdman S, Okon Y. (2012). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In Rosenberg E and Gophna U (eds.), *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 89-103.
- Helman, Y.; Burdman, S.; Okon, Y. (2012). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: Rosenberg E. and Gophna U. (eds.), *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 89-103.
- Henry, Guy; Pahun, Jeanne y Trigo, Eduardo. (2014). La Bioeconomía en América Latina: oportunidades de desarrollo e implicaciones de política e investigación. *FACES*, 20(42-43), 125-141. ISSN 0328-4050
- Hernández-Díaz, M.I.; Chailloux-Laffita, M. (2001). La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas de Ciencia y Tecnología* 5:11-27.
- ISTA. (2006). International rules for seed testing. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- Kastner, T.; Rivas, M.J.I.; Koch, W.; Nonhebel Y. S. (2012). Global changes in diets and the consequences for land requirements for food. *PNAS* 109(18):6868-872.

- La Horticultura en la Argentina. Ministerio de Educación. Presidencia de la Nación. (2010). INET.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Lotter, D.W. (2003). Organic agriculture. *J. Sustain. Agric.* 21(4)
- OIT. (1993). Guía sobre seguridad y salud en el uso de productos agroquímicos. Ginebra.
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Perrig D. L., Boiero, O. Masciarelli, C. Penna, O. Ruíz, F. Cassán, V. Luna. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75. 1143–1150.
- Reddy, D. V. Elanchezhian, N. (2008). Evaluation of tropical tree leaves as ruminant feedstuff based on cell contents, cell wall fractions and polyphenolic compounds. *Livest. Res. Rural Dev.*, 20 (5): 77.
- Sal, A. G., García, A. G., Doña, H. La cultura del patio como soporte de agricultura familiar en América tropical. *Agricultura familiar y huertos urbanos*, 74.
- Sarabia-Ochoa M, Madrigal-Pedraza R, Martínez-Trujillo M, Carreón-Abud Y (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12(1):65-71.
- SEAE, Sociedad Española de Agricultura Ecológica. (2008). La Fertilización y el balance de Nutrientes en Sistemas Agroecológicos. Catarroja (Valencia) Diciembre 30, 2008.

- Tarakhovskaya E., Maslov Y.U., and Shisova M. (2007). Phytohormone in Algae. *Russian Journal of Plant Physiology*. 54:163-170.
- Weges, R., & Karssen, C. M. (1990). The influence of redesciccation on dormancy and K⁺ leakage of primed lettuce seeds. *Israel journal of botany*,39(4-6), 327-336.
- Xavier I.J., Holloway G., Leggett M. (2004). Development of rhizobial inoculant formulations.doi:10.1094/CM-2004-0301-06-RV.
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/develop/>.
Accessed 17 May 2013
- Yabur R., Bashan Y., Hernández-Carmona G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J Appl Phycol* 19:43–53
- Yokoya NS, Handro W (1997). Thallus regeneration and growth induced by plant growth regulators and light intensity in *Grateloupia dichotoma* (Rhodophyta). In Kitamura T (ed.) *Proceedings of I.T.I.T. International Symposium on New Technologies from Marine-Sphere*. Takamatsu: Shikoku National Industrial Research Institute, p. 83-86.
- Yokoya, N. S., & Handro, W. (1996). Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327, 393- 400
- Zhang, X. and R.E. Schmidt. (2000). Hormone-containing products impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop. Sci.*, 40:1344-1349.