



Ministerio de Educación Superior
Universidad de Granma
Facultad de Ciencias Agrícolas
Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal



Universidad Técnica de Cotopaxi
Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias,
y Recursos Naturales
Especialidad Ingeniería Agronómica

Trabajo de Diploma

*Selección de cepas de *Azospirillum* spp. como
biofertilizante de *Zea mays*, L. bajo estrés
salino.*

Autor: Carlos Alberto Sangoquiza Caiza

Tutor: Lic. Yosvel Viera Tamayo, M. Sc.

“Año 53 de la Revolución”
Cuba-Ecuador
2011

DEDICATORIA:

Primeramente Quiero Agradecer A Dios Por La Bendición De Contar Con Una Familia, Agradecerles A Mis Padres Jorge Y Dolores Por Todo Su Apoyo Y Cariño Que Me Han Brindado Durante Todos Mis Estudios Los Admiro Mucho Han Sabido Inculcar En Mí El Deseo De Supuración, Y Mucho Trabajo Es Por Ello Que Este Trabajo Que Lo Lleve Con Mucha Dedicación Y Esfuerzo Les Dedico A Ustedes Un Dios Les Pague Padres Queridos Por Permitirme Cumplir Una De Mis Metas Trazadas En Mí Vida Tal vez No Les Diga Muy A menudo Pero Los Quiero Con Toda Mí Alma.

De Igual Manera Quiero Dedicar Este Trabajo A Alguien Que Ya No Se Encuentra A Mí Lado Pero Que Se Desde El Cielo Me Escucha Y Me Guía Por El Camino Del Bien Manuelita Que En Paz Descanses Esto También Es Fruto De Tu Esfuerzo Y Dedicación De Una Abuela Que Siempre Estuvo Al pendiente De Mis Estudios Y De La Que No Me Pude Despedir Por Culminar Con Este Mí Trabajo De Tesis Fuera Del País Para Mí Siempre Estarás Viva En Lo Más Profundo De Mí Corazón.

A Mis Hermanos Queridos Luis Y Margoth Agradecerles Por Su Cariño Y Comprensión Por Estar A Mí Lado Apoyándome En Las Buenas Y En Las Malas Sigan Adelante En Sus Estudios En Mí Siempre Tendrán un Hermano En El Cual Pueden Contar Para Todo Los Quiero Mucho.

Y Para Concluir Quiero Ocupar Este Párrafo Para Hacerle Partícipe De Este Trabajo A Una Persona Muy Especial En Mí Vida Y En Mí Corazón Mónica Isabel Gracias Mí Amor Por Compartir A Mí Lado Mí Niñez Mí Adolescencia Y Mí Juventud Apoyándome En Toda Esta Mí Carrera De Estudios.

Gracias A Toda Mí Familia Que Dios Los Bendiga Y Que Este Sea El Primer Triunfo De Muchos Que Vendrán Con Cariño Padres Queridos Su Hijo Carlos Alberto Sangoquíza Caíza

AGRADECIMIENTOS

En Primer Lugar Quiero Agradecer A La Universidad Técnica De Cotopaxí Por Formarme Como Una Persona Llena De Valores Y Profesionalmente, Agradecer A Cada Uno De Los Profesores Que Me Brindaron Su Amistad Y Su Conocimientos Dentro De Las Aulas.

Al Instituto Nacional Autónomo De Investigaciones Agropecuarias Iniap Santa Catalina Dirigida Por La Dra. Gioconda García Por Permitirme Culminar Con Este Mi Trabajo De Tesis Fuera Del País.

Al Programa De Maíz Dirigido Por El Ing. Carlos Yáñez Muchas Gracias Por Su Apoyo Y Por Permitirme Forma Parte De Uno De Los Mas Importantes Programas Dentro De La Estación Santa Catalina

Agradecerles De Todo Corazón Al Agro. Jorge Heredia, Ing. Javier Noroña, Ing. Francisco Clavijo, Técnicos Del Programa De Maíz Por Apoyarme En El Transcurso De La Tesis Con Sus Conocimientos Y Por Brindarme Su Amistad A Mis Queridos Amigos El Cual Pusieron un Granito De Arena Para Que Este Trabajo Se Lleve De La Mejor Manera: Byron Quimbíta, Andrea Carrera, Alex Cool, Gabriela Ortiz, Yolanda Pallo Gracias Por Su Amistad Y Su Apoyo A La Universidad De Granma Cuba Por Permitir Realizar Mi Trabajo De Grado En Sus Predios Universitarios

A Mi Tutor De Tesis MSc. Yosvel Viera Por Contribuir A La Ejecución De Este Trabajo, Siendo Su Ayuda De Gran Importancia Para El Mismo.

A La Dirección Y Al Personal De Biotecnología Vegetal De La Universidad De Granma Cuba Facultad De Ciencias Agrícolas Por Contribuir Con Sus Conocimientos Y Su Valiosa Ayuda.

RESUMEN

El maíz es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el segundo lugar después del trigo. Son insuficientes los estudios sobre la evaluación del efecto de la adición de *Azospirillum* en la mitigación de los daños provocados por la salinidad en plantas de maíz. El presente trabajo tiene como objetivo seleccionar la cepa de *Azospirillum* a emplear como biofertilizante en el cultivo de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo) en suelos con estrés salino. Se evaluó *in vitro* el rango de tolerancia a la salinidad de plantas de maíz, se caracterizaron fenotípicamente las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp. y se evaluó el efecto de la adición de las cepas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en la tolerancia a la salinidad de plantas de maíz, en condiciones semi-controladas. Los resultados revelaron que las plantas evaluadas son tolerantes a la salinidad hasta 4 dS/m. Las tres cepas de *Azospirillum* spp. se desarrollan a temperaturas entre 18-48 °C y crecen bien a pH entre 7-9. Las cepas C₂ y C₃ muestran un buen crecimiento hasta 3.5 % (m/v) de NaCl, mientras que la cepa C₄ mostró ser menos tolerante. Las combinaciones C₂+C₃ y C₄ aumentaron en un 50 % el promedio de las variables morfológicas de las plantas de maíz. Se seleccionaron las combinaciones de cepas C₂+C₃ y C₄ como promisorias para la futura producción de un biofertilizante capaz de mitigar los daños causados por la salinidad en plantas de maíz cultivadas en suelo ligeramente salino.

ABSTRACT

Corn is one of the most economically important cereals in the world, ranking second after wheat. There are insufficient studies to estimate the effect of the addition of Azospirillum in mitigating the damage caused by salinity in maize plants. This paper aims to select the strain of Azospirillum to be used as biofertilizer in maize (*Zea mays* L. var. Tayuya) in soils with salt stress. Was evaluated in vitro the range of salinity tolerance of maize plants are phenotypically characterized strains C2, C3 and C4 of Azospirillum spp. and assessed the effect of the addition of strains of Azospirillum spp. and their combinations in salinity tolerance of maize plants in semi-controlled conditions. The results revealed that plants evaluated are tolerant to salinity up to 4 dS / m. The three strains of Azospirillum spp. develop at temperatures between 18-48 ° C and grow well at pH 7-9. C2 and C3 strains showed good growth up to 3.5% (m / v) NaCl, while the C4 strain proved less tolerant. The combinations C2 + C3 and C4 increased by 50% the average of the morphological variables of corn plants. Combinations were selected from strains C2 + C3 and C4 as promising for future production of a biofertilizer able to mitigate the damage caused by salinity in maize plants grown in saline soil lightly.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.	Cultivo del maíz (<i>Zea mays</i> , L.).....	5
2.1.	Origen, taxonomía, distribución geográfica y producción del maíz.....	5
2.2.	Labores culturales del cultivo del maíz.....	6
2.3.	Variedades e híbridos.....	8
2.3.1.	Variedades e híbridos cultivados en Cuba y Ecuador.....	9
2.4.	Características de <i>Zea mays</i> , L. var. Tayuyo.....	9
2.5.	El género <i>Azospirillum</i>	10
2.5.1.	Hábitat del género <i>Azospirillum</i>	10
2.5.2.	Aislamiento e identificación.....	10
2.1.2.	Ambiente rizosférico.....	11
2.2.	Biofertilizantes.....	11
2.6.1.	Importancia de <i>Azospirillum</i> en el cultivo del maíz.....	12
2.7.	Salinidad.....	13
2.7.1.	La salinidad en la agricultura. Problema general de los suelos salinos.	13
2.7.2.	Situación de la salinidad en Cuba - Ecuador.....	14
2.7.3.	Recuperación de suelos salinos o salinizados.	15
2.7.4.	Efectos de la salinidad sobre los cultivos.	16
2.7..5.	Efectos de la salinidad sobre la fisiología de la planta.....	17

2.7.6. Mecanismos generales de adaptación de las plantas a la salinidad.....	20
2.7.7. Clasificación de los suelos según el grado de salinidad.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
3.1. Tolerancia a la salinidad de <i>Zea mays</i> , L. var. Tayuyo en condiciones <i>in vitro</i>	25
3.1.1. Porcentaje de germinación.....	26
3.1.2. Número de raíces.....	26
3.1.3. Longitud de la mayor raíz/planta.....	26
3.1.4. Altura de planta.....	27
3.1.5. Número de hojas/planta.....	27
3.1.6. Porcentaje de peso húmedo de plantas.....	27
3.1.7. Tolerancia a la salinidad.....	27
3.2. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Azospirillum</i> spp.....	27
3.2.1. Caracterización micro-morfológica de cepas de <i>Azospirillum</i>	28
3.2.2. Caracterización macro-morfológica de cepas de <i>Azospirillum</i>	28
3.2.3. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. frente a estrés por temperatura.....	28
3.2.4. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. frente a estrés por Ph.....	29
3.2.5. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. frente a estrés por salinidad..	30
3.3. Efecto de la adición de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. en la tolerancia a la salinidad de <i>Zea mays</i> , L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas.....	31
3.3.1. Toma de muestra de suelo.....	31
3.3.2. Análisis físico-químico del suelo.....	31
3.3.3. Porcentaje de emergencia.....	33

3.3.4. Altura de plantas.....	33
3.3.5. Porcentaje de hojas/plantas.....	33
3.3.6. Porcentaje de peso húmedo de plantas.....	34
3.3.7. Porcentaje de peso seco de plantas.....	34
3.3.8. Porcentaje de enraizamiento.....	35
3.3.9. Porcentaje de peso húmedo de raíces.....	35
3.3.10. Porcentaje de peso seco de raíces/planta.....	36
3.3.11. Tolerancia a la salinidad.....	36
3.3.12. Evaluación de la densidad poblacional de las cepas de <i>Azospirillum</i> spp.	36
3.5. Análisis estadístico.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1. Tolerancia a la salinidad de <i>Zea mays</i> , L. var. Tayuyo en condiciones <i>in vitro</i>	39
4.2. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Azospirillum</i> spp.	49
4.3. Efecto de la adición de cepas de <i>Azospirillum</i> spp. en la tolerancia a la salinidad de <i>Zea mays</i> , L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas.	54
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. RECOMENDACIONES.....	70
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	71
VIII. ANEXOS.....	85

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*, L.) es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el segundo lugar después del trigo. Constituye el alimento del 15 al 20 % de la humanidad y se cultiva en más de 70 países. Es el cultivo con mayor distribución en todo el mundo pues, aunque su zona fundamental es el continente americano, se cultiva en los cinco continentes (Permuy, 2005).

Las producciones de maíz en Cuba no se consideran estables, sin embargo, se siembra como promedio histórico más de 12 mil hectáreas anuales del cultivo (Ramos, 2007). En Ecuador La superficie cosechada de maíz de altura en seco y choclo fue de 202.966 ha con una producción total de 212.699 tm. y un rendimiento promedio de 0.95 tm/ha (INEC, 2009).

Más de 800 millones de hectáreas de tierras cultivables en el mundo están afectadas por la salinidad (FAO, 2008). Estas representan más del 6 % del total de tierras cultivables.

El mayor reto del mejoramiento es el incremento sostenido del potencial genético de las variedades para condiciones de estrés y bajos insumos. El mejoramiento genético para los cultivos más importantes constituye una vía estratégica para la alimentación de la población, en un mundo donde escasean cada vez más los alimentos, lo que constituye un medio de influencia política y comercial (Cornide, 2002).

Cuba como país caribeño con problemas comunes a las áreas costeras de la región, tiene como línea principal el estudio de los mecanismos de resistencia al estrés, tales como, enfermedades, sequía, salinidad, el aprovechamiento del agua y la fijación de nitrógeno (Cervantes *et al.*, 2002).

En el suroeste cubano, específicamente en la provincia de Granma existen alrededor de 228 mil ha de suelos agrícolas afectadas por la salinidad (González *et al.*, 2002), por lo cual los rendimientos de cultivos como el maíz (*Zea mays*, L.) han sido afectados. Diversos métodos han sido utilizados para disminuir los perjuicios de las sales en suelos y aumentar la calidad

agropecuaria de estos. Sin embargo, mucho de estos métodos se caracterizan por sus altos costos, por traer como consecuencias problemas secundarios como la sodicidad, e incluso la afectación del medioambiente (Gómez *et al.*, 2008).

Es por ello que han existido tendencias de incluir métodos biológicos y de manejo agro técnico, como la rotación de cultivos, uso de materiales orgánicos y abonos verdes. Otra de las alternativas es la utilización de especies y variedades que presenten altos niveles de tolerancia, sustituyendo aquellas con mayor susceptibilidad; y el uso de microorganismos benéficos (González *et al.*, 2002). Una alternativa ecológica para suplir esta necesidad es el empleo de microorganismos benéficos.

Actualmente, se reporta una gran cantidad de microorganismos cuya aplicación al suelo es beneficiosa. Algunos microorganismos tienen la capacidad de fijar nitrógeno (*Rhizobium* y *Azospirillum*), promover el crecimiento de las planta, e incrementar los niveles de asimilación de nutrientes (Saura *et al.*, 2003). Diferentes trabajos han demostrado la eficiencia del uso de la bacteria *Azospirillum* en el rendimiento de los cultivos a través de la fijación biológica del nitrógeno y la producción de reguladores de crecimiento de plantas (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006).

Azospirillum es una bacteria diazotrófica del grupo de las gram-negativas, fijadoras de nitrógeno, productor de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas (Burdman, 2000). Las características anteriores hacen de este género bacteriano una alternativa potencial como biofertilizante.

En Ecuador, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ha realizado estudios con *Azospirillum* spp. en campo e invernadero. En el año 2003, se realizó una recolección de muestras de suelo y raíces de las principales zonas maiceras del centro sur de la sierra, lográndose aislar y cuantificar nueve cepas de *Azospirillum* spp., entre las que se encontraban las cepas C₂, C₃ y C₄ (Espinoza, 2004). En otro estudio, las nueve cepas fueron inoculadas en dos variedades de maíz en

condiciones de invernadero y campo. En condiciones de invernadero se observó un mejor crecimiento de la parte radicular y una mayor altura de planta en la mayoría de las inoculadas. En pruebas con semillas pregerminadas se observó mayor porcentaje de emergencia y vigor en las plantas inoculadas con respecto al testigo. En condiciones de campo se pudo observar un incremento significativo en el rendimiento de las variedades de maíz INIAP 102 y 124 con la cepa C₄ (Yáñez, *et ál.*, 2004).

En el año 2006, se realizó un ensayo en campo en el sector de Sibambe en la provincia de Chimborazo, donde se evaluaron tres cepas que procedieron de los sectores de Capulicito en Tungurahua (C₁), Laguacoto 2 en Bolívar (C₂) y Cochapamba en Chimborazo (C₃), además una cepa de *Azospirillum brasilense* de Cuba (testigo) en la variedad INIAP 102 (Blanco Blandito mejorado). Como resultado las cepas de *Azospirillum* spp. presentaron buena adaptabilidad y desarrollo en el cultivo de maíz, bajo condiciones de pH 7, temperatura y humedad promedio de 14,9 °C y 78%, respectivamente. Además, se determinó que C₂ (*Azospirillum* spp. de Bolívar) fue la más eficiente en altura de planta, debido a que aumentó un 11,92% el tamaño de la variedad INIAP 102 (Molina, 2006).

Ya en el año 2010, se elaboró el biofertilizante sólido con las cepas C₁, C₂ y C₃ y se evaluó su efecto en complemento con tres tipos de fertilización en la variedad INIAP 101 (Blanco Harinoso Precoz) en el sector de Ainche en la provincia de Chimborazo. En este estudio se comprobó que la cepa C₂ más la aplicación del 50% de fertilización inorgánica (18-46-00 y urea) en forma asociada incrementó el rendimiento de 215 sacos/ha a 258,25 sacos/ha en comparación con el testigo, superando al rendimiento obtenido por el Programa de Maíz con fertilización inorgánica al 100 % (Cool, 2010).

Se han realizado pocos estudios relacionados con el empleo de cepas de *Azospirillum* para mitigar el efecto de la salinidad de plantas de interés económico (Bashan *et al.*, 2004; Barassiet *al.*, 2006; Barassi *et al.*, 2008). Es por ello que se plantea el siguiente:

Problema científico

Insuficientes estudios en Cuba sobre la evaluación del efecto de la adición de *Azospirillum* en la mitigación de los daños provocados por la salinidad en plantas de maíz (*Zea mays*, L.).

Hipótesis

Es posible mitigar los daños provocados por la salinidad en plantas de maíz (*Zea mays*, L.) con el empleo de cepas de *Azospirillum*.

Objetivo general

Seleccionar la cepa de *Azospirillum* a emplear como biofertilizante en el cultivo de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo) en suelos con estrés salino.

Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el rango de tolerancia a la salinidad de plantas de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo).
2. Caracterizar fenotípicamente las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp.
3. Evaluar el efecto de la adición de las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en la tolerancia a la salinidad de plantas de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo) en condiciones semi-controladas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. Cultivo del maíz (*Zea mays*, L.)

2.1. Origen, taxonomía, distribución geográfica y producción del maíz

El maíz es un cultivo que tiene unos 7000 años de antigüedad y se cultivaba por las zonas de México y América Central. El origen del maíz ha sido objeto de numerosos trabajos, con base en los cuales se han sugerido varios sitios de origen que van desde Paraguay en Sur América hasta Guatemala y México en Mesoamérica (Silva, 2005). Sin embargo, es en este últimos donde se han encontrado la evidencias más antiguas sobre la domesticación del maíz provenientes de sitios arqueológicos (Paterniani, 2000).

La clasificación taxonómica del maíz no ha tenido grandes controversias y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (Cronquist, A. 1988)

Reino:	<i>Vegetal</i>
Subreino:	<i>Embriobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta (Angiospermae)</i>
Clase:	<i>Liliopsida (Monocothyledoneae)</i>
Orden:	<i>Poaceae</i>
Familia:	<i>Cyperales</i>
Género:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>Zea mays</i>

El maíz es uno de los cereales de mayor importancia económica en el mundo, ocupando el segundo lugar después del trigo. Directa o indirectamente, constituye el alimento del 15 al 20 % de la humanidad. Debido a la gran cantidad de variedades de maíz, este cultivo se puede encontrar en diversas regiones del mundo. Se cultiva en más de 70 países, siendo el cultivo con mayor distribución en todo el mundo. Se cultiva en los cinco continentes aunque su zona fundamental es el continente americano (Permuy, 2005).

Esta gramínea es cultivada en países como Sudáfrica, Rusia, Italia, Portugal, Francia, Egipto, entre otros, principalmente en Latinoamérica. Tanto en valor comercial como en área cultivada, el maíz supera a todas las otras producciones agrícolas de muchos países. Entre estos encontramos a Estados Unidos, China, la antigua U.R.S.S., Brasil, México, Francia, Yugoslavia, Rumania, Italia y Argentina, los cuales poseen grandes áreas cultivables dedicadas a este valioso grano (Márquez, 2008).

2.2. Labores culturales del cultivo del maíz

Preparación del suelo: Se recomienda preparar el suelo con 2 meses de anticipación para facilitar la descomposición de residuos. Las labores de arado, rastrado y surcado pueden realizarse con tractor o yunta (Noroña, 2008).

Siembra: En la sierra alto andina la fecha de siembra varía desde septiembre hasta mediados de enero, dependiendo de la zona o localidad del cultivo y de la disponibilidad de agua de riego o de la cantidad de lluvias. La siembra se realiza a una profundidad de 5 cm. La siembra se puede realizar a golpe. En un cultivo a 80cm entre surcos y a 50cm entre sitios; con dos semillas por sitio (25 a 30 Kg de semilla por hectárea, es decir; 50000 planta por hectárea).

Control de malezas: Los herbicidas deben aplicarse inmediatamente después de la siembra, sobre suelo húmedo. En caso de no aplicarse herbicidas, se debe realizar una o dos deshierbas con yunta o a mano, de acuerdo a la incidencia de malezas (Yáñez *et al.*, 2003). Si existe una alta presencia de malezas se recomienda aplicar herbicidas selectivos a base de *Atrazina* en dosis de 1.6a 2.0 kg/ha de producto comercial, en 400 litros de agua (Caviedes *et al.*, 2002).

Aporque: Esta labor se realiza a los 45 días después de la siembra el aporque consiste en arrimar tierra alrededor de la planta con el objeto de ayudara al sostén de la planta, aflojar el suelo y mantener la humedad de la tierra. Durante el aporque se debe colocar en forma lateral el 50% de la fertilización nitrogenada de urea (Yáñez, 2007).

Fertilización: Se recomienda una fertilización de suelo con nitrógeno (N) y fósforo (P) mientras que, en el caso del potasio (K), sólo debe aplicarse si se presenta una clara deficiencia de este elemento. La fertilización se efectúa normalmente según las características de la zona de producción. Para una adecuada fertilización es necesario realizar el análisis químico del suelo por lo menos dos meses antes de la siembra (Yáñez, 2007).

Control de insectos: Se recomienda hacer aplicaciones de insecticidas únicamente cuando sea necesario. Para el caso de gusano trozador (*Agrotisipsilon*), si se observa un 10 % de plantas cortadas o con síntomas de marchitez, se recomienda aplicar a la base del tallo insecticidas como: *Thiodan* (*Endosulfán*) en dosis de 2 L/ha; *Orthene* (*Acephate*) 0.8kg/ha, entre otros (Silva *et al.*, 1997). Para controlar los gusanos de la mazorca (*Heliothiszeay Euxestaeluta*), se recomienda la aplicación de aceite comestible de origen vegetal con aceitero o algodón en tres aplicaciones. La cantidad de aceite a usar es de 3-4 L/ha por aplicación (Dobronski *et al.*, 1999).

