

Comunicación breve

Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en plantas de maíz (*Zea mays* L.)**Effect of inoculation with plant growth promoting bacteria in corn plants (*Zea mays* L.)**N.C. Lovaisa^{1*}; E.E. Guevara²; P.G.A. Delaporte-Quintana^{1,3}; J. Elías^{1,3}; J. Arroyo¹; S.M. Salazar^{1,4}¹ Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Avda. Kirchner 1900, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. *E-mail: nadiaclov@hotmail.com² Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Chacabuco 461, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.⁴ INTA EEA Famaillá. Ruta Prov. 301 Km 32, (4132), Famaillá. Tucumán, Argentina.**Resumen**

A pesar de que existen numerosos estudios de la interacción entre plantas de maíz (*Zea mays*) con *Azospirillum brasilense*, los reportes de la interacción con *Gluconacetobacter diazotrophicus* son escasos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento vegetal correspondientes a las especies bacterianas de *A. brasilense* REC3 y *G. diazotrophicus* PAL5 sobre el desarrollo de plantas de maíz. Se implementaron ensayos en los que los microorganismos fueron inoculados en forma individual y conjunta en plantas de la variedad Leales 25 de maíz, las cuales fueron sembradas en dos suelos con distintos grados de fertilidad. Las variables medidas en las plantas fueron los valores relativos de SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) y la longitud y superficie radicular. Los resultados obtenidos revelaron que *A. brasilense* REC3 y *G. diazotrophicus* PAL5 tuvieron efectos superiores a los tratamientos control y mezcla, y que sólo *A. brasilense* REC3 generó incrementos significativos en la biomasa en las plantas de maíz respecto a los demás tratamientos en ambos tipos de suelos.

Palabras clave: PGPB; *Azospirillum brasilense*; *Gluconacetobacter diazotrophicus*.**Abstract**

Although there are numerous studies of the interaction between corn plants (*Zea mays*) with *Azospirillum brasilense*, reports about the interaction with *Gluconacetobacter diazotrophicus* are scarce. The aim of this work was to evaluate the effect of inoculation with microorganisms that promote plant growth corresponding to the bacterial species of *A. brasilense* REC3 and *G. diazotrophicus* PAL5 on the development of maize plants. Trials were carried out in which the microorganisms were inoculated individually or in combination in corn plants of the variety Leales 25, which were sowed in two soils with different degrees of fertility. Variables measured in plants were relative values of Soil Plant Analysis Development (SPAD) and length and root surface. Results revealed that *A. brasilense* REC3 and *G. diazotrophicus* PAL5 had superior effects than the control. Only *A. brasilense* REC3 generated a significant increment in biomass of corn plants compared to other treatments in both types of soils.

Keywords: PGPB; *Azospirillum brasilense*; *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

El uso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, PGPB (por sus siglas en inglés, *Plant Growing Promoting Bacteria*) puede ser considerado como una alternativa para disminuir la aplicación de fertilizantes de síntesis química. Especies del género *Azospirillum* y *Gluconacetobacter* son capaces de promover el crecimiento y aumentar el rendimiento de numerosos cultivos de interés agrícola, entre ellos el de maíz (Mehnaz, 2015; Eskin *et al.*, 2014). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto promotor del crecimien-

to vegetal en plantas de maíz inoculadas con dos bacterias PGPB: *Azospirillum brasilense* REC3 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultivadas en suelos con distinta fertilidad. Esta diferencia nutricional en la composición de los suelos permitiría diferenciar el efecto de la inoculación, ya que, en general, el número, la diversidad y la actividad de los microorganismos están influenciados por las propiedades del suelo.

La cepa *A. brasilense* REC3 aislada de tejidos internos de raíces de frutilla, es capaz de fi-

jar N₂, producir sideróforos e indoles (Pedraza *et al.*, 2007). También se observó que REC3 puede promover el crecimiento, mejorar la nutrición mineral, incrementar el contenido de clorofila en las hojas y aumentar el rendimiento de frutos de diferentes cultivares de frutilla (Pedraza *et al.*, 2007; 2010; Salazar *et al.*, 2012; Guerrero-Molina *et al.*, 2014; Lovaisa *et al.*, 2015). Por su parte, *G. diazotrophicus* PAL5, aislada de caña de azúcar en Brasil (Cavalcante y Döbereiner, 1988), también es capaz de fijar N₂, producir indoles y sideróforos. Adicionalmente cuenta con la capacidad de solubilizar diferentes fuentes fosfatadas (Delaport-Quintana *et al.*, 2016; Maheshkumar *et al.*, 1999).