Manejo de enfermedades: La pudrición de la mazorca (*Fusarium moniliforme*) es una de las enfermedades más graves para el maíz ya que causa pérdidas de rendimiento en un 40% o más, disminuye el valor comercial del grano y producen sustancias tóxicas (micotixinas). El método más práctico y económico para contrarrestar esta enfermedad, es el uso de variedades resistentes por lo que se están desarrollando variedades de tipo harinoso genéticamente resistentes. Además se puede mencionar otro tipo de enfermedades tales como:

Carbón del maíz (*Ustilagomaidis*), Roya (*Pucciniasorghí*), Tizón foliar (*Helminthosporiummaidis*) y las manchas foliares producidas por *Cercosporamaydis* y *Curvularialunata* (Yáñez, 2007).

Cosecha: La cosecha para choclo se efectúa cuando el grano está en estado "lechoso", para semilla al momento de la madurez fisiológica (cuando en la base del grano se observa una capa negra). Para grano comercial se puede esperar entre 20 a 30 días más en el campo (Silva *et al.*, 1997).

Post cosecha: Las mazorcas dañadas por plagas así como las pequeñas y las de mala calidad deben ser eliminadas para dejar solamente las que presentan

grano grueso y uniforme. Durante el desgrane de las mazorcas es necesario desechar todos los granos dañados y podridos. Además debe separarse el grano comercial del grano que servirá como semilla. (Yáñez, 2007).

Almacenamiento: Para almacenar las mazorcas, grano comercial o semilla, deberán secarse completamente y colocarlas en lugares frescos, secos y libres de gorgojo (Caviedes *et al.*, 2002).

2.3. Variedades e híbridos

Entre todas las plantas cultivadas, el maíz tiene el más elevado nivel de domesticación. Esto es el resultado de la selección clonal que resultó en una especie totalmente dependiente del hombre, pues la transformación eliminó por completo las características ancestrales de sobrevivencia en la naturaleza. Este proceso generó más de 300 razas y miles de variedades adaptadas a los más diversos ambientes ecológicos. Todo esto se debió a una selección en masa conducida por miles de generaciones y sin interrupción desde las antiguas poblaciones americanas (Paterniani, 2000).

El maíz es una especie típicamente alógama. Las plantas son monoicas pero sexualmente separadas. En este cultivo como punto esencial del mejoramiento de su calidad está la elevación del contenido de proteínas convertibles en aminoácidos esenciales. El contenido de proteínas del maíz varía considerablemente y puede elevarse por selección (Radice, 2007). Para el mejoramiento de caracteres con baja heredabilidad, entre los cuales está en primer lugar el rendimiento, así como distintas características de resistencia, el método de selección da buenos resultados.

Para lograr la diversidad de maíz es necesario que se produzca el proceso de heterosis, el cual consiste en la capacidad que tienen los cultivos de combinarse para formar un nuevo híbrido. Este aspecto es de gran importancia tanto para el consumo humano como para lograr la resistencia a enfermedades. Por lo que es indispensable la creación de diferentes híbridos que permitan, a largo o corto plazo, todo este abanico de posibilidades (Córdova, 1997).

2.3.1. Variedades e híbridos cultivados en Cuba y Ecuador

En Cuba, durante los últimos años, se han desarrollado anualmente alrededor de 130 mil hectáreas de diferentes tipos de granos amarillos que son comercializados en la isla y algunos países asiáticos. Nuestro país es capaz de desarrollar la producción de maíz seco y de híbridos, lo que permite competir contra el bloqueo que ha establecido el imperialismo. El desarrollo de híbridos y variedades de maíz QPM (maíz con proteínas de calidad por sus siglas en inglés: (*Quality Protein Maize*) en Cuba constituye en estos momentos unas de las primeras prioridades en el mejoramiento de este cultivo (Permuy, 2005). Los tipos de maíz predominantes en Cuba se pueden agrupar en dos grupos: *Zea mays* indenta, maíz dentado con grano de textura dentada y *Zea mays* indurata, maíz con endospermo extremadamente duro, que no forma depresión dentada a la madurez. El maíz indenta constituye el 15% de la producción mundial y es usado principalmente para la producción de harinas. Actualmente en la isla existen siete razas de maíz entre las que destacan: El maíz Criollo, raza Tusón, raza Argentino, Canilla, Yellow pop, White pop y White dent. Cada una de ellas diferenciadas por el tamaño de la mazorca, diámetro y color e hileras de granos. Los cultivares sembrados tradicionalmente en Cuba son los siguientes: Tayuyo, Francisco, HDT-66, Gibara, Canilla y A7931, etc. (Cervantes *et al.*, 2002). El Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina (Ecuador) ha puesto énfasis en desarrollar variedades mejoradas a partir de cultivares locales. Es así como el Programa de Maíz ha desarrollado algunas variedades derivadas de germoplasma local, como es el caso de: “Chaucho” INIAP-122, “Mishca” INIAP-124, “Blanco Blandito” INIAP-102, “Guagal” INIAP-111, “Zhima” INIAP-153 y “Chulpi” INIAP-192 (Yáñez, *et al*, 2003).

2.4. Características de *Zea mays*, L. var. Tayuyo

La variedad Tayuyo se puede incluir o agrupar entre los maíces dentados, pero presenta la indentación menos pronunciada que las variedades Canilla y Tusón. La mazorca tiene una longitud de 20 - 24 cm y el diámetro de la tusa varía entre 1.5 y 2.5 cm. Sus granos son largos de aproximadamente 1.0 - 1.4 cm, son

además estrechos, presentando el algodón córneo de sus lados un color más intenso que la variedad Canilla. Las mazorcas de maíz de la variedad Tayuyo, poseen de 12-14 hileras de fácil desgrane, sus tusas son largas, finas y bastante flexibles debido a sus longitudes, las cuales se emplean para la elaboración de pienso. En la provincia Granma se cultiva tradicionalmente esta variedad en las localidades de Babiney y Cautillo Abajo (Socorro y Martín, 1998).

2.5. El género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* spp. es una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) de vida libre, capaz de ayudar al crecimiento y producción de numerosas especies vegetales (Okon y Labandera-González, 1994). Los representantes de este género bacteriano tienen la habilidad de producir fitohormonas (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006) que mejoran el crecimiento radicular y la absorción de agua y minerales. En muchos casos influye en una mayor producción de plantas (Vande-Broek *et al.*, 2000).

2.5.1. Hábitat del género *Azospirillum*

Las especies de *Azospirillum* son habitantes regulares del ambiente externo de las raíces (rizosfera) y de las hojas (filosfera) existiendo como microbiota epífita no patógena. Algunas especies existen en grandes cantidades en la rizosfera de las plantas superiores, en crecimiento asociativo con estas, beneficiándolas con el nitrógeno fijado (Mortimer *et al.*, 1981). También se pueden encontrar como bacterias endófitas (Cocking, 2003).

2.5.2. Aislamiento e identificación

El aislamiento de representantes del género *Azospirillum* resulta, por lo general, muy simple. Se puede realizar a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces (rizoplano) de numerosas plantas hospedadas. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas (Caballero, 1998).

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteo-bacterias, siendo *A. lipoferum* la especie tipo. Características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibrioide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral. Las células contienen cantidades elevadas de poli- β -hidroxibutirato (PHB), hasta un 50% del peso seco celular, observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes. En cultivos semigelificados y gelificados con más de 24 h de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionando el colorante rojo congo (Rodríguez y Cáceres, 1982).

2.5.3. Ambiente rizosférico

Aparentemente, una bacteria del suelo deberá sobrevivir a las múltiples interacciones que se presentan con la compleja comunidad microbiana que habita el mismo microambiente, antes de que ocurra cualquier interacción con las raíces de la planta. En el inicio de una interacción con las raíces de la planta hospedera, el microorganismo específico deberá llegar a la superficie de las raíces, adherirse y multiplicarse para colonizarla. Si la bacteria tiene la capacidad de invadir los tejidos internos, se diseminará en el interior de la raíz e incluso en otros órganos de la planta (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Caballero, 2001).

2.6. Biofertilizantes

Los biofertilizantes microbianos pueden definirse como productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas. Al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas una parte importante de los nutrientes que necesitan para su desarrollo, así como de suministrar sustancias hormonales o promotoras del crecimiento (Martínez *et al.*, 1999).

2.6.1. Importancia de *Azospirillum* en el cultivo del maíz

La inoculación de gramíneas con bacterias promotoras del desarrollo vegetal (PGPR) del género *Azospirillum* spp., es una práctica agronómica que se encuentra en franca expansión. Esto se fundamenta en los beneficios demostrados y probados en innumerables trabajos de investigación realizados (Okon y Labandera-González, 1994), en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) (Rodríguez *et al.*, 1996). Siendo el cultivo de maíz (*Zea mays*), uno de los cultivos más importante y dado el completo paquete tecnológico que se le aplica, la incorporación de la inoculación con bacterias promotoras del desarrollo vegetal, podría favorecer la producción del mismo, como lo hace en otras especies vegetales (Burdman *et al.*, 2000).

Con la inoculación de *Azospirillum* se observó frecuentemente un mayor desarrollo del sistema radical (Morales *et al.*, 2003) el cual se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, así como en mayor desarrollo de la parte aérea de las plantas (Cool, 2010). También fueron observados incrementos en el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales en las plantas inoculadas. Frecuentemente se observó que la inoculación de los cultivos con *Azospirillum* permite reducir en 40-50% el nivel de los fertilizantes sin que exista disminución en el rendimiento de la cosecha (Okon y Labandera-González, 1994).

En experimentos en invernadero se ha logrado incrementar la resistencia a la sequía y la biomasa de plantas de maíz mediante la inoculación de una cepa de *Azospirillum* modificada genéticamente capaz de acumular trealosa (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009). También se ha reportado en la literatura científica el efecto protector que impele *Azospirillum* a semillas y plantas de diferentes especies vegetales contra microorganismos patógenos (Bashan y de-Bashan, 2002).

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 (caso existente en muchas zonas agrícolas pobres del país, sobre todo en la serranía). 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 (Cura, 2002).

2.7. Salinidad

La salinización es un proceso de enriquecimiento del suelo con sales más solubles que el sulfato de calcio. Por lo general se trata de cloruros y sulfatos de sodio y de magnesio. Esto provoca valores muy altos de la presión osmótica en el agua del suelo, con evidentes repercusiones sobre la vegetación, interfiriendo en el crecimiento de la mayoría de los cultivos y otras plantas no especializadas (Porta *et al.*, 1999).

2.7.1. La salinidad en la agricultura. Problema general de los suelos salinos

La población humana ha sufrido un gran incremento en las últimas décadas, tendencia que no ha sido seguida por la producción de alimentos. Las causas de este desequilibrio lo podemos clasificar en dos categorías fundamentales: por un lado el considerable aumento en los precios de la energía y de los insumos agrícolas en general; y por otra la pérdida de suelo útil, causada por los fenómenos degradativos y de salinización principalmente.

La salinización de los suelos es, sin duda, uno de los problemas más graves a los que se enfrenta la agricultura actual. Aproximadamente entre un 7-10% de la superficie terrestre está constituida por suelos afectados por la salinidad en diferentes extensiones (Szablocs, 1994).

Según Royo y Agares (2003) la salinidad de los suelos es un grave problema que afectan al rendimiento de los cultivos y la sostenibilidad de la agricultura. Aproximadamente el 43% de la superficie terrestre utilizada para el cultivo en el

mundo se encuentra afectada por niveles de salinidad que, en la mayoría, superan la tolerancia de las especies de cultivos tradicionales. Cerca de 943 millones de hectáreas se abandonan debido a los problemas de encharcamiento, dosificación y salinización. Estos problemas van en aumento a razón de un 0.5 % anual. Las causas fundamentales son las bajas precipitaciones, alta superficie de evaporación, irrigación con aguas salinas y por las prácticas tradicionales de cultivos que favorecen el incremento de la concentración de sales en el suelo.

Sin embargo, la FAO (2008) reporta que más de 800 millones de hectáreas de tierras cultivables en el mundo están afectadas por la salinidad. Estas representan más del 6 % del total de tierras cultivables. Aunque existen discrepancias en los valores numéricos, es evidente el grave problema que enfrenta la humanidad con la alta incidencia de salinidad en los suelos.

Más del 20% de los suelos cultivados y aproximadamente el 50% de las tierras irrigadas, están catalogados como potencialmente salinos y los modelos matemáticos evidencian que la velocidad de la salinización de los suelos va en aumento cada año en menos tiempo (Rhoades y Loveday, 2004).

2.7.2. Situación de la salinidad en Cuba y Ecuador

En Cuba de los 7.09 millones de hectáreas de suelos dedicados a la agricultura, una gran parte sufre procesos de degradación. El 46 % está afectado por una baja y desequilibrada fertilidad, el 69% presenta bajos niveles de materia orgánica, el 31% está afectado por la erosión hídrica o eólica; el 24% son suelos ácidos, el 14% suelos salinos y se estima que el porcentaje de suelos salinos incrementará en un 7.5% en los próximos 10 años (González *et al.*, 2002). De acuerdo a las investigaciones de algunos autores, esta es la zona de Cuba, donde el proceso de salinidad se desarrolló de manera más notable, y existe alrededor de 30000 ha afectadas (López, 2001).

El Ecuador, constituido por tres regiones naturales (costa, sierra y oriente) presenta una diversidad de ecosistemas, suelos y especies vegetales. La variabilidad de los suelos del país se expresa en la presencia de la planicie

costera: plano soles, con problemas en la capa arable de acidez, deficiencias nutritivas (N, P, Ca, Mg, K, S, Zn, Fe) y limitaciones de drenaje interno; suelos salinos y alcalinos, principalmente en las áreas de riego; vertisoles, que corresponden a las tierras negras arcillosas tropicales, que son aptas para ciertos tipos de cultivos, pero demandan un manejo especial. (Falconi, 2010).

El lavado es la clave para eliminar del perfil del suelo los excesos de sales solubles mediante su remoción, así como crear las condiciones favorables para el desarrollo de las plantas. No obstante, es necesario considerar la calidad del agua a utilizar en los lavados, pues cuando las mismas no presentan la calidad requerida pueden provocar efectos negativos en las propiedades del suelo y los cultivos. Sobre este aspecto existe una amplia bibliografía que estudian los valores de la conductividad eléctrica y grado de mineralización del agua que afecta el rendimiento de los diferentes cultivos (López, 2001).

El objetivo fundamental de los métodos de mejoramiento de los suelos afectados por sales en su conjunto, no es eliminar su concentración hasta los límites en que las plantas cultivadas aporten rendimientos económicamente viables, todo lo cual sugiere, la selección de las especies y variedades de plantas con alta tolerancia a la salinidad para su cultivo bajo tales condiciones (González, 2002).

2.7.3. Recuperación de suelos salino o salinizados

Los principios fundamentales para el manejo han sido formulados hace ya algún tiempo constituyendo las normas más comunes las siguientes:

- ❖ Mejorar las condiciones mecánicas del suelo a través de la suelo a través de la subsolación, inversión del perfil y acondicionamiento de su estructura.
- ❖ Evitar la evaporación en la superficie del suelo al mantenerlos cubiertos con la vegetación.
- ❖ Usar agua de buena calidad y garantizar un buen funcionamiento de los drenajes, que permitan mantener el manto freático a más de 2 m de profundidad.

-
- ❖ Garantizar una buena nivelación del terreno durante la práctica del riego que permita un buen arrastre de los excesos de sales mediante los lavados.
 - ❖ Usar la rotación de cultivos siempre que sea factible o dejar el suelo en barbecho con cobertura vegetal.
 - ❖ Usar enmiendas orgánicas y químicas, siempre que sea necesario eliminar el sodio absorbido por el complejo de cambio del suelo.
 - ❖ Fomentar el uso de especies y variedades de plantas tolerantes a la salinidad.
 - ❖ Usar reguladores de crecimiento o compuestos similares para incrementar la tolerancia a la salinidad y el rendimiento de los cultivos. (López, 2001).

A nivel mundial la mayor utilización agrícola que se le da a los suelos salinos y salinizados que no pueden ser recuperados en un corto periodo de tiempo, es mediante el cultivo de plantas tolerantes (Isla y Royo, 2001)

Efectos de la salinidad sobre los cultivos

La salinidad del medio puede inhibir el crecimiento vegetal, mediante perturbaciones en el balance hídrico, reducción de la turgencia, así como el agotamiento de la energía requerida para el metabolismo. Estas perturbaciones pueden estar generadas por dificultad en la captación o transporte de agua dentro de la planta, como por efectos tóxicos ocasionados por un exceso de iones minerales tóxicos ocasionados por un exceso de iones minerales en los tejidos. En conclusión, el daño causado al vegetal puede ser osmótico, tóxico o nutricional (Poljakoff *et al.*, 1998).

La salinidad afecta a las enzimas de las cadenas respiratorias y dependiendo de la especie vegetal puede aumentar o disminuir el consumo de oxígeno por parte de la planta (Poljakoff, 1998). El contenido de compuestos fosforilados disminuye debido a la salinidad.

En general, las sales influyen sobre la germinación de las semillas al disminuir la imbibición y afectar algunos procesos bioquímicos que durante esta etapa tiene lugar (Marín, 1994). Quizás, el efecto más perjudicial de la salinidad se deba a la aparición de un estado de sequía fisiológica en las plantas que no están bien adaptadas a esas condiciones. La sequía fisiológica no se debe a la falta de agua en el suelo, sino a que la planta no puede absorberla porque el suelo posee una alta concentración de sales y por lo tanto posee valores del potencial hídrico que puedan llegar a ser inferiores al potencial de la célula en la planta. Este fenómeno en los sustratos salinizados disminuye la velocidad de imbibición de las semillas, como primer paso del proceso de germinación. (González y Ramírez, 1999; Murillo 2001).

Los efectos directos de las sales en el crecimiento de las plantas se pueden dividir en tres categorías principales (Dudley, 1994):

- ❖ Reducción del potencial osmótico de la disolución del suelo, que disminuye la cantidad de agua disponible para la planta.
- ❖ Deterioro de la estructura física del suelo, que disminuye la permeabilidad del mismo al agua y los gases.
- ❖ Toxicidad de algunos iones.

La salinidad del suelo puede también afectar al desarrollo vegetal de manera indirecta, a través de la inhibición de procesos biológicos del suelo, como por ejemplo mineralización y nitrificación (Jurinak y Wagenet, 1981).

Se considera que el maíz es sensible a la salinidad. Cuando la conductividad eléctrica de un extracto de suelo saturado es de 2.5 milisiemens/cm (mS/cm, igual a milimhos/cm), se puede esperar una reducción del 10% en el rendimiento; un valor de 4 se asocia con una reducción del 25% en el rendimiento. Esta pérdida de rendimiento en general es consecuencia de que las plantas no pueden extraer suficiente agua de un suelo afectado por la sal.

2.7.4. Efectos de la salinidad sobre la fisiología de la planta

La salinidad provoca efectos perjudiciales que afectan tanto al suelo agrícola, como a las plantas. Entre los primeros se conoce que los cationes Na^+

desplazan el Ca^+ del complejo arcilloso-húmico y degradan la estructura del suelo. Sin embargo, entre los efectos más obvios de la salinidad en las plantas se destacan la supresión del crecimiento, la aparición de daños en las hojas y la disminución del rendimiento y la calidad comercial de las cosechas (Gómez-Cadena, 2001).

El efecto más común de la salinidad sobre las plantas es la disminución del desarrollo debido al aumento del potencial osmótico del medio y en consecuencia una disminución del potencial hídrico del suelo produciendo una toxicidad específica normalmente asociada a la absorción excesiva de Na^+ y de Cl^- , un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, y la combinación de los efectos antes indicados. (Acevedo, 2003).

Las plantas disponen de complejos mecanismos moleculares de respuesta a estos efectos de salinidad que incluyen biosíntesis de solutos compatibles, control del flujo hídrico y transporte de iones para restablecer la homeostasis (González, 2002).

Efecto osmótico

Este efecto está relacionado con la disminución del potencial osmótico del agua en el suelo, originando por la presencia de las sales disueltas. Esto produce en la planta una disminución de la capacidad de las raíces para absorber agua del medio (Morales *et al.*, 2003).

En un principio la reducción del rendimiento por la salinidad se relaciona con la alteración en el balance hídrico. Según Isla y Royo (2001) observaron que las hojas de cebada reducían su crecimiento al iniciar la salinización de forma proporcional a la disminución del potencial osmótico de la solución externa.

Toxicidad iónica

La presencia de iones salinos en los tejidos de las plantas, a niveles de concentración superiores a los tolerados por estas, origina lesiones

características en las plantas, dependiendo de la naturaleza y concentración de los iones (Flowers y Yeo, 1986).

Se han descrito muchos síntomas fisiológicos asociados a la toxicidad de los iones a partir de determinados niveles críticos, tales como: interferencias causadas por ellos en el metabolismo y a los daños que, como consecuencia, tienen lugar en orgánulos y membranas (Frahm *et al.*, 2004), disminución o inhibición de la actividad enzimática o alteraciones en la funcionalidad de la membrana (Wyn Jones y Gorham, 1983), inhibición de la fotosíntesis (Spyropoulos y Maurommatis, 1998), repercusión en los mecanismos de transporte y selectividad, derivación de parte de la energía metabólica de la planta para su inversión en procesos distintos al crecimiento (Yeo, 1983; Yuen *et al.*, 2004).

Efectos nutricionales

La presencia en la solución del suelo de iones salinos, a partir de un determinado nivel crítico de concentración, origina un desplazamiento del equilibrio nutricional mineral de las plantas. Este efecto se produce de dos maneras:

- ❖ La fuerza iónica del sustrato tiene un efecto directo sobre la absorción y translocación de nutrientes. Una evidencia de este efecto es que la salinidad induce una absorción y acumulación de fósforo en ciertas especies. Este es un efecto osmótico y se presenta, independientemente del tipo de sal utilizado (Yuen *et al.*, 2004).
- ❖ El mecanismo más común, por el que la salinidad altera la nutrición mineral de las plantas es por la interacción directa del Cl^- y el Na^+ sobre la absorción y translocación de nutrientes dentro de la planta (Michell, *et al.*, 1991).

Uno de los primeros resultados que revelaron desequilibrios nutricionales en las plantas, como consecuencia de la presencia de los iones salinos, se alcanzaron en estudios de nutrición del Ca^{2+} , comprobándose en judías que la absorción de Ca^{2+} depende de la relación $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Yeo, 1983). A su vez, numerosos

estudios muestran que la concentración de K^+ en la planta, disminuye al aumentar la salinidad o la relación Na^+/Ca^{2+} en el medio (Subbarao *et al.*, 1990).

Por otra parte se ha comprobado que el ClNa puede también inducir toxicidad de fósforo en algunas especies como el maíz (Kumar y Yadav, 1983). En condiciones salinas pueden también surgir problemas con la disponibilidad de micronutrientes, aunque la influencia de la salinidad sobre las concentraciones de los mismos en las plantas depende, tanto de la planta como del nutriente considerado. Distintos estudios muestran que la concentración de hierro aumentaba con la salinidad en plantas de guisante (Singh, 1981), tomate, soya y calabaza (Maas, 1986), arroz (Scott, Jones y Williams, 1984) y disminuía en cebada y maíz (Kobata *et al.*, 1992). Así mismo, la concentración de manganeso aumentaba en cebada, arroz, remolacha, tomate y disminuía en calabaza, guisante y maíz. Por otra parte la concentración de zinc aumentaba en cebada, judía, soja, tomate, calabaza y disminuía en maíz. La salinidad incrementa los efectos de la toxicidad del micronutriente en plantas de trigo cultivadas en soluciones nutritivas con alta concentración del micronutriente (Maas *et al.*, 1994).

2.7.5. Mecanismos generales de adaptación de las plantas a la salinidad

Se han planteado una gran variedad de mecanismos de tolerancia empleados por las plantas para sobrevivir en suelos con estrés salino. Munns y Tester (2008) confeccionaron un cuadro resumen de los tres componentes de la tolerancia a la salinidad (Anexo 1). Entre ellos se pueden mencionar:

✓ **Tolerancia al estrés osmótico:**

- **Reajustes osmóticos:** un incremento en la salinidad del suelo provoca la pérdida de agua de las células de las hojas de manera casi inmediata. Sin embargo, mediante reajustes osmóticos estas células retoman su volumen inicial aunque disminuye el grado de

-
- alargamiento de las hojas (Cramer, 2002; Fricke y Peters, 2002; Passioura y Munns, 2000; Yeo *et al.*, 1991).
- **Regulación de la fotosíntesis y la apertura estomática:** cuando la planta responde al estrés salino disminuye la apertura y conductancia estomática, así como la fotosíntesis.
 - **Estrés oxidativo:** la reducción de la fotosíntesis incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*). De esta manera también se incrementa la acción de las enzimas detoxificantes de estas ROS (Apel y Hirt, 2004; Fricke, 2004; Logan, 2005).
 - **Señalización celular:** las plantas responden directa y específicamente a la adición de Na⁺ incrementando los niveles citosólicos de este catión. El mecanismo de señalización celular, más aceptado, frente al estrés salino es el incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Tracy *et al.*, 2008; Zhu, 2002). También se dan las señalizaciones a largas distancias entre las raíces y las ramas mediada por el ácido absísico (ABA, del inglés, *Abscisic Acid*) que juega un papel importante frente a la sequía y regula la conductancia estomática (Zhu, 2002; Davies *et al.*, 2005).
- ✓ **Exclusión de Na⁺ en los exudados radicales:** el Na⁺ se excreta mediante las raíces para que no se acumule en niveles tóxicos en las hojas. Un fracaso en la exclusión de sodio por las raíces provoca manifestaciones en las hojas en días o semanas y causa la muerte prematura de hojas maduras (Munns y Tester, 2008).
 - ✓ **Tolerancia de los tejidos a la acumulación de iones:** este tipo de mecanismo es efectivo para la tolerancia a iones Na⁺ y en algunas especies de Cl⁻. Esta capacidad depende de la compartimentalización de estos iones en estructuras celulares o en el citoplasma. Elevadas concentraciones de estos iones que llegan a las hojas pueden ser toleradas por adaptaciones anatómicas y particionalización intracelular.

Algunas modificaciones incluyen aumento del tamaño celular por aumento del volumen vacuolar, excreción de los iones Na^+ y Cl^- mediante tricomas y células epidérmicas modificadas (Flowers *et al.*, 1986). En todas las plantas mediante el transporte intercelular se puede asegurar la compartimentalización de los iones antes mencionados (James *et al.*, 2006).

2.7.6. Clasificación de los suelos según el grado de salinidad

Según la conductividad eléctrica del suelo (CEs), el *United States Salinity Laboratory* de Riverside indica que los grados de salinidad de los suelos que se deben manejar incluyen: suelos normales, salinos, sódicos y salino-sódicos. (Anexo 2).

Ibáñez (2008) refiere que los suelos pueden clasificarse teniendo en cuenta el grado de salinidad determinado por los valores de CEs y el daño ocasionado a los cultivos:

- A.** Suelos no salinos los que tengan menos de 2 mmhos/cm de conductividad y ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas. Grado de salinidad bajo.
- B.** Suelos no salinos que tienen entre 2 y 4 mmhos/cm de conductividad y leve efecto sobre el crecimiento de las plantas. Grado de salinidad leve.
- C.** Suelos salinos cuando tienen entre 4 y 8 mmhos/cm de conductividad, con disminución en el rendimiento de cultivos. Grado de salinidad alto.
- D.** Suelos salinos que tienen entre 8 y 16 mmhos/cm de conductividad, en este caso son pocos los cultivos que soportan estas condiciones. Grado de salinidad muy alto.
- E.** Suelos que tienen más de 16 mmhos/cm de salinidad, las restricciones para cultivos es más grande que ara el anterior. Grado de salinidad extremadamente alto.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se inicio en el Instituto nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Programa de Maíz con la obtención y selección de cepas de *Azospirillum* spp.

- La evaluación *in vitro* de la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCA) de la Universidad de Granma (UDG), Cuba.
- La reactivación de las cepas de *Azospirillum* spp. y su caracterización fenotípica se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del CEBVEG de la FCA de la UDG, Cuba.
- La evaluación en condiciones semi-controladas del efecto de la adición de de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se desarrolló en la Casa de Adaptación del CEBVEG de la FCA de la UDG, Cuba.
- La determinación de las propiedades fisico-químicas del suelo en estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis Químico perteneciente al Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA) de la Facultad de Ciencias Técnicas (FCT) en la UDG, Cuba.

Condiciones generales para el trabajo en el laboratorio

Los medios de cultivos y el instrumental, fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 kg/cm² de presión, durante 15 y 20 min, respectivamente. La manipulación del material para los ensayos microbiológicos, se realizó en cabina de flujo laminar vertical InterMed (MDH, Inglaterra) y flujo horizontal (Faster, China), empleando para la desinfección luz UV y etanol al 70 % (v/v). Durante la manipulación en condiciones asépticas, el instrumental se esterilizó en un esterilizador de pinzas y bisturíes (Steri, China) a 250°C de temperatura durante un minuto. Todos los reactivos empleados tienen grado analítico y se trabajó en condiciones adecuadas según la clasificación de cada uno (Anexo 3).

Cepas de *Azospirillum* spp.

Las cepas de *Azospirillum* spp. se obtuvieron a partir de los estudios realizados por Espinoza (2004) en Ecuador. La procedencia de las mismas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Códigos y procedencia de las cepas de *Azospirillum* spp. empleadas en la investigación

Código	Identificación	Procedencia
C₂	Cepa2-Bolívar	Bolívar: Guaranda, Veintimilla, Laguacoto 2
C₃	Cepa3-Tungurahua	Tungurahua: Píllaro, Emilio Terán, El Capulicito
C₄	Cepa4- Chimborazo	Chimborazo: Alausí, Sibambe, Cochapamba

Reactivación y purificación de las cepas de *Azospirillum* spp.

Para la reactivación se colocan 1000 µL de peptona al 1 % (m/v), en los tubos eppendorf (Eppendorf, Alemania) que contienen las cepas liofilizadas, agitándose hasta homogenizar la mezcla con la ayuda del vortex (IKA, Alemania), a continuación se toman 50 µL de la suspensión de la cepa y se colocan en cajas Petri (Anumbra, China) con medio Agar Ácido Succínico Rojo Congo (Anexo 4). Con la ayuda de una espátula de Drigalsky estéril se dispersa bien hasta que se seque y se coloca en incubadora (Binder, China) a una temperatura de 30 °C por 48 h.

Luego se toman secciones puras de las bacterias con ayuda de un asa de inoculación y se realizan estrías en cajas Petri (Anumbra, China) con medio Ácido Succínico Rojo Congo sólido. La incubación se realiza a una temperatura de 30 °C durante 48 h. Finalmente, se realizan pruebas de tinción de Gram, para la constatación de la pureza de las cepas (Girard y Rougieux, 1964).

Material vegetal

Las semillas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se obtuvieron de la Empresa Provincial de Semillas en Bayamo, Granma, Cuba. Las mismas están certificadas.

3.1. Tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones *in vitro*

Con el objetivo de evaluar la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se realizó un experimento en condiciones controladas (*in vitro*) con un medio de cultivo a base de Agua y Agar con diferentes concentraciones de NaCl, para la germinación y desarrollo de estas plantas. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres réplicas. Para ello se emplearon tubos de 20 x 2 cm (Probe, China) conteniendo agua des ionizada con diferentes niveles de conductividad eléctrica (Tabla 3) y agar E al 6 % para lograr la consistencia del medio de cultivo. La primera se ajustó empleando cloruro de sodio y un conductímetro (Crison, China).

Tabla 3. Niveles de conductividad eléctrica empleadas en la evaluación de la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones controladas

Tratamiento	Conductividad eléctrica (dS/m)
T₀	0
T₁	2
T₂	4
T₃	6
T₄	8

Para la siembra de las semillas primeramente se realizó una desinfección según Álvarez (2009). Brevemente, se desinfecta inicialmente con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 20 minutos y se lavar 4 veces con agua destilada estéril, para dejarlas reposar por 24 horas en condiciones asépticas. Luego se aplica

bicloruro de mercurio al 0.1% durante 10 min y se lava cuatro veces con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas las semillas, la siembra de las mismas en los tubos con medio de cultivo se realizó bajo asepsia y empleando pinzas estériles. Todas las semillas se sembraron a razón de una semilla/tubo. Los tubos se incubaron a 20 ± 2 °C y 85 % de humedad relativa en cámara de cultivo (invernadero) con fotoperiodo natural.

Como medida del crecimiento vegetal se evaluaron cada 2 días, durante 8 días en total, las siguientes variables morfológicas:

3.1.1. Porcentaje de germinación

Se consideraron semillas germinadas aquellas que experimentaron ruptura de la testa, profusión de la radícula y emergencia del hipocótilo. Para el cálculo de los porcentajes de germinación en cada bloque se empleó la ecuación (1):

$$\% G = NSGT_x * 100 / NSGT_0 (1)$$

Donde:

% G: Porcentaje de germinación

NSGT_x: Número de semillas germinadas en el tratamiento correspondiente

NSGT₀: Número de semillas germinadas en el tratamiento control (T₀)

100: Factor matemático

3.1.2. Número de raíces

Se determinó mediante un conteo visual directo.

3.1.3. Longitud de la mayor raíz/planta

La longitud de la mayor raíz/planta se midió en centímetros (cm) desde la base de emergencia hasta el ápice radical, empleando para ello una regla milimetrada (Wenquan, China).

3.1.4. Altura de planta

La altura de las plantas se midió en centímetros (cm) desde la base de emergencia en la semilla hasta el extremo de la hoja más larga. Se empleó para ello una regla milimetrada (Wenquan, China).

3.1.5. Número de hojas/planta

Se determinó mediante un conteo visual directo.

3.1.6. Porcentaje de peso húmedo de plantas

Dado que *in vitro* no es posible evaluar por más de 8 días, el número de hojas no es una variable importante. Sin embargo, estas influyen en el peso de las plantas. Por ello, se determinó el peso húmedo. Para ello, el último día de evaluación se extrajeron las plantas de los tubos de cultivo y se limpiaron detenidamente las raíces hasta eliminar completamente el medio de cultivo adherido a ellas. El peso húmedo se determinó mediante el empleo de una balanza analítica (Sartorius, China).

3.1.7. Tolerancia a la salinidad

Aunque este índice no es una variable morfológica ni fisiológica de las plantas, constituye un recurso matemático para evaluar la influencia de las diferentes variables morfológicas en el efecto global provocado por la salinidad. La tolerancia a la salinidad se definió como el promedio de todas las variables morfológicas evaluadas.

3.2. Caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp.

La caracterización fenotípica de cepas microbianas incluye la caracterización macromorfológica, micromorfológica y ecológica de las mismas. Para todos los estudios de caracterización fenotípica de las cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. se realizó un pre-cultivo. Para ello se inocularon 50 µl del cultivo de cada una de las cepas en 30 ml de medio Caldo Ácido Succínico (Anexo 5), en condiciones de esterilidad. Posteriormente fueron colocados en un agitador orbital (Sanyo, China) a 150 rpm y 28 ± 2 °C, hasta alcanzar una

densidad óptica (D.O) de 1.000 a una $\lambda=540$ nm, correspondiente a 10^9 UFC/mL según lo descrito por Bashan (2002).

3.2.1. Caracterización micro-morfológica de cepas de *Azospirillum*

La caracterización micro-morfológica de cepas microbianas realizada en la investigación comenzó con la observación microscópica de las células al microscopio óptico (Novel, China). En el caso de las bacterias, la observación al microscopio debe estar precedida por una tinción dado el pequeño tamaño y transparencia de las mismas. El método de tinción más empleada es el propuesto por Gram y que recibe el nombre de tinción de Gram (Novo, 1983; Pazos y Casadesús, 1990). La caracterización de las células se realizó tomando en cuenta los siguientes aspectos como forma, tamaño, respuesta a la tinción de Gram, presencia o no de endospora bacteriana, etc.

3.2.2. Caracterización macro-morfológica de cepas de *Azospirillum*

La caracterización macro-morfológica de cepas microbianas se basa en la observación de las células al microscopio estereoscópico (Novel, China). La caracterización se realizó a colonias de las cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* crecidas en medio Agar Ácido Succínico Rojo Congo a 32 ± 1 °C durante 48 h. Los aspectos a tener en cuenta incluyen la forma de las colonias, formad de los bordes, elevación, color, olor, apariencia, entre otros.

3.2.3. Caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por temperatura

El experimento se realizó empleando placas Petri (Anumbra, China) de 90 mm de diámetro conteniendo 20 mL de Agar Ácido Succínico Rojo Congo. En estas se inocularon 50 μ L del pre-cultivo de cada una de las cepas y con ayuda de una espátula de Drigalsky estéril se dispersó el inóculo de manera aséptica sobre toda la superficie del medio de cultivo. Las placas se colocaron en incubadoras (Binder, Tutlligen), excepto para la temperatura de 18 °C que se incubaron en un cuarto frío, a diferentes niveles de temperatura (Tabla 4) durante 5 días.

Tabla 4. Tratamientos empleados en la caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por temperatura

Tratamiento	Temperatura (°C)
T ₀	18± 2°C
T ₁	28± 2°C
T ₂	38± 2°C
T ₃	48± 2°C

Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura de las mismas y los resultados se mostraron de manera cualitativa teniendo en cuenta la densidad relativa de la población bacteriana mediante observación visual. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2.4. Caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por pH

El Caldo Ácido Succínico fue separado en lotes y se le ajustó el pH (Tabla 5) empleando para ello una solución de ácido clorhídrico al 0.1 % (v/v) y una solución de hidróxido de sodio a 4 mol/L, según correspondiera disminuir o aumentar el valor de pH, respectivamente.

Tabla 5. Tratamientos empleados en la caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por pH

Tratamiento	pH
T ₀	5
T ₁	6
T ₂	7
T ₃	8
T ₄	9

Posteriormente se distribuyó a razón de 30 mL por erlenmeyer de 50 mL. Se inocularon 50 µl del pre-cultivo de cada una de las cepas en dichos recipientes y se colocaron en un agitador orbital (Zanyo, China) a 150 rpm y 28 ± 2 °C durante 36 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la determinación de la D.O a una λ=540 nm. Las lecturas se realizaron por triplicado.

3.2.5. Caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por salinidad

El estrés por salinidad se indujo mediante el empleo de cloruro de sodio por constituir la principal sal responsable de la salinidad de los suelos. El Caldo Ácido Succínico fue separado en lotes y se le ajustó el porcentaje (m/v) de cloruro de sodio (Tabla 6) empleando un conductímetro (Crison, China). El tratamiento control (T_0) se muestra con 0 % de cloruro de sodio.

Tabla 6. Tratamientos empleados en la caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp. frente a estrés por salinidad inducida por cloruro de sodio

Tratamiento	Porcentaje de cloruro de sodio (m/v)
T_0	0
T_1	1.0
T_2	1.5
T_3	2.0
T_4	2.5
T_5	3.0
T_6	3.5
T_7	4.0
T_8	5.0

Se inocularon 50 μ l del pre-cultivo de cada una de las cepas en dichos recipientes y se colocaron en un agitador orbital (Zanyo, China) a 150 rpm y 28 ± 2 °C durante 36 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la determinación de la D.O en un espectrofotómetro (Jenway, China) a una $\lambda=540$ nm. La calibración del equipo se realizó empleando como blanco muestras de medio de cultivo (Caldo Ácido Succínico) estéril. Las lecturas se realizaron por triplicado.

3.3. Efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas

3.3.1. Toma de muestra de suelo

En el presente experimento se empleó un suelo procedente de la parcela de autoconsumo de la Universidad de Granma, Cuba. La colecta del volumen de muestra a emplear se realizó por el método de la bandera inglesa (Silva *et al.*, 2010). Las muestras de suelo se tomaron en cinco puntos diferentes de la parcela y a una profundidad de más de 15 cm. Todas las muestras se mezclaron homogéneamente para lograr la homogeneidad de las mismas. Se tomó una muestra representativa y se transportó al Laboratorio de Análisis Químico perteneciente al Centro de Estudio de Química Aplicada en la Universidad de Granma, Cuba, para su análisis físico-químico.

3.3.2. Análisis físico-químico del suelo

El procedimiento general se basó en realizar una dilución 1:3 (m/v) en agua desionizada. Se agita vigorosamente durante 20 minutos empleando una zaranda (MLW, Alemania) a 60 rpm. Se deja reposar por 10 min y se filtra a presión reducida a través de papel de filtro (Wattman No.1, China). Al filtrado se le determinó el pH empleando un pH-metro (Crison, China) y la conductividad eléctrica mediante un conductímetro (Crison, China). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Material vegetal

Las semillas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se obtuvieron de la Empresa Provincial de Semillas en Bayamo, Granma, Cuba. Las mismas están certificadas.

Microorganismos

Con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas, se realizó un experimento de bloques al azar. Para ello se

evaluaron las tres cepas de *Azospirillum* spp. (C₂, C₃ y C₄) y sus combinaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos y volúmenes de cultivos bacterianos empleados en la evaluación del efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas

Cepas	Volumen añadido (mL) de cada cepa de <i>Azospirillum</i>		
	C ₂	C ₃	C ₄
-	-	-	-
C ₂	3.0	-	-
C ₃	-	3.0	-
C ₄	-	-	3.0
C ₂ + C ₃	1.5	1.5	-
C ₂ + C ₄	1.5	-	1.5
C ₃ + C ₄	-	1.5	1.5
C ₂ + C ₃ + C ₄	1.0	1.0	1.0
Total	1120	1120	1120

Fermentación de las cepas de Azospirillum

Para ello se inocularon 50 µL del pre-cultivo en 300 mL de Caldo Ácido Succínico. Los erlenmeyers se incubaron en agitación sobre un agitador orbital (Zanyo, China) a 120 rpm y 28 ± 2 °C hasta alcanzar una D.O de 0.700 a una λ=540 nm.

Siembra de las semillas de maíz e inoculación con cepas de Azospirillum

Para los experimentos, se emplearon fundas de polietileno de 20 x 10 cm conteniendo 100 g de suelo que ocupaba la tercera parte de cada funda.

Inicialmente se humedeció el suelo con 20 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se sembró una semilla por cada funda de polietileno a una profundidad de 2 cm. Simultáneamente, se inocularon 3 mL (volumen final), de las suspensiones bacterianas fermentadas, correspondientes para cada tratamiento (Tabla 8). Como medida del crecimiento vegetal se evaluaron cada 2 días, durante 20 días en total, las siguientes variables morfológicas:

3.3.3. Porcentaje de emergencia

A diferencia del experimento planteado en el epígrafe 3.1 de materiales y métodos, que se realizó en condiciones *in vitro*, donde se pudieron observar varias etapas del proceso de germinación, en el presente experimento en lugar del porcentaje de germinación. Este se define como la aparición de la plántula por encima del nivel del suelo. El porcentaje de emergencia se determinó según la ecuación (2):

$$\% E = NPET_x * 100 / NPET_0 \quad (2)$$

Donde:

% E: Porcentaje de emergencia de plántulas

NPET_x: Número de plántulas emergidas en el tratamiento correspondiente

NSGT₀: Número de plántulas emergidas en el tratamiento control (*T₀*)

100: Factor matemático

3.3.4. Altura de plantas

La altura de las plantas se midió en centímetros (cm) desde suelo hasta el extremo de la hoja más larga, empleando para ello una regla milimetrada (Wenquan, China).

3.3.5. Porcentaje de hojas/plantas

El porcentaje de emergencia se determinó según la ecuación (3):

$$\% HP = NHPT_x * 100 / NHPT_0 \quad (3)$$

Donde:

% HP: Porcentaje de hojas/planta

NHPT_x: Número de hojas/planta en el tratamiento correspondiente

NSGT₀: Número de hojas/planta en el tratamiento control (T_0)

100: Factor matemático

3.3.6. Porcentaje de peso húmedo de plantas

Se determinó el peso húmedo solamente para el último día de evaluación. Para ello, primeramente se extrajeron las plantas de las fundas de polietileno y se lavaron con agua destilada para eliminar el suelo rizosférico. Posteriormente se secaron empleando papel de filtro (pb, Brasil). El peso húmedo de las plantas se determinó mediante el empleo de una balanza analítica (Zartorius, China).

El porcentaje de peso húmedo de las plantas se determinó según la ecuación (4):

$$\% \text{ PHP} = \text{PSPT}_x * 100 / \text{PHPT}_0 \text{ (4)}$$

Donde:

% PHP: Porcentaje de peso húmedo de plantas

PHPT_x: Número de peso húmedo de plantas en el tratamiento correspondiente

PHPT₀: Número de peso húmedo de plantas en el tratamiento control (T_0)

100: Factor matemático

3.3.7. Porcentaje de peso seco de plantas

Se realizó a partir de las plantas empleadas en la determinación del peso húmedo. Para ello, se colocaron las muestras en una estufa (Binder, Alemania) a 60 °C durante 3 días. Transcurrido el tiempo de secado se dejaron atemperar y se obtuvo el peso seco de las plantas con el empleo de una balanza analítica (Zartorius, China).

El porcentaje de peso seco de las plantas se determinó según la ecuación (5):

$$\% \text{ PSP} = \text{PSPT}_x * 100 / \text{PSPT}_0 \text{ (5)}$$

Donde:

% PSP: Porcentaje de peso seco de plantas

PSPT_x: Promedio de peso seco de plantas en el tratamiento correspondiente

PSPT₀: Promedio de peso seco de plantas en el tratamiento control (T₀)

100: Factor matemático

3.3.8. Porcentaje de enraizamiento

Se determinó solamente para la última evaluación, a los 20 días de la siembra de las semillas e inoculación de las cepas de *Azospirillum*. Se determinó el número de raíces/planta mediante un conteo visual directo. Para el cálculo de los porcentajes de enraizamiento se empleó la ecuación (6).

$$\% \text{ Enr} = \text{NRPT}_x * 100 / \text{NRPT}_0 \text{ (6)}$$

Donde:

% Enr: Porcentaje de raíces/planta

NRPT_x: Promedio del número de raíces /planta en el tratamiento correspondiente

NRPT₀: Promedio del número de raíces /planta en el tratamiento control (T₀)

100: Factor matemático

3.3.9. Porcentaje de peso húmedo de raíces

Se determinó el peso húmedo de las raíces siguiendo el procedimiento especificado en el epígrafe 3.3.6 de materiales y métodos. Primeramente se separaron las raíces de la zona aérea de las plantas justamente por . El peso húmedo de las raíces/planta se determinó mediante el empleo de una balanza analítica (Zartorius, China).

El porcentaje de peso húmedo de las raíces/planta se determinó según la ecuación (7):

$$\% \text{ PHR} = \text{PHRT}_x * 100 / \text{PHRT}_0 \text{ (7)}$$

Donde:

% PHR: Porcentaje de peso húmedo de raíces/planta

PHRT_x: Promedio del peso húmedo de raíces/planta en el tratamiento correspondiente

PHRT₀: Promedio del peso húmedo de raíces/planta en el tratamiento control (T₀)

100: Factor matemático

3.3.10. Porcentaje de peso seco de raíces/planta

Se determinó el peso seco de las raíces siguiendo el procedimiento especificado en el epígrafe 3.3.7 de materiales y métodos. Con la previa separación las raíces de la zona aérea de las plantas (Epígrafe anterior). El peso seco de las raíces/planta se determinó mediante el empleo de una balanza analítica (Zartorius, China).

El porcentaje de peso seco de las raíces/planta se determinó según la ecuación (8):

$$\% \text{ PSR} = \text{PHRT}_x * 100 / \text{PSRT}_0 \text{ (8)}$$

Donde:

% PSR: Porcentaje de peso seco de raíces/planta

PSRT_x: Promedio del peso seco de raíces/planta en el tratamiento correspondiente

PSRT₀: Promedio del peso seco de raíces/planta en el tratamiento control (T₀)

100: Factor matemático

3.3.11. Tolerancia a la salinidad

Aunque este índice no es una variable morfológica ni fisiológica de las plantas, constituye un recurso matemático para evaluar la influencia de las diferentes variables morfológicas en el efecto global de las cepas de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en la mitigación de los daños que provoca la salinidad en las plantas. La tolerancia a la salinidad se definió como el promedio de todas las variables morfológicas evaluadas.

3.3.12. Evaluación de la densidad poblacional de las cepas de *Azospirillum* spp.

Se realizó mediante el análisis microbiológico de la rizosfera de las plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo desde el inicio del experimento (1 día antes de la siembra) y luego a los 12 y 20 días. Se evaluó la población de *Azospirillum* spp. de cada tratamiento en el medio NFB (del inglés, *Nitrogen Fixation Biological*)

semi-sólido (Espinoza, 2004), con algunas modificaciones (Anexo 4). Para ello se tomaron plantas de 3 fundas en cada evaluación.

Procedimiento

Las muestras de raíces conteniendo el suelo del rizoplaneo (suelo adherido a la superficie de las raíces) se pesaron hasta obtener 2 g para cada tratamiento y se lavaron en 20 ml de agua destilada estéril. Este lavado constituyó la dilución 10^{-1} . Se agita vigorosamente en un vortex (IKA, Alemania) y se trasvasa 1 mL hacia un tubo con 9 mL de agua destilada estéril para la dilución 10^{-2} . Este procedimiento se repite hasta la dilución 10^{-10} . En tubos de ensayo se colocaron 10 ml de medio de cultivo Semi-sólido NFB (del inglés, *Nitrogen Fixation Biological*) con algunas modificaciones (Anexo 7). Se prepararon tres tubos con este medio de cultivo para cada dilución.

En cada tubo con medio de cultivo se depositó 1 mL de la dilución correspondiente. Los tubos inoculados se sometieron a incubación durante 5 días a 30 ± 1 °C en una incubadora (Binder, Alemania).

Después de la incubación, se consideraron como tubos con crecimiento bacteriano positivo, aquellos cuyo medio de cultivo se tornó azul y que presentaran una leve película blanquecina a 2-3 mm por debajo de la superficie del medio de cultivo.

Para verificar la presencia de *Azospirillum* spp., en los tubos considerados positivos, se tomó alícuotas de ellos para estriarlas en placas Petri (Anumbra, China) conteniendo medio de cultivo para el enriquecimiento de *Azospirillum* spp. (Döbereiner *et al.*, 1976), con algunas modificaciones (Anexo 8). Estos se incubaron a 30 ± 1 °C durante 5 días hasta obtener colonias circulares, secas y de color blanco, a menudo con centros verdosos. De esta manera los tubos considerados como positivos inicialmente se ratificaron o se desecharon.

De acuerdo a la cantidad de tubos con crecimiento bacteriano positivo se determinó el *número más probable* (NMP) (García, 2003) de *Azospirillum* spp. por gramo de raíz con suelo rizosférico. Para ello, primeramente se anota el número de tubos positivos en cada suspensión (dilución) con lo cual se determina el *número característico*. Este es un número de 3 cifras.

La primera cifra es la mayor dilución para la cual todos los tubos son positivos y las dos cifras restantes se forman por el número de tubos positivos en las siguientes diluciones. Luego la determinación del NMP se realiza utilizando la Tabla de Mc. Crady (Anexo 6). Finalmente, las Unidades Formadoras de Colonia por gramo de raíz con suelo rizosférico (UFC/g) se calcula según la ecuación (9):

$$\text{UFC/g de raíz} = \text{NMP} * 1/D \quad (9)$$

Donde:

UFC/g de raíz: *Unidades Formadoras de Colonias por gramo de raíz con suelo rizosférico*

NMP: *Número más probable de colonias bacterianas*

D: *Dilución correspondiente a la primera cifra del número característico (mayor dilución para la cual todos los tubos resultan positivos)*

3.5. Análisis estadístico

Para el experimento efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones semi-controlada se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado, con tres repeticiones de 12-15 réplicas por tratamiento. El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus *Version 5.1* (2002). Primeramente, a los datos obtenidos se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett. Se aplicó un ANOVA de clasificación simple en la comparación de varias muestras para una probabilidad de error del 5 % ($p < 0.05$). En los casos en que hubo diferencias estadísticamente significativas, se realizó una comparación de medias aplicando la prueba paramétrica de Newman-Keuls, para una probabilidad de error del 5 % ($p < 0.05$).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque muchos de los esfuerzos se centran en el diseño de mejores políticas económicas agrarias y de distribución de los alimentos, resulta obvia la necesidad de desarrollar políticas económicas agrarias y de distribución en el plano puramente científico o científico-tecnológico, que nos conduzca a encontrar soluciones a las limitaciones fisiológicas que restringen la productividad de los cultivos en suelos degradados. Es por ello que en la presente investigación se evaluó la tolerancia a la salinidad de (*Zea mays*, L.) var. Tayuyo.

4.1. Tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones *in vitro*

Entre la gran diversidad de variedades de *Zea mays*, L. que se cultivan en Cuba (Cervantes *et al.*, 2002), se encuentra la variedad Tayuyo. En la actualidad no existen estudios que evalúen la tolerancia a la salinidad de dicha variedad. Por ello, en el presente trabajo se evaluó la tolerancia al estrés salino de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones controladas. Este estrés se indujo empleando concentraciones crecientes de cloruro de sodio (NaCl) para establecer diferentes niveles de conductividad eléctrica (CE) (2, 4, 6 y 8 dS/m). Estos valores de conductividad eléctrica corresponden con -0,072, -0,144, -0,216 y -0,288 MPa de potencial osmótico de soluto, respectivamente, según la ecuación $\Psi_{os} = -a \text{ CE}$, siendo la constante (*a*) igual a 36 para el cloruro de sodio (Porta *et al.*, 1999).

Para la evaluación del efecto del estrés salino sobre la germinación y crecimiento de las plantas se emplean varios indicadores como son: porcentaje de germinación y las variables que caracterizan el crecimiento vegetal. Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de germinación de las semillas se muestran en la Figura 1.

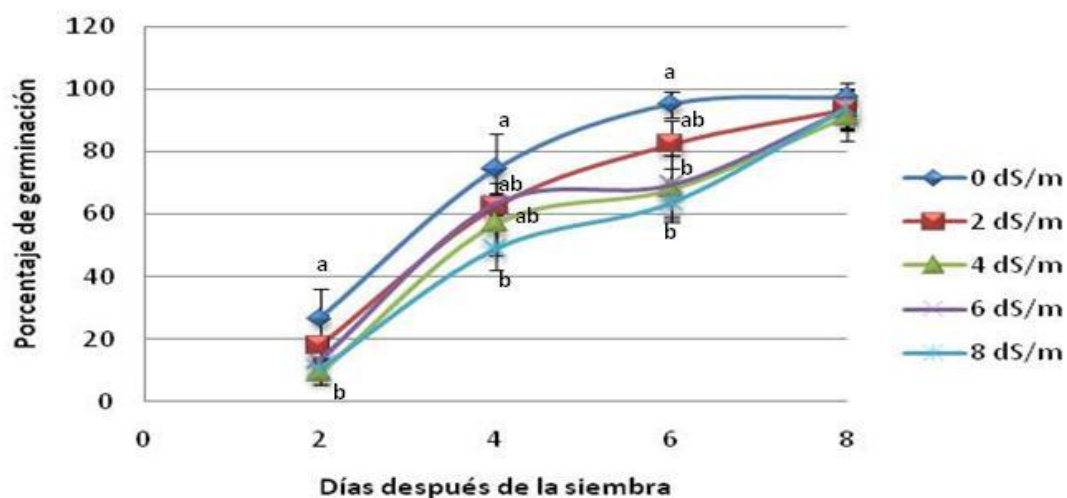


Figura 1. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre la germinación de semillas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para un mismo tiempo de evaluación.

Como se puede observar el porcentaje de semillas germinadas en presencia de cloruro de sodio es menor que cuando no se ha adicionado esta sal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento de 2 dS/m en ninguno de los días de evaluación. Estos resultados sugieren que a conductividades eléctricas menores de 2 dS/m prácticamente no se afecta la germinación de las semillas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo.

Por otro lado, a 4 y 6 dS/m se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con el control solamente en el sexto día después de la siembra de las semillas. Sin embargo, el porcentaje de germinación a 8 dS/m se afectó significativamente con respecto al control durante los primeros 6 días.

Se ha propuesto que la relación entre el incremento de la salinidad y la reducción de la germinación están dados por dos procesos. El primero hace referencia a los efectos osmóticos debidos a una disminución del potencial de solutos, lo cual crea un estrés hídrico para la planta. El segundo implica los efectos iónicos debidos a la absorción y/o acumulación de iones por las semillas o las plántulas (Dodd y Donovan, 1999). La disminución de la germinación inducida por la salinidad es usualmente debida solamente a los efectos

osmóticos (potencial de soluto del sustrato) para las halófitas. Sin embargo, las glicófitas (como el maíz) son más proclives a exhibir toxicidad iónica adicional.

A pesar de las diferencias estadísticamente significativas encontradas, en el octavo día de germinación no se evidenció diferencias apreciables dado que los diferentes niveles de conductividad eléctrica; sólo disminuyeron la germinación en menos de un 6 % con respecto al control. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Laynez- Garsaball *et al.* (2008) quienes evaluaron el efecto del potencial osmótico inducido por cloruro de sodio sobre la germinación de semillas de *Zea mays*, L. var. Himeca 95 y Pioneer 361. Estos autores observaron que la germinación a -0.328 y -0.547 MPa, de presión osmótica, disminuyó en un 20.5 y un 28 % respectivamente para la variedad Himeca. Sin embargo los resultados de la presente investigación son similares a los obtenidos por los autores antes citados para la variedad Pioneer en la cual la salinidad (potencial osmótico de -0.328 y -0.547 MPa) disminuye en un 10 y 6 %, respectivamente, la germinación de las semillas.

Resultados similares obtuvo Martínez A. (1999) en un experimento bajo condiciones de laboratorio con semillas de los cultivares Cargill 717 y Cargill 633, con un 12 % de humedad, quien observó que potenciales de agua de -0.5 y -0.1 MPa preparados con cloruro de sodio disminuyeron la germinación en el cultivar Cargill 717 en un 15.9 y 28.0 %, respectivamente, y en Cargill 633 en un 16 y 23.8 %.

Al analizar los días transcurridos para lograr el 90 % de germinación (Figura 1) se evidenció que el control lo alcanzó al sexto día mientras que el resto de los tratamientos sobrepasó este valor sólo a los ocho días después de la siembra. Estos resultados corroboran lo planteado anteriormente en cuanto a los efectos del estrés salino sobre la germinación de las semillas. Al disminuir el potencial osmótico, es menor la cantidad de agua por unidad de tiempo que la planta puede incorporar bajo estrés por salinidad (Fanti y Pérez, 2004).

A pesar de que, al segundo día de sembradas las semillas de maíz, sólo entre un 9-26 % de estas había germinado con la emergencia de radícula e hipocótilo, más de un 89 % en todos los tratamientos mostraban la primera

(resultados no mostrados). Se evidencia que existió un retardo en la germinación de las semillas bajo estrés salino. Estos resultados sugieren que la salinidad pudiera alargar el tiempo de latencia de las semillas (Mahdavi B y Modarres S, 2007). Sin embargo, el porcentaje de germinación, no se ve afectado significativamente por la salinidad, incluso a 8 dS/m. Por tanto, es posible que tampoco se afectara la actividad enzimática y consecuentemente el desenvolvimiento meristemático y con ello la profusión de la radícula (Falleri, 1994). Así mismo, es probable que no ocurriera afectación de la integridad de la membrana plasmática como ocurrió en plantas de cebada, principalmente en el cultivar AF 98067 estudiadas por Da Silva *et al.* (2007).

La evaluación de variables morfológicas que caractericen el crecimiento radical es de gran importancia en los estudios del efecto del estrés por salinidad, dado que la raíz se encuentra en contacto directo con el sustrato salino. En este sentido, en la presente investigación se evaluó el número de raíces durante 8 días así como la longitud de la mayor raíz/planta.

Como se puede observar en la Figura 2, el número de raíces aumentó con el transcurso de los días, mostrando un comportamiento exponencial para la totalidad de los tratamientos empleados.

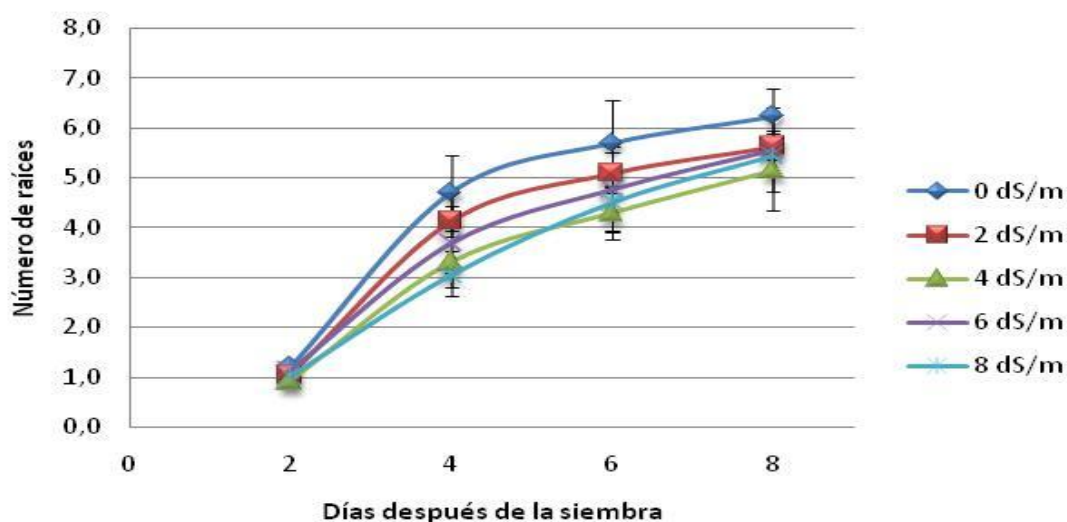


Figura 2. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre el número de raíces de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo.

Aunque se observa una tendencia a la disminución del número de raíces al aumentar la conductividad eléctrica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (2, 4, 6 y 8 dS/m) con respecto al control (0 dS/m) en ninguno de los momentos de evaluación. Estos resultados sugieren que el estrés salino inducido por cloruro de sodio no influye directamente en el proceso de enraizamiento.

El análisis del sistema radical no debe incluir solamente el número de raíces/planta sino la longitud de las mismas y de ser posible el volumen radical. A pesar de los resultados anteriores, al comparar el promedio de la longitud de la mayor raíz/planta (Figura 3), se evidenció una marcada tendencia a la disminución de la longitud radical al aumentar la salinidad.

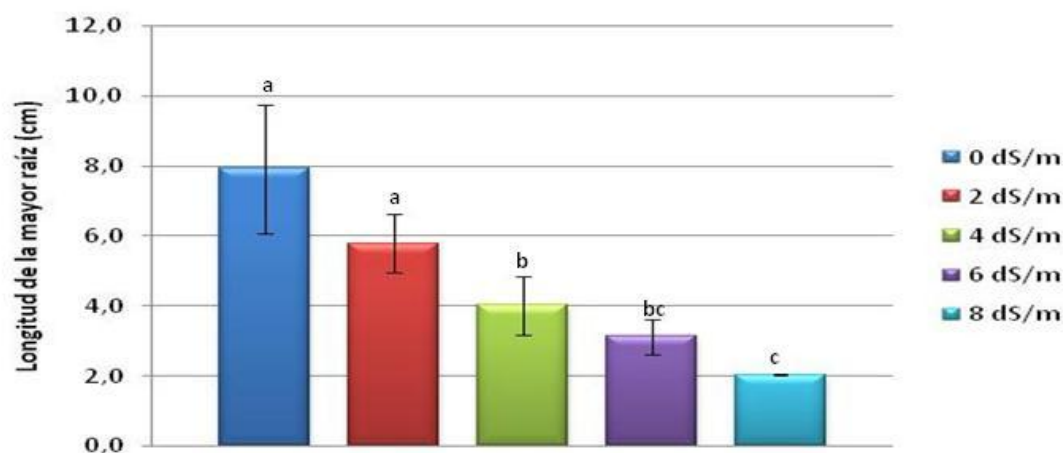


Figura 3. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre la longitud de la mayor raíz/plántula de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Existieron diferencias estadísticamente significativas a partir de 4 dS/m con respecto al control y así mismo se observó una dosis dependencia del efecto antes mencionado, con diferencias significativas entre los tratamientos de estrés salino. Se ha planteado que el estrés osmótico detiene inmediatamente la expansión celular en las raíces y en las hojas jóvenes dado por el cierre estomático (Abebe *et al.*, 2003). Es probable que no se encontraran diferencias apreciables en cuanto al número de raíces con el aumento de la salinidad a causa de que las raíces generadas fueron el resultado del empleo de las

sustancias de reserva de la semilla. Sin embargo, se ha planteado que la salinidad interrumpe procesos de síntesis de proteínas y de otras estructuras como la pared celular (Munns R y Tester M, 2008). Por tanto es de suponer que el alargamiento de las raíces se vea limitado. Otros estudios en *Zea mays*, L. han mostrado una disminución del volumen radical con el aumento de la salinidad (Layne-Garsaball *et al.*, 2008).

Una de las principales variables que se tiene en cuenta en los estudios de tolerancia a la salinidad, además de la longitud de la raíz, es la altura de las plantas dado que la primera absorbe el agua del suelo y el segundo la distribuye al resto de la planta (Jamil M y Rha, 2004; Jamil M *et al.*, 2007). En la Figura 4 se presentan los resultados de la evaluación del efecto de la salinidad sobre la altura de las plantas.

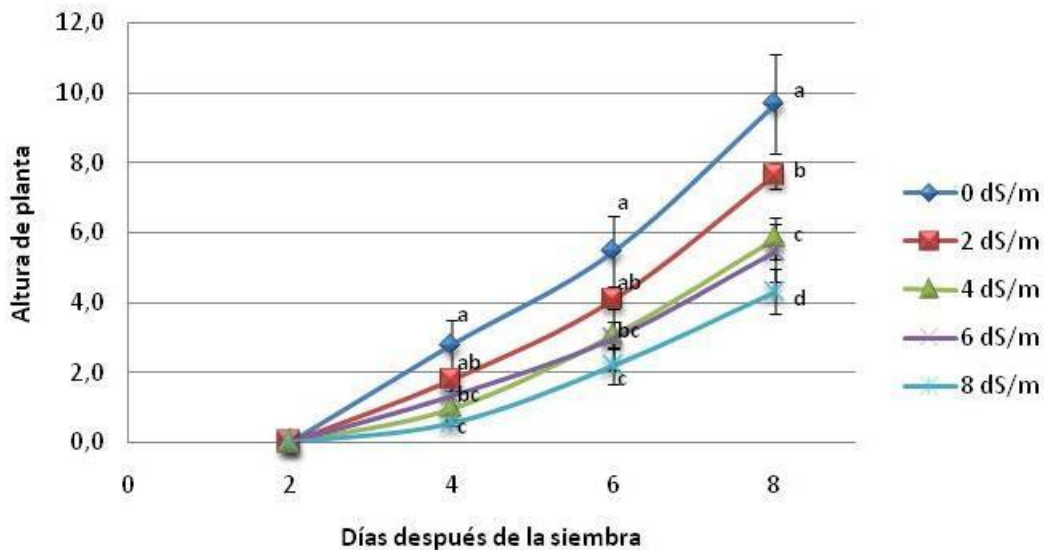


Figura 4. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre la altura de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para un mismo tiempo de evaluación.

Como se puede observar en esta figura las plantas aumentaron exponencialmente su altura en el tiempo de evaluación, lo cual sugiere que no hubo muerte de plantas durante este tiempo. Esta variable se comportó de manera muy similar a la germinación de las semillas. En este sentido se constató que no existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto

a la altura de las plantas crecidas a 2 dS/m con las del control (0 dS/m). Estos resultados, conjuntamente con los discutidos anteriormente, sugieren que esta variedad (Tayuyo) de *Zea mays*, L. podría emplearse con éxito en suelos moderadamente salinos.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de los tratamientos (4, 6 y 8 dS/m) y el control (0 dS/m) a partir del cuarto día en cuanto a la altura de las plantas. La disminución del crecimiento de las plantas, inducida por la salinidad, puede deberse al efecto inhibitorio de los iones y también a la absorción más lenta del agua por las raíces (Jamil M, *et al.*, 2007). Muchos son los estudios realizados, en varias especies, que concuerdan con nuestros resultados (Hu Y y Schimdhalter U, 2005; Munns *et al.*, 2002; Del Amor *et al.*, 2001). En este sentido, Srinivas (2001), realizaron investigaciones donde evaluaron 20 accesiones de *Lycopersicon peruvianum*, 2 accesiones de *L. pimpinellifolium* y 6 de *L. esculentum* empleando NaCl. Los resultados obtenidos en dicha investigación indicaron que 17 accesiones de *L. peruvianum*, muestran efectos perjudiciales, observándose la disminución de crecimiento a niveles de CE superiores a 4,95 dS/m. Así mismo, Laynez-Garsaball *et al.* (2008) trabajando con dos variedades de maíz obtuvieron resultados similares a la presente investigación al observar la disminución de la relación altura de la planta/longitud de la raíz con el aumento de la salinidad. Al evaluar el efecto de la salinidad sobre el número de hojas en plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 5.

Como se evidencia en esta figura, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de 2 dS/m y el control (0 dS/m) a ninguno de los momentos de evaluación. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de 4, 6 y 8 dS/m con respecto al control (0 dS/m) a partir del sexto día donde se comenzó a observar la formación de las hojas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para las variables antes presentadas en este informe. Resultados similares obtuvieron Romero-Aranda *et al.* (2001) trabajando con plantas de tomate.

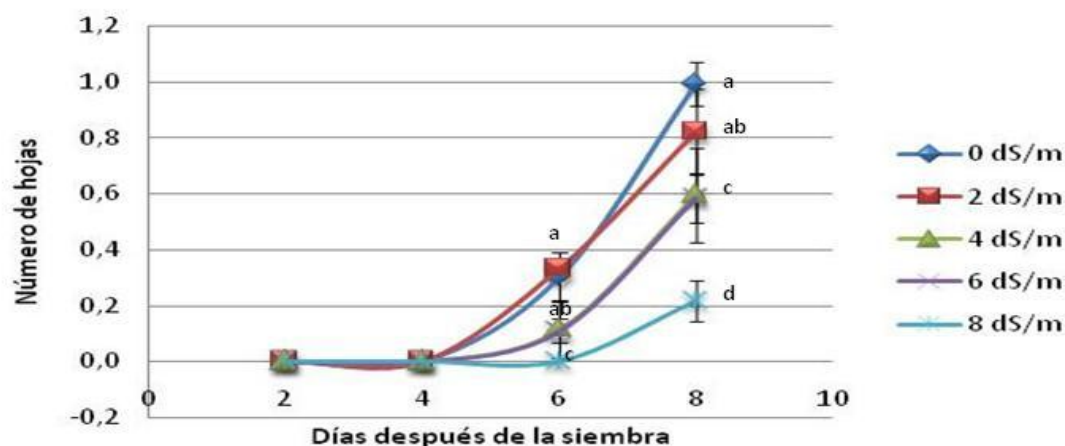


Figura 5. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre el número de hojas de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para un mismo tiempo de evaluación.

Estos resultados pudieran estar dados por disminuciones en los potenciales hídricos foliares y osmóticos según se ha reportado en varias especies (Morales *et al.*, 2003) entre las que se encuentra *Zea mays*, L (González *et al.*, 1997). Estos resultados también pudieran explicarse por una disminución de la fotosíntesis con el aumento de la salinidad (Goykovic y Saavedra, 2007).

El peso húmedo de las plantas puede dar una idea de la biomasa, aunque se debe tener en cuenta que las cantidades de agua pueden influir. En la Figura 6 se muestran los resultados del efecto de la salinidad sobre el porcentaje de peso húmedo con respecto al control de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo.

Se observa que con el aumento de la conductividad eléctrica existe una disminución del peso húmedo de las plantas evaluadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el resto de las variables discutidas en la presente investigación lo cual era de esperarse. El peso húmedo de la planta depende en gran medida de todos los órganos de la misma, por tanto, influyen en este el número, longitud y volumen de las raíces, la altura y diámetro del vástago, el número de hojas y el área foliar. Teniendo en cuenta lo antes planteado, estos resultados son muy fidedignos.

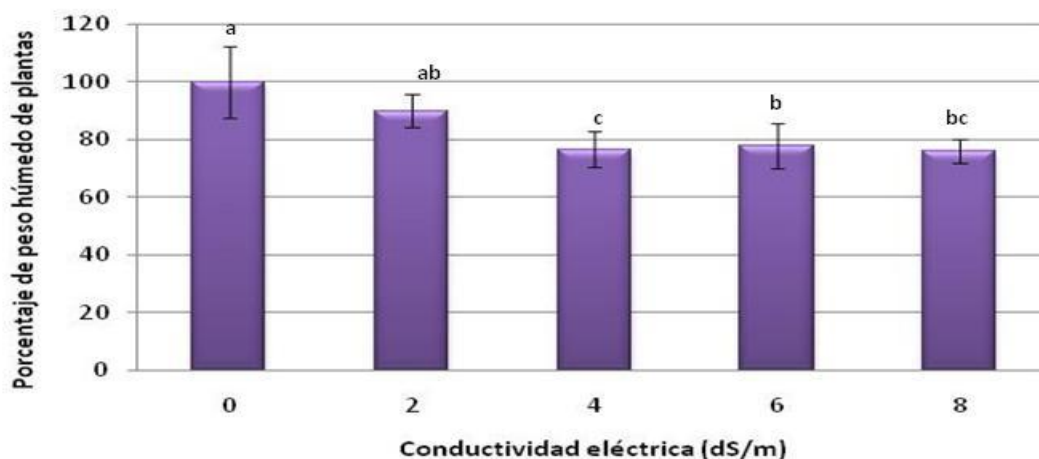


Figura 6. Efecto *in vitro* del estrés salino sobre el porcentaje de peso húmedo de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo con respecto al control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de peso húmedo de las plantas crecidas a 2 dS/m y las plantas que se desarrollaron en el sustrato control (0 dS/m). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las plantas desarrolladas en los sustratos con 4, 6 y 8 dS/m con respecto al control (0 dS/m). Estos resultados concuerdan con reportes en la literatura científica que indican la ocurrencia de una disminución en varias características morfológicas de las plantas al aumentar los niveles de salinidad. En este sentido se han encontrado resultados similares a los obtenidos en la presente investigación al determinar el efecto de la salinidad en el peso fresco del vástago y de las raíces en dos variedades de *Zea mays*, L. (Layne-Garsaball *et al.*, 2008). Estos resultados podrían estar dados por los efectos osmóticos que provoca el aumento de la conductividad eléctrica (Porta *et al.*, 1999) y por tanto probable que ocurriera una disminución del flujo de agua hacia el interior de las plantas. Lo anterior pudiera afectar la nutrición incluso por los iones salinos, Na^+ y Cl^- , que pueden suprimir la absorción neta de nutrimentos debido a las interacciones competitivas iónicas o afectar la integridad de la membrana (Araujo *et al.*, 2006). De esta manera la disminución del crecimiento se muestra como la disminución en el peso húmedo de las plantas.

No obstante, no se evidenciaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de peso húmedo de las plantas crecidas en sustratos con más de 4 dS/m. Estos resultados sugieren que probablemente a partir de 4 dS/m y hasta 8 dS/m las plantas comenzaron a exhibir los mecanismos de tolerancia a la salinidad de manera exitosa. Los mecanismos de tolerancia a la salinidad inducidos en las plantas en presencia de altas concentraciones salinas se han enmarcado en tres grupos: tolerancia al estrés osmótico, exclusión de sodio mediante las raíces y la tolerancia de los tejidos por compartimentación de los iones (Munns R y Tester M, 2008).

Con el objetivo de tener una idea global del efecto de la salinidad sobre la germinación y crecimiento de las plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, se determinó el porcentaje del índice de tolerancia con respecto al control. Este refiere el promedio de todas las variables evaluadas para cada tratamiento (Figura 7).

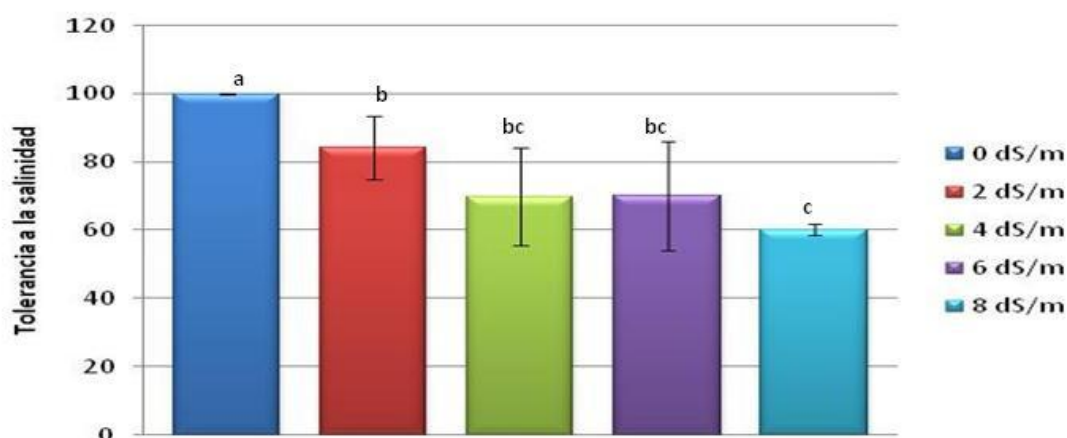


Figura 7. Tolerancia *in vitro* al estrés salino de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se puede observar que existe una completa concordancia con los resultados discutidos anteriormente. Es evidente la tendencia en la disminución del índice de tolerancia con el aumento de los niveles de salinidad.

En general, el incremento de los niveles de salinidad (disminución del potencial osmótico) causó un retardo de la germinación pero no en el porcentaje de

germinación a los ocho días después de la siembra. Por otro lado, el resto de las variables (número de raíces, longitud de la mayor raíz/planta, altura de las plantas, número de hojas y el porcentaje de peso húmedo de las plantas) evaluadas mostraron una tendencia a la disminución con el incremento de los niveles de salinidad.

Las sales afectan las funciones de la membrana y las paredes celulares (Mahdavi y Modarres, 2007). El NaCl afecta la permeabilidad de las membranas plasmáticas e incrementa el influjo de iones externos y el eflujo de solutos cistólicos en las células de las plantas (Allen *et al.*, 1995). El NaCl también causa endurecimiento de la pared celular y un aumento en la conductividad hídrica de la membrana plasmática. Estos efectos sobre las funciones de las membranas y paredes celulares pueden afectar el potencial del citosol y la extensibilidad celular y así, puede también afectar la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas (Mahdavi y Modarres, 2007).

4.2. Caracterización fenotípica de cepas de *Azospirillum* spp.

Actualmente, se reporta una gran cantidad de microorganismos cuya aplicación al suelo es beneficiosa. Dentro de las poblaciones microbianas del suelo existen grupos bacterianos de importancia agrícola, como el género *Azospirillum*. Este género bacteriano ha sido profundamente estudiado y se le adjudican una gran cantidad de propiedades biológicas como la de promover el crecimiento de las plantas, e incrementar los niveles de asimilación de nutrientes (Saura *et al.*, 2003). También es ampliamente conocido que fija el nitrógeno atmosférico cuando la tensión parcial de oxígeno es baja (Cocking, 2003; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), capacidad de antibiosis (Bashan y de-Bashan, 2002) produce sideróforos y sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, como auxinas, giberelinas y citocininas (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006; Okon *et al.*, 1986).

Estas características hacen del género *Azospirillum* una tentativa para la producción de biofertilizantes, sin embargo, son pocos los estudios realizados sobre la caracterización fenotípica de estas bacterias. Esta evaluación es de

vital importancia, dado que aunque se obtengan resultados promisorios en cuanto a las propiedades biológicas y agronómicas de una cepa, no se conoce si será efectiva en una zona geográfica opuesta. Por ello se caracterizaron fenotípicamente las cepas objeto de estudio.

Al realizar la caracterización fenotípica de un microorganismo es de vital importancia describir las características micromorfológicas y macromorfológicas. En la presente investigación se caracterizaron tres cepas de *Azospirillum* spp. Las características micromorfológicas se muestran en la Figura 8.

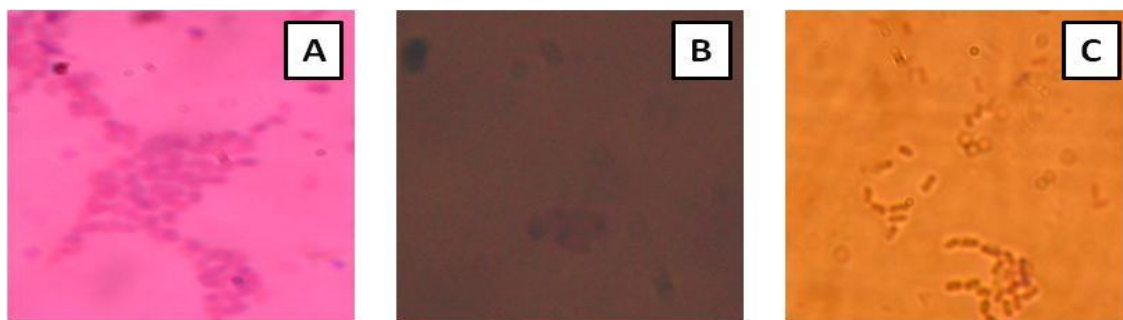


Figura 8. Observación al microscopio óptico (1000 x) de cepas de *Azospirillum* spp. sometidas a la tinción de Gram. **A:** C₂, **B:**C₃ y **C:**C₄.

Como se puede observar las tres cepas responden negativo a la tinción de Gram, presentando forma vibrioide y en ocasiones muestran pleomorfismo. Las células jóvenes se observan al microscopio con zonas refringentes, con forma ovoide y de paredes gruesas, similares a quistes. Estas características concuerdan con las reportadas para el género *Azospirillum* (Tennakoon, 2007). Adicionalmente, se realizó el crecimiento de las cepas en medio Agar Rojo Congo y se incubaron a diferentes temperaturas para determinar las características culturales. En la Figura 9 se muestran fotografías de las tres cepas de *Azospirillum* crecidas a $38 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se aprecian diferencias marcadas entre las colonias de las tres cepas. La cepa C₂ se caracteriza por presentar colonias planas y brillantes de gran tamaño, con forma circular y bordes enteros. La C₃ se caracteriza por presentar colonias brillantes con forma circular con bordes irregulares, elevadas en los bordes y

deprimidas en el centro. Mientras que C₄ crece en medio sólido con colonias filamentosas y bordes lobulados. Las tres mostraron la coloración rojo escarlata característica de *Azospirillum* spp. crecidas en Agar Rojo Congo.

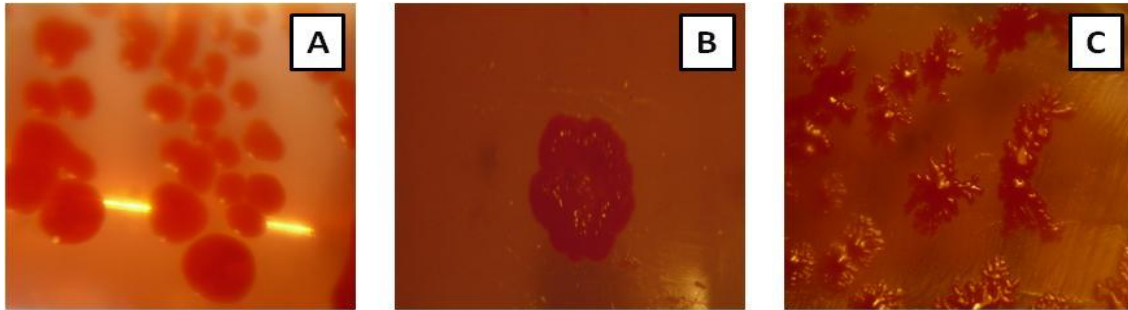


Figura 9. Colonias de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. crecidas sobre Agar Rojo Congo a 38 ± 2 °C.

Las características culturales fueron similares a las diferentes temperaturas evaluadas. En la tabla 8 se muestran los resultados del crecimiento de las tres cepas de modo cualitativo.

Tabla 8. Efecto *in vitro* de la temperatura en el crecimiento de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp.

CEPAS	TEMPERATURA (°C)			
	18	28	38	48
C2	+	+++	+++	++
C3	++	+++	+++	+++
C4	+	+++	+++	+++

Como se puede apreciar, las cepas crecieron a todas las temperaturas evaluadas, desde 18 °C hasta 48 °C. Sin embargo, las tres cepas crecieron mejor a los 28 y 38 °C encontrándose mayor densidad de colonias. Estos resultados son interesantes dado que aunque las cepas fueron aisladas de zonas geográficas (Tungurahua, Bolívar y Chimborazo) con clima frío, los mejores resultados se obtuvieron a temperaturas cálidas. Espinoza (2004) aisló las cepas de las zonas antes mencionadas y observó un buen crecimiento a 32 °C. Sin embargo, Yáñez *et al.* (2004) trabajando con las variedades de *Zea mays*, L. var. INIAP-102 e INIAP-124; así como, Molina (2006) con la primera

variedad, realizaron ensayos en campo empleando las cepas C₂ y C₃ como biofertilizante de la variedad INIAP 102 y determinaron que estas cepas presentaron buena adaptabilidad y desarrollo en el cultivo de maíz, bajo condiciones de pH 7, temperatura y humedad promedio de 14.9 °C y 78 %, respectivamente. Los buenos resultados a estas temperaturas pudieran estar influidos por la presión atmosférica en la zona de estudio, dado a que se encuentra a una altura de 2756 m sobre el nivel del mar.

Teniendo en cuenta que los problemas de salinidad van aparejados, en ocasiones, con los de acidez del suelo, también se evaluó el comportamiento de las tres cepas de *Azospirillum* spp. bajo estrés por pH (Figura 10).

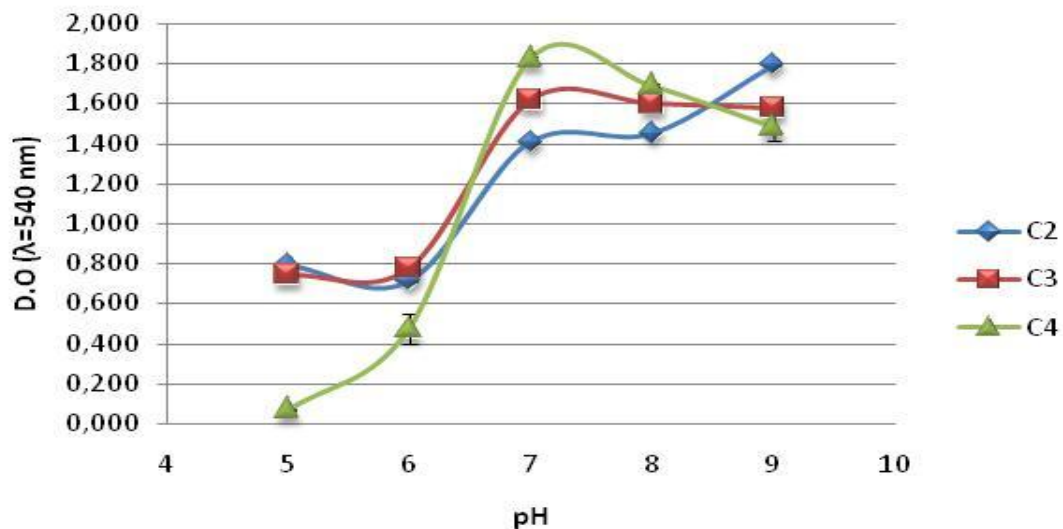


Figura 10. Efecto *in vitro* del pH en el crecimiento de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp.

Se observó que las tres cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. evaluadas mostraron un buen crecimiento a pH mayor que 7 con valores de D.O superiores a uno, lo cual indica que hay más de 10⁹ UFC/ml según lo descrito por Bashan (1997). No obstante, se debe resaltar que las cepas C₂ y C₃ mostraron crecimiento al menor valor de pH evaluado en este estudio (pH=5) a diferencia de la cepa C₄. Muthukumarasamy *et al.* (2000) plantea que la actividad nitrogenasa de las cepas endófitas se favorece cuando estas se cultivan a pH entre ácido y neutro (pH=5-7), y se inhiben a pH 3 y 8. Teniendo

en cuenta que las tres cepas crecieron bien a pH alcalino y que se cultivaron en medio libre de nitrógeno, es de suponer que estas cepas sean capaces de fijar nitrógeno atmosférico incluso a estos niveles de alcalinidad.

La cepa C₂ mostró una meseta entre los valores de D.O obtenidos a pH=7 y pH=8, sin embargo incrementó este valor para pH=9. Estos resultados sugieren que el pH óptimo de crecimiento de esta cepa es igual o superior a pH=9, lo cual no concuerda con reportes en la literatura que refieren el pH entre 6 y 7.8 como valor óptimo para el crecimiento de *Azospirillum*.

Así mismo, la cepa C₃ mostró valores similares de D.O a partir de pH=7 hasta pH=9. Estos resultados sugieren que el pH óptimo de crecimiento de esta cepa puede considerarse como un rango de pH entre 7 y 9. Los resultados obtenidos para las cepas antes mencionadas son promisorios, por cuanto es posible emplearlas como biofertilizantes en suelos desde neutros hasta altamente básicos. Sin embargo, los resultados para la cepa C₄ indican que pH=7 es el óptimo para el crecimiento de esta cepa. No obstante, el crecimiento a pH=8 y pH=9 no tomó valores de D.O menores de 1.400, lo cual sugiere que igualmente puede ser empleado en suelos alcalinos.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. frente a la salinidad inducida por cloruro de sodio, se hicieron crecer en Caldo Ácido Succínico a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (Figura 11).

Se encontró que las cepas C₂ y C₃ muestran un buen crecimiento hasta 3.5 % (m/v) de cloruro de sodio. A partir de esta concentración comenzó a disminuir el valor de D.O hasta caer completamente en el medio de cultivo con un 5 % (m/v) de cloruro de sodio. Por otro lado, la cepa C₄ mostró ser menos tolerante a la salinidad al disminuir bruscamente los valores de D.O a partir de 2.5 % (m/v) de concentración de cloruro de sodio en el medio de cultivo. Estos corroboran reportes en la literatura que indican que los representantes del género *Azospirillum* no son halófilos.

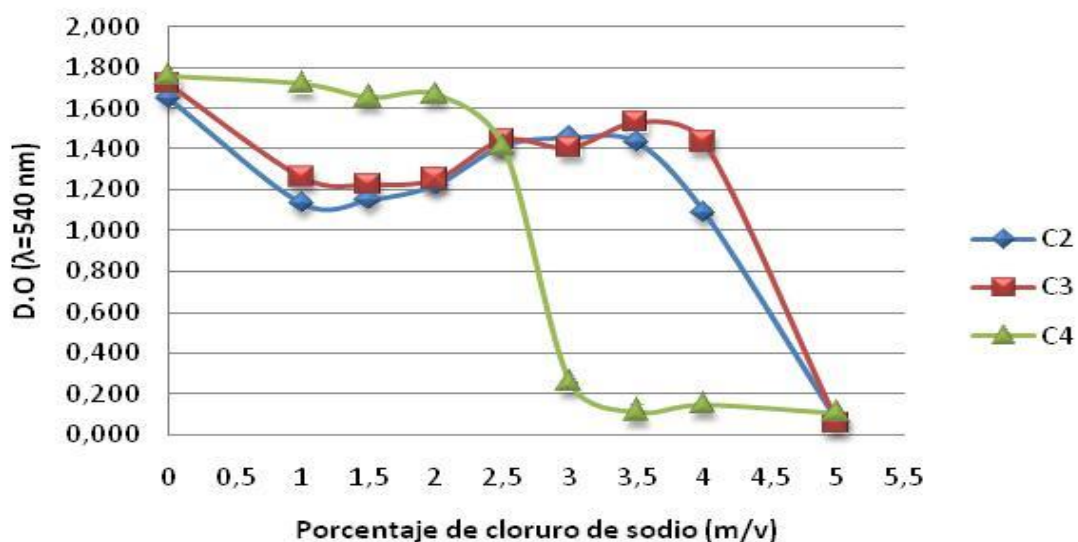


Figura 11. Efecto *in vitro* de la salinidad inducida por cloruro de sodio en el crecimiento de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp.

No obstante, teniendo en cuenta que la conductividad eléctrica del medio de cultivo basal fue de 6.73 dS/m, los incrementos en los porcentajes de cloruro de sodio en este ensayo aumentan la conductividad eléctrica a más de 15 dS/m para el 2 % (m/v) de cloruro de sodio. Por tanto, los resultados obtenidos en la presente investigación son muy promisorios pues indican que es posible emplear las cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. objeto de estudio como biofertilizantes en suelos altamente salinos.

4.3. Efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de *Zea mays*, L. var. Tayuyo en condiciones semi-controladas

Los representantes del género *Azospirillum* son una alternativa ecológica para suplir las necesidades de fertilizaciones nitrogenadas, que además puede aportar estimuladores del crecimiento para las plantas (Saura *et ál.*, 2003). Diferentes trabajos han demostrado la eficiencia del uso de la bacteria *Azospirillum* en el rendimiento de los cultivos a través de la fijación biológica del nitrógeno y la producción de reguladores de crecimiento (Vicentini, 2007). Se conoce que muchos microorganismos intervienen en la recuperación de suelos afectados por las malas prácticas agrícolas (Barea *et al.* 2002). Por ello

en la presente investigación se evaluó el efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en la tolerancia de las plantas al estrés salino.

El análisis físico-químico del suelo empleado reveló una conductividad de 3.2 ± 0.1 dS/m lo que indica que es un suelo débilmente salino y el pH de 8.47 ± 0.2 , lo que indica que es un suelo ligeramente alcalino.

En la Figura 12 se muestra el efecto de las tres cepas antes mencionadas y sus combinaciones, sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo a los dos días de la siembra e inoculación de las semillas.

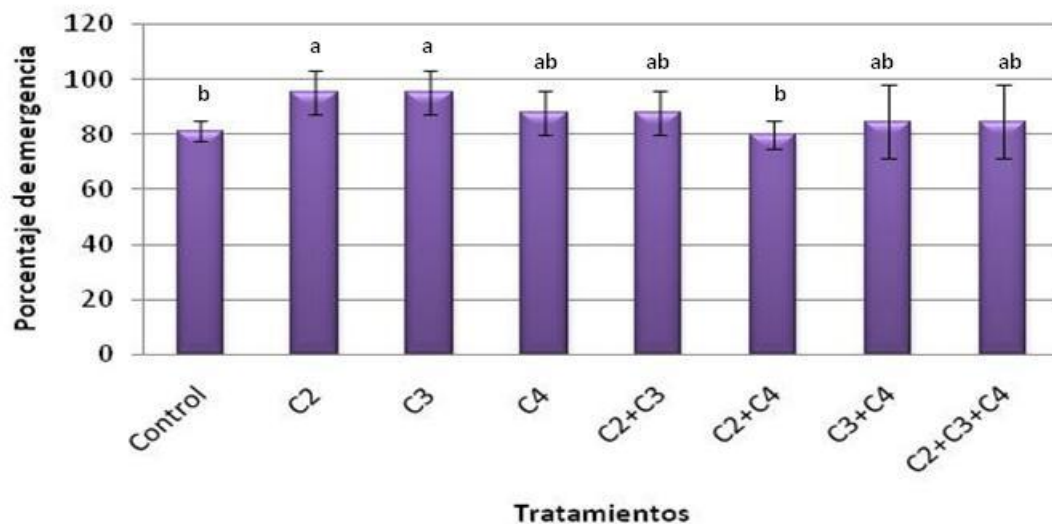


Figura 12. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de emergencia de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Como se puede observar las cepas C_2 y C_3 fueron las que más influyeron positivamente en el porcentaje de emergencia de las plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$). La cepa C_4 y las combinaciones de las diferentes cepas (C_2+C_3 , C_2+C_4 , C_3+C_4 y $C_2+C_3+C_4$) no mostraron diferencias significativas con respecto al control (sin la adición de cepas de *Azospirillum* spp.).

Estos resultados sugieren que es posible emplear las cepas C₂ y C₃ de manera independiente como estimuladores de la emergencia de plántulas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo inoculándolas al momento de la siembra de las semillas. Varias investigaciones han demostrado la efectividad del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la inducción de tolerancia al estrés salino de plantas de interés agrícola (Bashan *et al.*, 2004; Barassi *et al.*, 2008).

Resultados similares obtuvieron Barassi *et al.* (2006) quienes realizaron estudios de inoculación de *Azospirillum brasilense* en semillas de lechuga tipo mantecosa. Los resultados obtenidos por los mismos autores demostraron que la inoculación incrementó el poder germinativo y la biomasa aérea con respecto a los controles sin inocular en condiciones de estrés salino.

Aunque es de gran interés lo antes discutido, no se puede dejar de tratar el efecto de la inoculación de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. en la tolerancia al estrés salino de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo (Figura 13).

En esta figura se evidencia que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos con respecto al control en cuanto a la altura de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo a los 20 días de de las cepas sembradas e inoculadas las semillas.

Resultados que sugieren que la adición de las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp. en esta variedad de maíz no induce aumento en la tolerancia a la salinidad en cuanto a la altura de las plantas. Estos resultados no concuerdan con los reportados por autores como (Bashan *et al.*, 2004; Barassi *et al.*, 2008) quienes encontraron diferencias significativas en este parámetro morfológico entre semillas inoculadas y el control no inoculado en especies como la lechuga (*Lactuca sativa*, L.).

Otro de los parámetros morfológicos evaluados fue la altura de las plantas sin inocular e inoculadas con las cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. objeto de estudio (Figura 13).

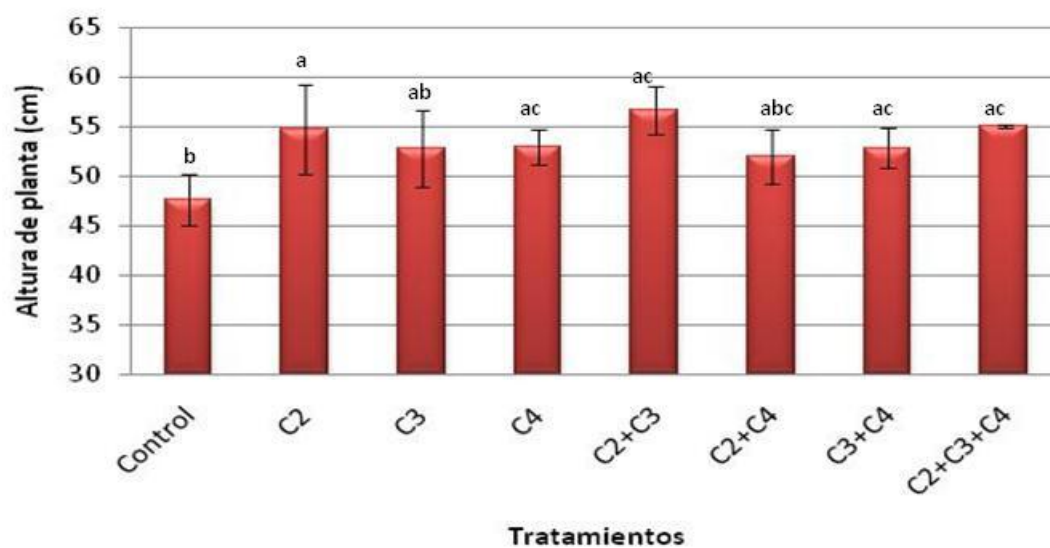


Figura 13. Efecto de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. en la altura de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los mejores resultados, a los 20 días de la siembra de las semillas, para esta variable morfológica se obtuvieron para la combinación de las cepas C₂+C₃, seguido por el empleo de la cepa C₂ de manera individual y la combinación de las tres cepas (C₂+C₃+C₄), así como, la C₄ individual y la combinación C₃+C₄. En todos los casos antes mencionados se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para una $p < 0.05$. Resultados similares han sido reportados para otras especies como la lechuga (Barassi *et al.*, 2008) y *Oryza sativa* L. (García *et al.*, 2010). Estos últimos autores, emplearon como controles urea al 100 % y 50 % y obtuvieron resultados significativamente superiores en la altura de las plantas inoculadas con algunas cepas de *Azospirillum* spp. nativas con respecto a los controles. En experimentos realizados con las mismas cepas empleadas en la presente investigación, pero en condiciones de campo, se obtuvieron resultados similares para C₂, sin embargo, no así para la C₃ (Cool, 2010).

Los resultados antes discutidos pueden estar dados a que *Azospirillum* es capaz de producir hormonas vegetales. Entre estas se encuentran auxinas,

citocininas, giberelinas, así como aminoácidos y poliaminas (Caballero, 2001). Entre las auxinas se destaca el ácido indol acético (AIA), el cual, es el responsable de promover el crecimiento vegetal debido a que actúa en la elongación y multiplicación celular. Estos resultados también pueden estar respondiendo al efecto de la bacteria *Azospirillum* como fijadora de nitrógeno y por ende interviene en el incremento del tamaño de las plantas (Novo, 2002). Resultados que sugieren que es probable que las cepas de *Azospirillum* empleadas hayan mitigado los efectos de la salinidad del suelo (Barassi *et al.*, 2006), de forma que permitieron un aumento apreciable en el tamaño de las plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo. Estos resultados son promisorios ya que probablemente puedan obtenerse mejores resultados en las producciones de esta variedad de maíz en suelos moderadamente salinos con el empleo de las cepas empleadas en la presente investigación.

Al analizar el porcentaje de hojas por plantas con respecto al control (Figura 14), se puede observar que sólo existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las combinaciones de las cepas C_3+C_4 y $C_2+C_3+C_4$.

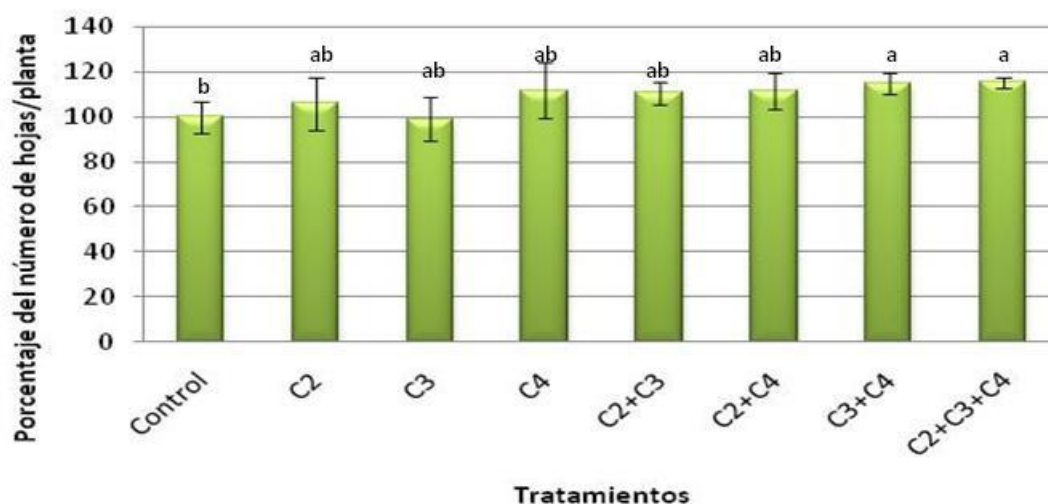


Figura 14. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje del número de hojas/plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la combinación de las cepas antes mencionadas son más efectivas para lograr un mayor número de hojas/plantas al cultivar *Zea mays*, L. var. Tayuyo en suelos débilmente salino. Se han reportado resultados similares para otras especies vegetales en cuanto al aumento del número de hojas/planta con la inoculación de cepas de *Azospirillum* en plantas de lechuga (Bashan *et al.*, 2004).

Se determinó además, el efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso húmedo de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino (Figura 15).

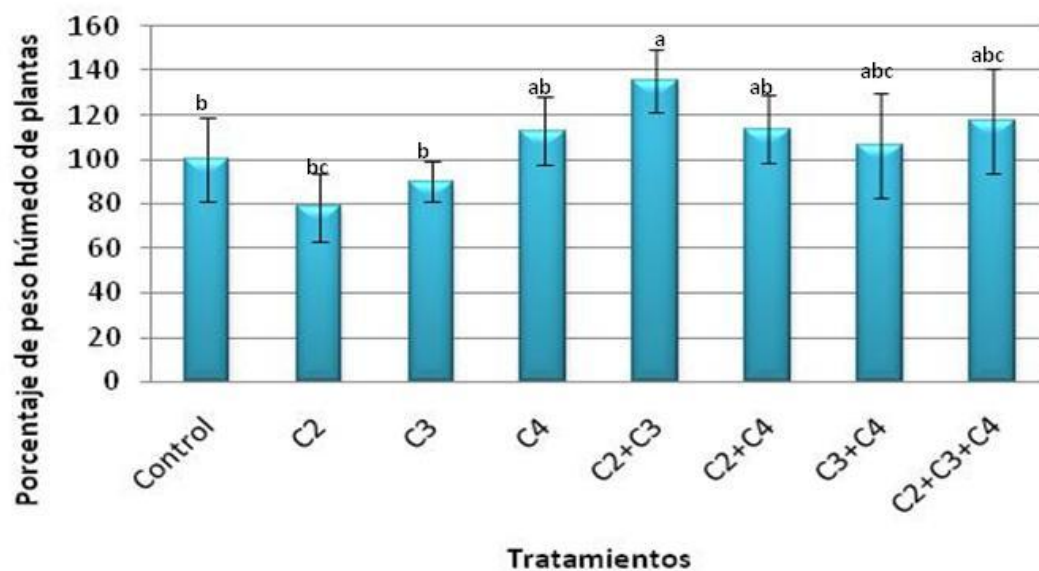


Figura 15. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso húmedo de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Como se puede observar en esta figura sólo la combinación C_2+C_3 mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Es de destacar que las cepas C_2 y C_3 por separado mostraron una tendencia a la disminución del peso húmedo de las plantas de maíz aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados pudieran explicarse por la diferencia en contenido de agua de las plantas bajo los diferentes tratamientos. Resultados que sugieren que probablemente la interacción entre las cepas C_2 y C_3 permite a las plantas una mayor absorción de agua.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para el efecto de la inoculación de las cepas objeto de estudio en la variedad Tayuyo de maíz en cuanto al peso seco de las plantas (Figura 16) se pudo observar una correspondencia en los resultados para la combinación C_2+C_3 .

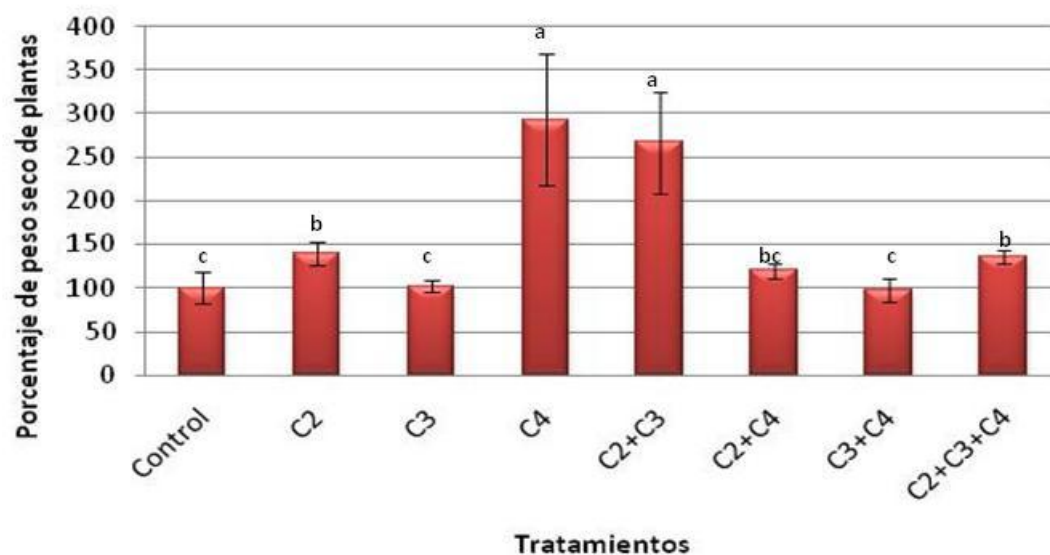


Figura 16. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso seco de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre C_4 , C_2 y la combinación de las tres cepas (C_2 , C_3 y C_4). Se debe resaltar que con el empleo de la cepa C_4 y la combinación C_2+C_3 se logró casi triplicar el peso seco de las plantas con respecto al control. Estos resultados corroboran lo planteado anteriormente sobre la diferencia en contenido de agua entre las plantas a las que se les aplicaron los diferentes tratamientos, dado que en este caso no se encontró tendencia a la disminución del peso seco de las plantas. En este sentido, los resultados sugieren que la cepa C_4 y la combinación C_2+C_3 en lugar

de aumentar el poder de absorción de agua por las plantas, al parecer, inducen la síntesis macromolecular. Lo cual se basa en que para el peso húmedo la diferencia con el control es de menos de un 40 % (Figura 15) mientras que para el peso seco la diferencia es en más de un 150 % (Figura 16).

En otras investigaciones se ha demostrado que la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum* induce un aumento en el peso seco de las plantas. En este sentido, Barassi *et al.* (2006) estudiando el efecto de la adición de cepas de *Azospirillum* en la tolerancia a la salinidad de plantas de lechuga encontraron que la inoculación revirtió el efecto negativo de la salinidad sobre el peso seco de la zona aérea (PSA) en todos los niveles de salinidad. Dentro de cada nivel de salinidad el PSA de las plántulas inoculadas superó al de las controles en un 29 %, un 33 % y un 150 % respectivamente.

Dado que se ha estudiado el efecto de la inoculación de *Azospirillum* en el enraizamiento de algunas plantas, resulta de interés la evaluación del efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de enraizamiento de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelos débilmente salinos (Figura 17).

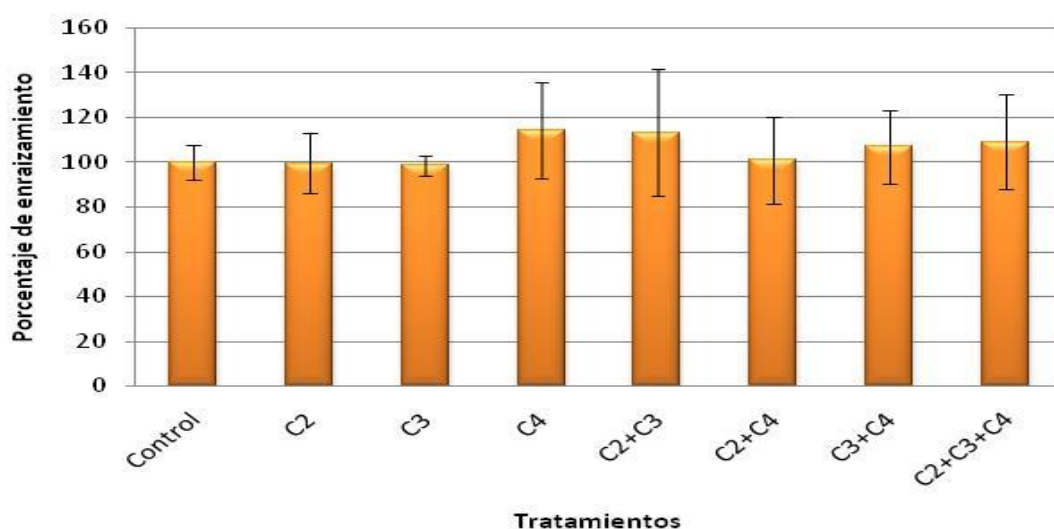


Figura 17. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de enraizamiento de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas.

Como se puede observar no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos y el control sin inocular ($p < 0.05$). Estos resultados no concuerdan con reportes en la literatura científica que indican que la inoculación con *Azospirillum* promueve el desarrollo de la planta dado a la producción por el primero de estimuladores del crecimiento (Vande Broek *et al.*, 2000) como son las auxinas. Dentro de estas el ácido indol acético (IAA), induce el aumento de pelos radiculares, logrando con esto la planta una mayor absorción de nutrientes. Otra auxina que se ha relacionado con *Azospirillum brasilense* es el ácido indol butírico (IBA) encontrado en plántulas de maíz inoculadas con este microorganismo (Novo, 2002).

Al analizar los resultados del efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso húmedo de raíces de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino (Figura 18) se observaron resultados similares al porcentaje de enraizamiento excepto para las plantas inoculadas con las cepas C_2 y C_3 .

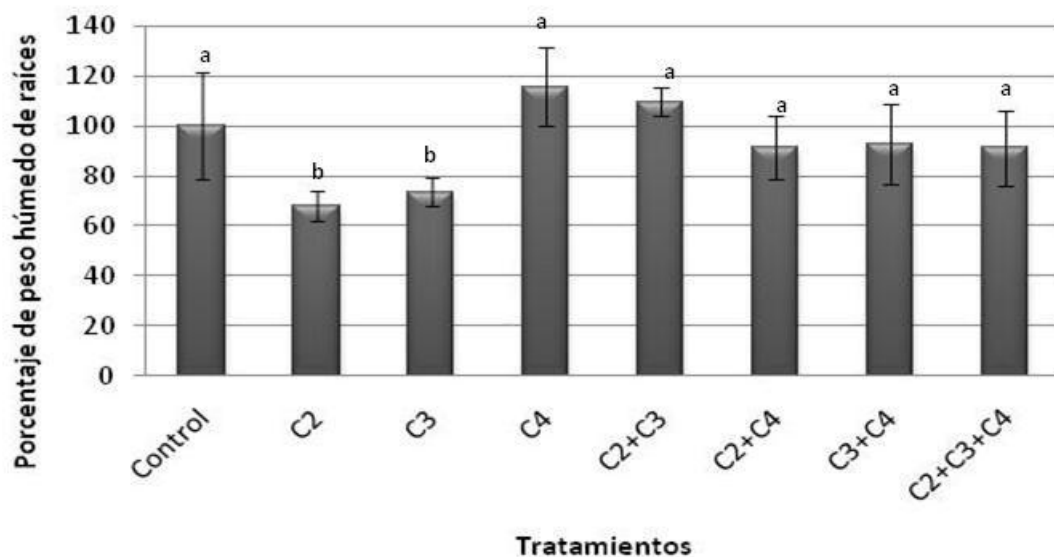


Figura 18. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso húmedo de raíces de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En el caso de estos dos últimos tratamientos se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Como se puede observar el peso húmedo de las plantas inoculadas con las cepas C_2 y C_3 fue significativamente menor que el del control, sin embargo, estos resultados no coinciden con los obtenidos para el peso seco de las raíces (Figura 19).

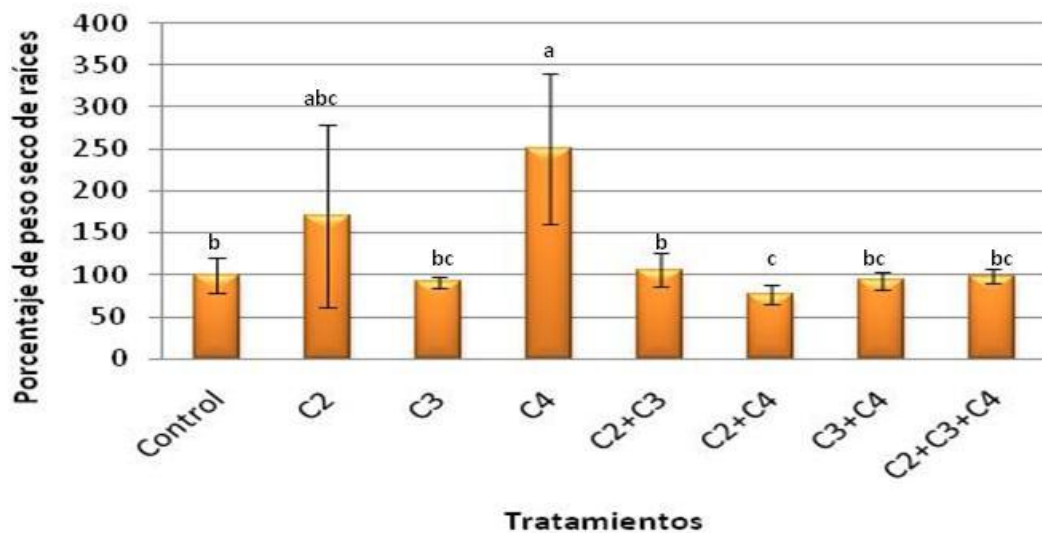


Figura 19. Efecto de cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. en el porcentaje de peso seco de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Como se puede observar las diferencias significativas existentes para el peso húmedo en el caso de las cepas C_2 y C_3 desaparecen para el peso seco. Estos resultados pueden estar dados por diferencias en el contenido de agua de las plantas de los diferentes tratamientos. Resultados que sugieren que probablemente las cepas antes mencionadas provocan una disminución en la absorción de agua por parte de las raíces de estas plantas (Okon Y y Kapulnik Y, 1986).

Así mismo, la inoculación con la cepa C_4 no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en cuanto a peso

húmedo (Figura 18). Sin embargo, existieron diferencias apreciables en cuanto al peso seco de las raíces de las plantas inoculadas con esta cepa.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Rodríguez *et al.* (1996) quienes inocularon dos cepas de *Azospirillum* en plantas de trigo y obtuvieron un aumento del 37 % y del 30 % del peso seco de las raíces de estas plantas para las cepas Az 39 y Cd, respectivamente. Igualmente, Fulchieri y Frioni (1994) observaron que la inoculación de plantas de maíz con las cepas Az 39 de *Azospirillum brasilense* y la cepa Az 30 de *Azospirillum lipoferum* incrementaron el peso seco de las raíces de las plantas inoculadas en más de dos veces el peso seco de las plantas controles.

Estos resultados podrían estar dados por la capacidad de la cepa C₄ de producir mayor cantidad de hormonas estimulantes del crecimiento radicular como son las giberelinas (Bottini *et al.*, 1989).

Al igual que en el acápite 4.1, de materiales y métodos, se calculó el promedio de todas las variables evaluadas durante el experimento. Los resultados se muestran en la Figura 20.

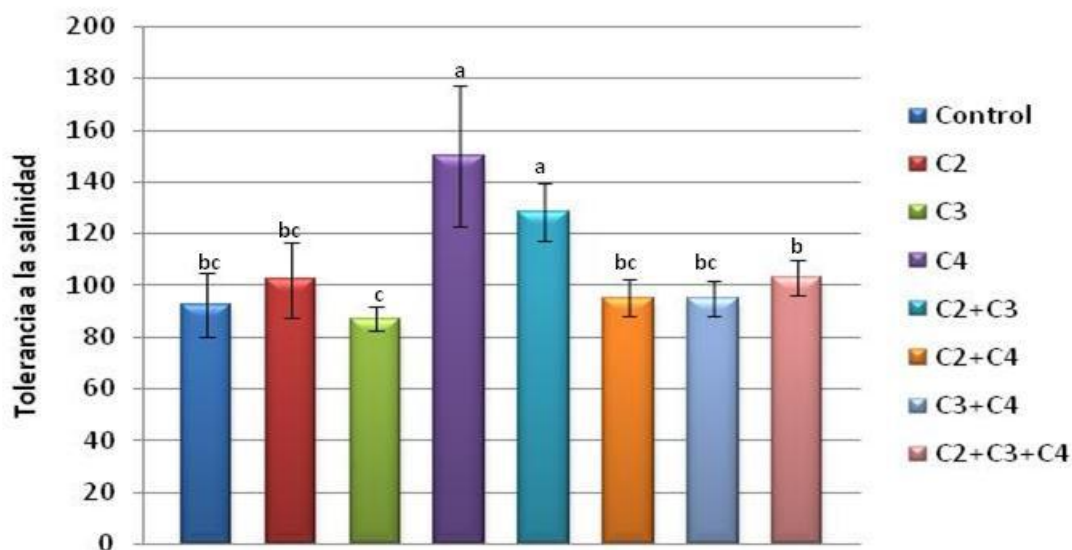


Figura 20. Efecto de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. en la tolerancia a la salinidad de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Teniendo en cuenta los valores numéricos obtenidos, se puede apreciar que sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos donde se inocularon las combinaciones C₄ y C₂+C₃. Estos resultados sugieren que las combinaciones de cepas de *Azospirillum* spp. mencionadas anteriormente mitigan los daños causados por la salinidad en plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino. No se han encontrado reportes en la literatura especializada de estudios relacionados con el empleo de combinaciones de cepas de *Azospirillum* en la mitigación de los daños provocados por la salinidad en plantas de *Zea mays*, L. Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de la densidad poblacional de *Azospirillum* antes y después de la siembra de las semillas de maíz, así como inoculadas o no inoculadas con las cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en suelo ligeramente salino (Figura 21).

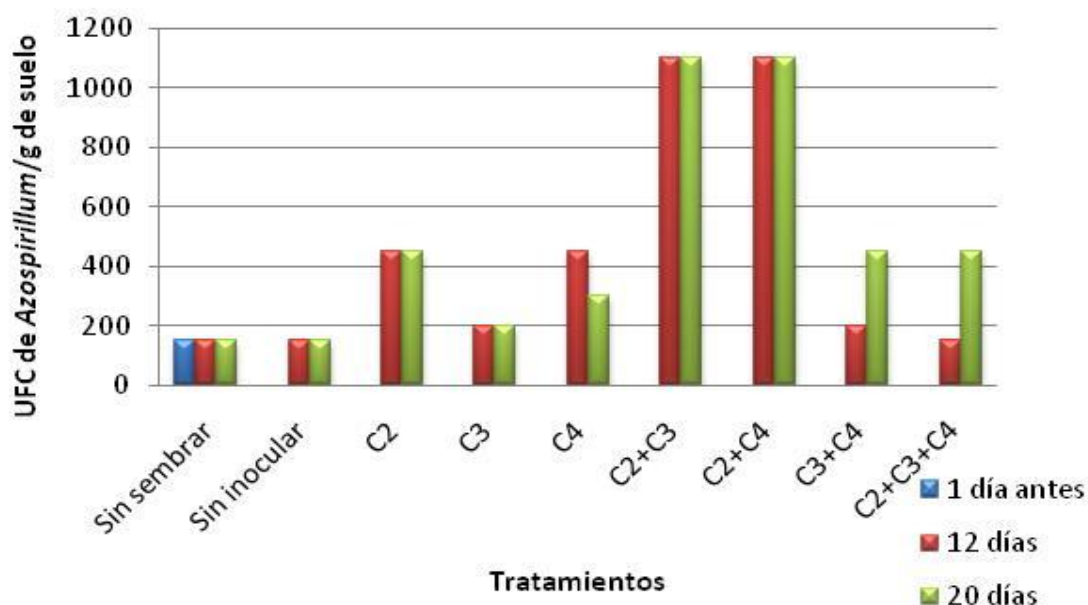


Figura 21. Densidad poblacional de cepas (C₂, C₃ y C₄) de *Azospirillum* spp. en suelo rizosférico de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino en condiciones semi-controladas.

Como se puede observar en la figura, en el suelo empleado para el presente experimento la densidad poblacional de *Azospirillum* spp. no alcanza las 200

UFC/g de suelo. Estos valores no varían con el transcurso de 12 y 20 días al igual que para la rizosfera de las plantas que no se inocularon con las cepas (C_2 , C_3 y C_4) de *Azospirillum* spp. objeto de estudio. Lo que sugiere que las cepas nativas del suelo empleado no incrementan su densidad poblacional al sembrar semillas de maíz, por lo menos en los primeros 20 días de crecimiento de las plantas.

La rizosfera de las plantas inoculadas presentó más de 200 UFC/g de suelo en la mayoría de los tratamientos empleados. En las plantas de maíz inoculadas con la cepa C_2 y C_4 se encontró una densidad poblacional de *Azospirillum* pp. dos veces mayor que la encontrada en las plantas sin inocular. Estos resultados sugieren que la colonización de las raíces de estas plantas por parte de las cepas antes mencionadas fue efectiva. Sin embargo, la inoculación de las plantas de maíz con la cepa C_3 no mostró valores de densidad poblacional de estas bacterias, superiores a las plantas sin inocular. Lo que pudo estar dado a que no fue efectiva la colonización de las raíces de las plantas de maíz inoculadas con esta última cepa de *Azospirillum*.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la mayoría de las variables morfológicas evaluadas para las plantas. Sin embargo, se observó un porcentaje de emergencia de las plántulas de maíz inoculadas con esta cepa significativamente superior al del control sin inocular y una marcada tendencia al aumento de la altura de estas plantas. Estos resultados sugieren que aunque no se detectaron diferencias en la densidad poblacional de *Azospirillum* en la rizosfera de estas plantas es probable que haya ocurrido una colonización de las raíces pero a nivel intercelular (Caballero, 1998; Caballero, 2001). Lo que se justifica porque el método empleado en la presente investigación para la determinación de la densidad poblacional se basa en el lavado del suelo rizosférico y no en la maceración de las raíces.

Se debe resaltar que en el caso de las combinaciones de C_3+C_4 y $C_2+C_3+C_4$ a los 20 días de la siembra de las semillas de maíz la densidad poblacional de *Azospirillum* duplicó la existente a los 12 días después de la siembra. Resultados que pueden explicarse sobre la base de que al aumentar el

crecimiento de las plantas y con ello el avance en la madurez de las mismas, la cantidad de exudados radicales debe haber aumentado. Eory (1995), plantea que las poblaciones de *Azospirillum* son de orden de 10^6 bacterias/g de suelo las poblaciones de esta bacteria adheridas a la rizosfera de plantas de maíz fue de 10^5 bacterias/g de raíz. Al medir la capacidad de invadir los tejidos internos de estas plantas encontraron, a lo largo del ciclo de desarrollo del maíz, concentraciones bacterianas de 10^3 durante el período de crecimiento de la planta y del orden 10^2 al final del ciclo del maíz.

Es probable que el aumento de la edad de la planta y de los exudados radicales se haya estimulado el crecimiento de *Azospirillum* y la colonización de las raíces por este último.

La rizosfera de las plantas de maíz inoculadas con las combinaciones de C_2+C_3 y C_2+C_4 mostraron una densidad poblacional de *Azospirillum* cinco veces mayor que la de las plantas no inoculadas, siendo estos los mayores valores obtenidos. Lo cual sugiere que las combinaciones antes mencionadas aseguran una buena colonización de las raíces de plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino. Resultados que corroboran los obtenidos para la evaluación de la altura, peso húmedo, peso seco de las plantas inoculadas, y también para el promedio de todas las variables morfológicas evaluadas con la combinación de C_2+C_3 , dado que existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas no inoculadas.

A pesar de encontrarse una alta densidad poblacional de *Azospirillum* en la rizosfera de las plantas inoculadas con la combinación de C_2+C_4 , no se encontraron efectos significativamente superiores a las plantas no inoculadas, para ninguna de las variables morfológicas evaluadas. Sin embargo, al determinar el promedio de todas las variables morfológicas evaluadas para las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre esta combinación de cepas y el control no inoculado. Para la selección de la mejor cepa o combinación de cepas, no es suficiente la evaluación del efecto de las mismas sobre una o varias variables

morfológicas de las plantas. En este sentido, es recomendable realizar un análisis más global.

En resumen, la cepa C₂ induce una mayor altura y porcentaje de peso seco de plantas de maíz, al igual que la cepa C₃, un mayor porcentaje de emergencia con respecto al control no inoculado. La cepa C₄ estimula el crecimiento de las plantas de maíz, medido como altura y peso seco de la planta y peso seco de las raíces. Las combinaciones C₃+C₄ y C₂+C₃+C₄ aumentan la altura de las plantas de maíz con respecto al control no inoculado y además inducen la formación de un mayor número de hojas/plantas. Adicionalmente esta última combinación de cepas de *Azospirillum* mostró influir en que las plantas inoculadas presentaran un mayor peso seco con respecto a las plantas controles.

Sin embargo, se seleccionan las combinaciones de C₂+C₃ y C₂+C₄ para la futura producción de un biofertilizante capaz de mitigar los daños causados por la salinidad en plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino. Esta selección se basa en que dichas combinaciones de cepas de *Azospirillum* mostraron mejores efectos en las características morfológicas generales de las plantas de maíz.

V. CONCLUSIONES

1. Las plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo son tolerantes a la salinidad hasta una conductividad eléctrica de 4 dS/m.
2. Las tres cepas de *Azospirillum* spp. presentan células en forma ovoide, refringentes y con paredes gruesas. La cepa C₂ muestra colonias planas y brillantes de gran tamaño, con forma circular y bordes enteros. La C₃ presenta colonias brillantes con forma circular y bordes irregulares. La C₄ crece en medio sólido como colonias filamentosas con bordes lobulados.
3. Las tres cepas de *Azospirillum* spp. se desarrollan a temperaturas entre 18-48 °C y crecen bien a pH entre 7-9. Las cepas C₂ y C₃ muestran un buen crecimiento hasta 3.5 % (m/v) de cloruro de sodio, mientras que la cepa C₄ mostró ser menos tolerante a la salinidad al disminuir bruscamente el crecimiento a partir de 2.5 % (m/v).
4. Las combinaciones C₂+C₃ y C₄ aumentaron en un 50 % el promedio de las variables morfológicas de las plantas de maíz.
5. Se seleccionan las combinaciones de cepas C₂+C₃ y C₄ como promisorias para la futura producción de un biofertilizante capaz de mitigar los daños causados por la salinidad en plantas de *Zea mays*, L. var. Tayuyo cultivadas en suelo ligeramente salino.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

1. Caracterizar molecularmente las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp.
2. Evaluar el efecto de la adición de las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en la tolerancia a la salinidad de plantas de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo) en condiciones semi-controladas empleando más de un tipo de suelo y otras variedades de maíz.
3. Evaluar el efecto de la adición de las cepas C₂, C₃ y C₄ de *Azospirillum* spp. y sus combinaciones en la tolerancia a la salinidad de plantas de maíz (*Zea mays*, L. var. Tayuyo) en condiciones de campo, empleando más de un tipo de suelo y otras variedades de maíz.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ❖ **Abebe, T.;Guenzi, AC.; Martin, B.; Cushman, JC. (2003).** Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol*131: 1748–55.
- ❖ **Acevedo, E. (2003).** Resistense to abiotic stresses. Producción y Protección vegetal, 12 (1,2 y 3): 133.145.
- ❖ **Alfaro, Y. (2006).** Estrategias de mejoramiento genético en maíz (*Zea mays* L.) para tolerancia al estrés por sequía. Fonaiap – Ceniap - IIA. Maracay. Venezuela.
- ❖ **Allen, G.Wyn-Jones R y Leigh,R. (1995).** Sodium transport measured in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes with different K⁺/Na⁺ discrimination traits. *Plant Cell Environ* 18: 105-115.
- ❖ **Apel, K. y Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*55: 373-99.
- ❖ **Barassi CA,;Ayrault G, Creus, CM.; Sueldo, RJ. y Sobrero, MT. (2006).** Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *ScientiaHorticulturae*109: 8–14.
- ❖ **Barassi. CA,; Sueldo, RJ.; Creus, CM.;Carrozzi. L, Casanovas EM y Pereyra MA (2008).** Potencialidad de *Azospirillum* optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. International Workshop in *Azospirillum*: cell physiology, plant response and agronomic research in Argentine. (Cassán F, García Salamonel, eds.), SMAyA, AAM, ISBN: 978-987-98475-8-9, Cap 3, p. 49-58.
- ❖ **Barea, M. (2002).** Fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético in vitro por bacterias diazotrófica sendofíticas. *Pesq Agropec Brasíla* 42: 1459-1465.
- ❖ **Bashan, Y. y De-Bashan, L.E. (2002).**Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringa*epv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 2637-2643.

-
- ❖ **Bashan, Y.;Holguin, G. y De-Bashan, L.E. (2004).***Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577.
 - ❖ **Bottini, R.;Fulchieri, M.;Pearse, D. y Pharis, R. (1989).** Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90: 45-47.
 - ❖ **Burdman, s.; y. Okon and e. Jurkevitch. (2000)** Surface Characteristics of *Azospirillum brasilense* in Relation to Cell Aggregation and Attachment to Plant Roots. *Critical Reviews in Microbiology* 26 (2): 91-110
 - ❖ **Eory,J.,Momo,F.R. &Alvares,M.(1995).**Growth and survival of *Azospirillum* in roots and maize rhizospheres with different leves of acidity. *Rev. Argent.Microbiol.* 27:99-105
 - ❖ **Caballero, J. (1998).** El género *Azospirillum* (en línea). Cuernavaca, MX, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Consultado 22 de Enero del 2009. Disponible <http://bibliooweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap10>
 - ❖ **Caballero, J. (2001).** Estudio de la distribución y la diversidad genética de algunas especies de diazótrofos. México DF, MX. snt. p. 2
 - ❖ **Carcaño-Montiel, M.;Ferrera-Cerrato, R.; Pérez-Moreno, J.; Molina-Galán, J. y Bashan, Y. (2006).** Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *TERRA Latinoamericana* 24 (4): 493-502.
 - ❖ **Caviedes, M., Yáñez, C., Silva, E., Dobronsky, J., Zambrabo, L., Caicedo, M., Heredia, J., (2002).** Nueva Variedad de Maíz Blanco Harinoso INIAP-101. Boletín divulgativo No. 82. Programa de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador. 8p
 - ❖ **Cervantes, S. T; m. A. Oropeza R; y D. Reyes, I. (2002).** Selección para rendimiento y heterosis de líneas endogámicas de maíz irradiado. *Agro ciencia* 36(4):421-431.

-
- ❖ **CIMMYT. (2007).** Maíz tolerante a factores adversos. Centro Internacional de mejoramiento de maíz y trigo. <http://www.cimmyt.org>. Consulta 30 de junio del 2007.
 - ❖ **Cocking EC (2003).** Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252: 169-175.
 - ❖ **ol, A. (2010).** Evaluación del biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de Maíz (*Zea mays* L.), en complemento con tres tipos de fertilización. Tesis Universidad Estatal de Bolívar p. 104
 - ❖ **Córdova, J. L. (1997).** Maíz: Mercado Mundial y Nacional. Monografías. Com. Consulta: 23 diciembre 2008.
 - ❖ **Cornide, M, T. (2002).** Genética vegetal. En: Cuba. Amanecer el Tercer Milenio. Ciencia, Sociedad y Tecnología (Editor. Fidel castro Díaz-Balard). p. 93-105. Editorial Debate.
 - ❖ **Cramer, G. (1992).** Kinetics of maize leaf elongation. II : Responses of a Na-excluding cultivar and a Na-including cultivar to varying Na/Ca salinities. *Journal of Experimental Botany* 43 (251): 857-864 (1 p.).
 - ❖ **Cramer, GR. (2002).** Response of abscisic acid mutants of *Arabidopsis* to salinity. *Funct Plant Biol* 29: 561-67.
 - ❖ **Cronquist, A. (1988).** The Evolution and classification of flowering plants. The New York bot. Gard. 12thed. New York, US. p. 555.
 - ❖ **Cura, José y otros. (2002).** Utilidad de las bacterias Promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas del desarrollo. Depto. Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
 - ❖ **Da Silva, R.; Fernández López, N.; Munt de Morales, D. de Almeida Pereira, A. y Loureiro, D. (2007).** Physiological quality of barley seeds submitted to saline stress. *Revista Brasileira de Sementes* 29 (1): 40-44.
 - ❖ **Poljakoff-Mayber, A., and Lerner H.R., (1998).** Plants in saline environments. In: Handbook of plant and crop stress. Second edition. Edited by Pessarakli M. Ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. E.U.A. 125 – 148 p.

-
- ❖ **Davies, WJ.; Kudoyarova,G. y Hartung, W. (2005).**Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J Plant Growth Regul* 24: 285-95.
 - ❖ **Araujo,S. (2006).** Salinity tolerance of halophyte *Atriplexnummularia*L. grown under increasing NaCl levels. *Rev Bras EngAgríc Ambient* 10 (4): 848-854.
 - ❖ **Del Amor, F.; Martínez, V. y Cerda, A. (2001).** Salt tolerance of tomato plants as affected by stage of plant development. *Hort Science* 36 (7): 1260-1263.
 - ❖ **Dobereiner, J.; Marriel, I.E., Nery, L. (1976).** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Microbiology* 22 (10): 1464, 1473
 - ❖ **Dobronski. J.; Silva. E; Vásquez. J. (1999).** Control del gusano de la mazorca de maíz mediante el uso de aceite vegetal. Plegable Divulgativo No. 166. INIAP-COSUDE. Quito- Ecuador.
 - ❖ **Dodd, G .& Donovan, L. (1999).**Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. *American Journal of Botany* 86 (8): 1146-1153.
 - ❖ **Dudley, L.M. (1994).** Salinity in the soil environment. In M. Pessarakli (Ed) *Handbook of plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, Inc. New York. 13-30.
 - ❖ **Espinoza, L. (2004).**Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp., asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Licenciatura .Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias y Letras de la Educación Escuela de Biología. Quito-Ecuador. 64 p.
 - ❖ **Faggioli, V.; Cazorla, C.; Vigna, A.; Berti, M. (2006).**Fertilizantes Biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* *Pseudomonas fluorescens*. INTA Estación Experimental Agropecuaria Marco Juárez.
 - ❖ **Falconi, E. (2010).** Área agropecuaria y de recursos Naturales Renovables Universidad Nacional de Loja. Disponible en: <http://agricola-unl.com/pdf/3.pdf>

-
- ❖ **Falleri, E. (1994).** Effect of water stress on germination in six provenances of *Pinuspinaster* Ait. *Seed Science and Technology* 22 (3): 591-599.

 - ❖ **Fanti, S.; y Pérez, S. (2004).**Proceso germinativo de semillas de panceiras sob stresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39 (9): 903-909.

 - ❖ **FAO. (2008).**FAO Land and Plant Nutrition Management Service. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. Consulta: 2-5-2011.

 - ❖ **Fischer, R.A. (2001).** Selection traits for improving yield potential. 148-159. In Reynolds, M.P., Ortiz- Monasterio, J.I., and Mc. Nab A. (eds). Application of physiology in wheat breeding. México, D.F., CIMMYT. 240p.

 - ❖ **Flowers, T.J.;Hajibagheri, MA. y Clipson, NJW. (1986).** Halophytes. *Q Rev Bio* 161: 313-3m7.

 - ❖ **Flowers, T.J & YEO, A.R. (1986).** Ion Relations of plants under drought an salinity. In: Austrian Journal of Scientific Research. Melbourne, 75-91p.

 - ❖ **Frahm,M.A.,Rosas,J.C.,Mayer-Pérez,N. & López-Salinas,E. (2004).** Breeding bean's for resistance to terminal drought in the lowland tropics. *Euphytica*, 136(2) 223-232.

 - ❖ **French, E. Y Hebert, T. (1980).** Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA, p.142-167.

 - ❖ **Fricke, W. (2004).** Rapid and tissue-specific accumulation of solutes in the growth zone of barley leaves in response to salinity. *Planta* 219: 515-25.

 - ❖ **Fricke, W. y Peters, WS. (2002).**The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol*129: 374-88.

 - ❖ **Fulchieri, M. y Frioni, L. (1994).** *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Efect on yield in a field experiment in Central Argentina. *Soil Biol Biochem* 26: 921-923.

 - ❖ **García, F. Muñoz, H.;Carreño,C. y Mendoza, G. (2010).** Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 1: 107-116.

-
- ❖ **Girard, H., Rougiex, R. (1964).** Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza – España. p. 244, p.27.
 - ❖ **Gómez- Cadena, A. (2001).** Alteraciones en la fisiología de los cítricos inducidas por salinidad. Levante Agrícola, vol. 356, p.187-193.
 - ❖ **González, H. Justin, M.;Jordan, W. y Drew, M.(1997).**Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology* 113: 881-893.
 - ❖ **González, L. M. & Ramírez, R. (1999).** Respiración, relaciones Hídricas y con contracción de pigmentos en las plántulas de arroz cultivadas en condiciones salinas. Cultivos Tropicales, 20(1): 35-37.
 - ❖ **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.
 - ❖ **Goykovic, V. y Saavedra, G. (2007).** Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA* 25 (3): 47-58.
 - ❖ **Hu, Y. y Schimdhalter, U. (2005).** Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J Plant NutrSoil Sci* 168: 541-549.
 - ❖ **Ibáñez, J. (2008).** Degradación de Suelos, Salinización y Acidificación. 65p.
 - ❖ **INEC, 2009.** Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC. (En línea). Quito, Ecuador. Consultado 16 de Abril de 2009. Disponible en www.ecuadorencifras.com/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html
 - ❖ **INIAP, (2007).** Manejo de Nutrientes por Sitio Especifico con Labranza de Conservación en el Cultivo de Maíz. Departamento de Suelos y Agua. Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador. p. 10-30.
 - ❖ **Isla & Royo. A. (2001).** Interspecific difference sin salt- stress tolerance in wheat. *JapaneseJournal of Crop Science.* 45, (1). 78-83.
 - ❖ **James, RA.;Munns, R. von Caemmerer, S.; Trejo, C.; Miller, C. y**

-
- Condon, AG. (2006).** Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in salt-affected barley and durum wheat. *Plant Cell Environ* 29: 2185-97.
- ❖ **Jamil, M.et al. (2007).** Salt stress inhibits germination and early seedling growth in cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (6): 910-914.
 - ❖ **Jamil, M. y Rha, E.S. (2004).**The effect of salinity (NaCl) on the germination and seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea*L.). *Korean J Plant Res* 7: 226-232.
 - ❖ **Jurinak, J. J. &Wagenet, R.J. (1981).** Fertilization and salinity. In D. Yaron (Ed) salinity in irrigation and water resources. Marcel Dekker Inc. New York.
 - ❖ **kobata, T., Palta, J. & Turner, N. (1992).** Rate of development of post anthesis water deficit and grain filling of spring wheat. *Crop science* 32:1238 – 1242.
 - ❖ **Kumar, D. &Yadav, K.L. (1983).** Salt tolerance of some induced mutants of DH 1553 wheat. *Indian Journal of agricultural science*, 1983, 51, (7): 75-83.
 - ❖ **Layne-Garsaball JA, Méndez-Natera J y Mayz-Figueroa, J. (2008).** Efecto de la salinidad y del tamaño de la semilla sobre la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 11 (1): 17-25.
 - ❖ **Logan, BA. (2005).** Reactive oxygen species and photosynthesis. In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, ed. N Smirnoff, Oxford: Blackwell. p. 250-67.
 - ❖ **López, R. (2001).** Selección y evaluación de combinaciones risobio-leguminosa pratenses en suelos afectados por salinidad. Tesis de grado en opción al título de Doctor en Ciencias, Universidad de Granma.
 - ❖ **Mahdavi, B. y Modarres, S. (2007).** Germination and seedling growth in grasspea (*Lathyrus sativus*) cultivars under salinity conditions. *Pakistan*

Journal of Biological Sciences 10 (2): 273-279.

- ❖ **Marín, E. (1994).** Influencia de la salinidad sobre la absorción del agua por las semillas de arroz. *Centro Agrícola*, 2:40-45.
- ❖ **Mario, C. (2002).** Plegable divulgativo N°82 segunda edición variedad de maíz blanco precoz.
- ❖ **Maroto, J. (1998).** Horticultura Herbácea especial. Cuarta edición. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. p. 589-593.
- ❖ **Márquez, S. J. (2008).** De las variedades criollas de maíz (*zeamays* L.) a los híbridos transgénicos. I: Recolección de germoplasma y variedades mejoradas. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. Vol 5 No 2. México.
- ❖ **Martínez, A. (1999).** Efecto de la temperatura y del contenido de agua del suelo en la germinación y crecimiento inicial en dos cultivares de maíz (*Zea mays* L.) con diferentes contenidos de humedad inicial en las semillas. Trabajo de grado presentado para obtener el Título de M. Sc. en Agricultura Tropical Mención Producción Vegetal. Postgrado en Agricultura Tropical. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Venezuela.
- ❖ **Martínez, R., López, M., Dibut, B., Parra, C. y Rodríguez, J. (2005).** La fijación biológica de nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Gobierno Bolivariano de Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura
- ❖ **Martínez, R., Toledo, N., Arguelles, C. (1999).** Introducción al conocimiento de los biofertilizantes. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, México. 43p.
- ❖ **Mass, E. (1986).** Salt tolerance of plants. *Applied agricultural research* 1(1):12-15.
- ❖ **Mass, E., Lesh, S., Francois, L. y Grieve, C. (1994).** Tiller development in salt stressed wheat. *Crop Sci* 34:1594-1603.
- ❖ **Milano, E. (2007).** Qué son los Biofertilizantes y cómo nos pueden beneficiar. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. Publicación gratuita. Gobierno Bolivariano de Venezuela. p. 4 - 10.

-
- ❖ **Mitchell, J.P., Shennen, C., Gratten, S.R. & May, D.M. (1991).** Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(2):215-16.
 - ❖ **Molina, S. (2006).** Desarrollo de un biofertilizante a partir de cepas de *Azospirillum* spp. para el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) variedad INIAP-102 con dos fertilizaciones inorgánicas y dos fertilizaciones orgánicas. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ciencias Agrícolas, Ambientales y Veterinarias, Ingeniería Agronómica. 96 p.
 - ❖ **Morales D, Rodríguez P, Dell'Amico, Sánchez-Blanco M y Torrecillas A (2003).** Efecto de la salinidad en la conductividad hidráulica de las raíces y las relaciones hídricas en las hojas de dos especies de tomate (*L. esculentum* y *L. chesmainii*). *Cultivos Tropicales* 24 (1): 41-45.
 - ❖ **Mortimer, P., Stolp, H., Truper, H., Balows, A., Schlegel, H. (1981).** The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. New York, US. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1, p.796 - 808.
 - ❖ **Munns R y Tester M (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–81.
 - ❖ **Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AG, Lindsay MP et al. (2002).** Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection trials. *Plant and Soil* 247 (1): 93-105.
 - ❖ **Murillo, A. (2001).** Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *PHYTON, International Journal of Experimental Botany*, 67:71-84.
 - ❖ **Muthukumarasamy, R.; Rebathi, G.; Vadivelu, M. (2000).** Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red rot of sugar cane. *Curr. sci.* 78:1063-1065
 - ❖ **Nautiyal C, Raghavan G, Meeta L y Palpu P (2008).** Novel Mechanism of Modulating Natural Antioxidants in Functional Foods: Involvement of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *J. Agric. Food Chem* 56 (12): 4474-4481

-
- ❖ **Noroña, J. (2008).** Caracterización y evaluación agromorfológica de 64 accesiones de maíz negro y 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) colectados en la serranía del Ecuador. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ciencias Agrícolas, Ambientales y Veterinarias, Ingeniería Agronómica. P. 32-34.
 - ❖ **Novo, R. (2002).** Memorias curso internacional de microbiología de suelos, los biofertilizantes y la biofertilización. Quito, EC. ASOINCO. 1 disquete Hd. 3 ½ pulgadas.
 - ❖ **Novo, R. (1983).** Microbiología Agrícola, Ejercicios Prácticos. ISCAH, p. 50-73, 86-88, 96-100.
 - ❖ **Okon, Y. y Kapulnik, Y. (1986).** Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16.
 - ❖ **Okon, Y. y Labandera-González, CA. (1994).** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil BiolBiochem* 26: 1591-1601.
 - ❖ **Passioura, JB. y Munns, R. (2000).** Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J Plant Physiol* 27: 941-48.
 - ❖ **Paterniani, E. (2000).** Evolución del maíz. In: Fontana, N, H.; González, N. C. El maíz en Venezuela. Fundación Polar. Caracas. 530 p.
 - ❖ **Pazos, V. y Casadesús, L. (1990).** Métodos básicos de Microbiología. Universidad de la Habana, p.27-30, 33-39, 65-72.
 - ❖ **Permuy, N. (2005).** Guía técnica para la producción del cultivo del maíz. Cuba Literaria. <http://www.cubaliteraria.com>. Consulta: marzo 21 del 2008.
 - ❖ **Porta C, López-Acevedo R y Roquero, De L. (1999).** Edafología. *Mundi-Prensa*, Madrid, p.454; 657-705.
 - ❖ **Radical, Silvia (2007).** *In Vitro* morfogénesis. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.

-
- ❖ **Ramos, P (2007).** Litigios por los subsidios agrícolas. El economista de Cuba. Edición Online. <http://www.eleconomista.cubaweb.cu/>. Consulta: septiembre 12 del 2008.
 - ❖ **Rhoades, A. & J,Loveday. (2004).** Potential problems of salinity on the hearth in the next five. SIG. Journal of Faculty of Agriculture. 42 (3-4) p. 273-280
 - ❖ **Rodríguez, E., Cáceres, A. (1982).** Improved médium for isolation of *Azospirillum* spp., Applieta Microbiology and Environmental. 44(2): 940 - 991.
 - ❖ **Rodríguez, E.Diciocco y Pacheco, J.C. (1996).** Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia del Suelo* 14: 110-112.
 - ❖ **Rodríguez, S.; J, Suárez, R.; Caballero, M.J. y Iturriaga, G. (2009).** Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEMS Microbiol. Lett.
 - ❖ **Romero,A.R.; Soria, T. y Cuartero, J. (2001).** Tomato plant-water uptake and plant-water raltionships under saline growth conditions. *PlantScience* 160: 265-272.
 - ❖ **Saura, G.; Fernández, R.; Hidalgo, J. (2003).** Fijador de Nitrógeno, *Azospirillum* spp. Edit. FIAGRO (Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria), El Salvador. p.1-2.
 - ❖ **Scott, S.J.; R.A& Williams. (1984).** Review of data analysis. Methods for seed germination. *Crop science*, 24: 1192-1199.
 - ❖ **Silva, C. A. (2005).** Maíz genéticamente modificado. AGRO-BIO. Colombia. 17p
 - ❖ **Silva, E., Caviedes, M., Dobronsky, J., Zambrabo, L., Caicedo, M., Heredia, J., (1997).** Variedad de Maíz Blanco Precoz INIAP-101. Boletín divulgativo No. 292. Programa de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador.

-
- ❖ **Singh, K.P. & Singh, K. (1981).** Stress physiological studies on seed germination and seedling growth of some wheat hybrids. *Indian Journal of plant Physiology*, 25, p. 180-186.
 - ❖ **Socorro, M. A. & Martín, D.S. (1998).** Granos. Editorial Instituto Politécnico Nacional. México. 318p.
 - ❖ **Spyropoulos, C.G. & Maurommatis, M.(1998).** Effect of water stress on pigment formulation in quercus species. *J. Experimental Botany*, 29:273-477.
 - ❖ **Steenhoudt, O. y J. Vanderleyden. (2000).** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev* 24: 487-506.
 - ❖ **Subbarao, G.V. (1990).** Strategies and scope for improving salinity tolerance in crop plants. In: *Handbook of plant and crop stress*. Second edition, edited by Pessaraki M. Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York E.U.A. 1069-1087.
 - ❖ **Szablocs, I. (1994).** Soils and Salinization. In M. Pessaraki (Ed.) *Handbook of plant and crop Stress*. Marcel Dekker, Inc. New York. 3-11
 - ❖ **Terranova. (1995).** Producción Agrícola 1. Bogotá, Colombia. Terranova editor. Tomo 1. pp. 110 a 112.
 - ❖ **Tracy, FE.; Gilliam, M. Dodd, AN.; Webb, AAR. y Tester, M. (2008).** Cytosolic free Ca^{2+} in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environl.* In press.
 - ❖ **Vallejo, F.A y Maylén, E. (2002).** El Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira., 402p.
 - ❖ **VandeBroek, A, Dobbelaere, S. y Van Dommelen, A. (2000).** *Azospirillum* plant interactions: signaling and metabolic interactions. p. 671-777.
 - ❖ **Vicentini, A. (2007).** Fijación de nitrógeno y producción de ácido indolacético *in vitro* por bacterias diazotróficas endofíticas. *Pesq Agropec Brasíli* 42: 1459-1465.
 - ❖ **Wong, R. (2002).** Efecto de cinco potenciales osmóticos creados con NaCl y sacarosa comercial sobre la germinación de las semillas y desarrollo

inicial de las plántulas de tres híbridos de maíz (*Zea mays* L.). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente, Monagas.

- ❖ **Wyn, Jones & J, Gorham. (1983).** Physiological effects of salinity: scope for genetic improvement 177-201 In: Improvement and management of winter cereals under temperature, drought and salinity stresses. Proceeding of the International Symposium October 1983. Cordoba, Spain.
- ❖ **Yáñez, C. (2007).** Manual de Producción de Maíz para Pequeños Agricultores y Agricultoras. Programa de Maíz. INIAP. Ecuador.
- ❖ **Yáñez, C.; Zambrano, J.; Caicedo, M.; Sánchez, H.; Heredia, J. (2004).** Informe final del Proyecto IQ-CV-102. Identificación y desarrollo de un biofertilizante para el cultivo de maíz en la sierra del Ecuador. INIAP. Ecuador. p. 41 - 49.
- ❖ **Yáñez, C.; Zambrano, J.; Caicedo, M.; Sánchez, A.; Heredia, J. (2003).** Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos. Programa de Maíz. INIAP. Ecuador. p. 1-28
- ❖ **Yeo, A.R. (1983).** Mechanism involved in salt tolerance of plants. In: Handbook of plant and crop stress. Second edition. Edited by Pessaraki M. Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. E.U.A. 97-123p.
- ❖ **Yuen, G.; LUO, Y. Sun, X & Tang, D. (2004).** Evaluation of crop water stress index for detecting water stress in water wheat in the North China plain. *Agricultural Water Management*, 64(1): 29-40.
- ❖ **Zhu, J-K. (2002).** Salt and drought signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-73.

ANEXO 1

Mecanismos de tolerancia a la salinidad, organizados por procesos que ocurren en las plantas y su relevancia en los tres componentes de la tolerancia a la salinidad.

Process involved	Candidate genes ^a	Osmotic stress	Ionic stress	
		Osmotic tolerance	Na ⁺ exclusion	Tissue tolerance
Sensing and signaling in roots	<i>SOS3, SmRKs</i>	Modification of long-distance signaling	Control of net ion transport to shoot	Control of vacuolar loading
Shoot growth	?	Decreased inhibition of cell expansion and lateral bud development	Not applicable ^b	Delay in premature senescence of old (carbon source) leaves
Photosynthesis	<i>ERA1, PP2C, AAPK, PKS3</i>	Decreased stomatal closure	Avoidance of ion toxicity in chloroplasts	Delay in ion toxicity in chloroplasts
Accumulation of Na ⁺ in shoots	<i>HKT, SOS1</i>	Increased osmotic adjustment	Reduced long distance transport of Na ⁺	Reduced energy spent on Na ⁺ exclusion
Accumulation of Na ⁺ in vacuoles	<i>NHX, AVP</i>	Increased osmotic adjustment	Increased sequestration of Na ⁺ into root vacuoles	Increased sequestration of Na ⁺ into leaf vacuoles
Accumulation of organic solutes	<i>P5CS, OTS, MT1D, M6PR, S6PDH, IMT1</i>	Increased osmotic adjustment	Alteration of transport processes to reduce Na ⁺ accumulation	Accumulation of high concentrations of compatible solutes in cytoplasm

^aThis list is not comprehensive, please see reviews such as Bartels & Sunkar (8), Munns (89), and Zhu (145), as well as the Clickable Guard Cell available at <http://www-biology.ucsd.edu/labs/schroeder/clickablegc.html>

^bIons do not accumulate to toxic levels in growing tissues.

ANEXO 2

*Clases de suelos según el United States Salinity Laboratory de Riverside.
Citado por Ibáñez, 2010.*

Clases de Suelos				
Parámetros	Salino	Normal	Sódico	Salino-Sódico
Ph	< 8.5	< 8.5	> 8.5	> 8.5
C.E. (dS/m)	> 4	< 4	< 4	> 4
P.S.I. (%)	< 15	< 15	>15	>15
P.S.I. porcentaje de Na ⁺ intercambiable				

ANEXO 4

Medio de cultivo Agar Ácido Succínico Rojo Congo

Composición: Se empleó la composición del medio de cultivo Agar Ácido Málico Rojo Congo según Rodríguez y Cáceres (1982), pero sustituyendo el ácido málico (ácido hidroxisuccínico) por ácido succínico.

Reactivos	Cantidad
Ácido succínico	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.015 g
KOH	4.8 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Solución Rojo-Congo al 0.25 % (m/v)	15 ml
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	985 ml
pH	7.0 ± 0.2

ANEXO 5

Medio de cultivo Caldo Ácido Succínico

Composición: Se empleó la composición del medio de cultivo Agar Ácido Málico Rojo Congo según Rodríguez y Cáceres (1982), pero sustituyendo el ácido málico (ácido hidroxisuccínico) por ácido succínico y eliminando el ácido málico y el agar bacteriológico.

Reactivos	Cantidad
Ácido succínico	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.015 g
KOH	4.8 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

ANEXO 6

Tabla de Mc Crady: 3 tubos por dilución

Número Característico	Número de microbios	Número característico	Número de microbios	Número característico	Número de microbios
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.5
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

ANEXO 7

Medio Semi-sólido NFB (Nitrogen Fixation Biological) modificado

Composición: Se empleó la composición del medio de cultivo Semi-sólido NFB (*Nitrogen Fixation Biological*) según Rodríguez y Cáceres (1982), pero sustituyendo el ácido málico (ácido hidroxisuccínico) por ácido succínico.

Reactivos	Cantidad
Ácido succínico	5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄	0.01 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.01 g
Biotina	0.01 g
Azul de Bromotimol al 0.5 % (v/v) en KOH al 0.2 N	3 ml
Agar	1.75 g
Agua Destilada	997 ml
pH	7.0

ANEXO 8

Medio de Enriquecimiento para Azospirillum spp. según Döbereiner et al. (1976) modificado

Composición: Se empleó la composición del medio de cultivo según Döbereiner et al. (1976), pero sustituyendo el ácido málico (ácido hidroxisuccínico) por ácido succínico.

Reactivos	Cantidad
Ácido succínico	5.0 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002 g
MnSO ₄	0.01 g
FeCl ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.002 g
Azul de Bromotimol al 0.5 % (v/v) en KOH al 0.2 N	5 ml
Extracto de levadura	0.5 g
Agar	15 g
Agua Destilada	995 ml
Ph	6.8