En el ensayo se utilizaron semillas de maíz de la variedad Leales 25, las cuales fueron desinfectadas por inmersión en una solución de bicloruro de mercurio al 0,01 % durante 5 minutos con agitación y posteriormente enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Las mismas fueron sembradas en macetas de tres litros, utilizando suelos con diferentes grados de fertilidad, esterilizados por tinalización. Se utilizó un suelo fértil no limitado en nutrientes: *Argiudol típico* obtenido de Finca El Manantial, Tucumán (26°47'S - 65°16'O) y un suelo limitado en nutrientes, el cual se obtuvo mezclando una parte del mismo suelo fértil con dos partes de arena. Los mismos fueron sometidos a un análisis físico-químico en el laboratorio de servicios analíticos PH7 Diagnóstico Agrícola. A los tres días de la emergencia se inocularon las plántulas por riego con 50 ml de una suspensión bacteriana (10⁶ UFC/ml) de *A. brasilense* REC3 y *G. diazotrophicus* PAL5, aplicadas individualmente, y 25 ml de cada una aplicadas de manera conjunta. Las plantas control fueron regadas con 50 ml de agua destilada estéril. Las cepas crecieron en los medios de cultivo líquidos NFB y LGI-P, respectivamente (Baldani *et al.*, 2014). Las suspensiones bacterianas fueron aplicadas de manera

individual y combinadas. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con 4 tratamientos en los 2 suelos utilizados: i) Plantas sin inocular (control), ii) Plantas inoculadas con REC3, iii) Plantas inoculadas con PAL5 y iv) Plantas inoculadas con mezcla de REC3 y PAL5. Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento. El ensayo se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura (30 °C), fotoperíodo (14:10 h L:O) y humedad (60 %) en un fitotrón. La duración del ensayo fue de 60 días. Durante ese período las plantas fueron regadas con agua destilada estéril cuando fue necesario y no se aplicó ningún tipo de fertilizante químico.

Durante el desarrollo del ensayo se evaluaron los valores relativos de SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) cada 15 días, utilizando un clorofilómetro SPAD Minolta 502. Al finalizar el mismo se determinaron la longitud radicular (LR) y la superficie radicular (SR), de acuerdo al método gravimétrico de Carley y Watson (1966). La producción de biomasa se determinó mediante la cuantificación de peso seco, colocando los tejidos de la parte aérea y radicular en estufa a 65 °C hasta obtener peso constante. Se calculó el Índice de Crecimiento (IC) mediante la fórmula IC = (Biomasa total-Biomasa Inicial)/Biomasa total.

Los datos obtenidos en los ensayos para ambos suelos se analizaron con el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016). Se consideraron a LR, SR e IC como variables dependientes de los tratamientos y tipo de suelo. Se utilizó análisis de varianza en función de los tratamientos inoculados y el tipo de suelo y test de Tukey para detectar diferencias entre medias de tratamientos. Se trabajó con un nivel de significancia del 5 %.

Las características físico-químicas de los suelos se muestran en la Tabla 1.

Los resultados presentados en las Tablas 2 y 3 muestran que a los 45 días posteriores a la inocu-

Tabla 1. Análisis fisicoquímico de los suelos utilizados.

Análisis físico-químico	Suelo fértil	Suelo limitado en nutrientes
pH	6,20	7,43
Conductividad Eléctrica (dS/m)	1,110	0,460
Materia Orgánica (%)	3,89	0,75
Nitratos (ppm)	682,80	66,24
Fósforo (ppm)	45,5	17
Azufre (ppm)	24,85	29,3
Textura	Franco limosa	Franco arenosa
Arcilla (%)	17,45	5,70
Limo (%)	60,75	12,50
Arena (%)	21,80	81,80
H ₂ O (actual)	31,1	4,4

Tabla 2. Valores de SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) (promedio \pm error estándar) de plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* (REC3), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) o mezcla de ambas (REC3+PAL5) medidas a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación (DDI) en suelo fértil.

Tratamiento	SPAD		
	15 DDI	30 DDI	45 DDI
Control	36,34 \pm 1,48 c	32,23 \pm 0,78 b	35,58 \pm 1,14 b
REC3	33,96 \pm 3,52 b	34,34 \pm 3,13 b	00,42 \pm 2,71 c
PAL5	23,11 \pm 1,70 a	27,59 \pm 1,65 a	30,69 \pm 0,72 a
Mezcla	029,9 \pm 1,34 b	30,86 \pm 3,51 ab	32,44 \pm 2,49 a

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).

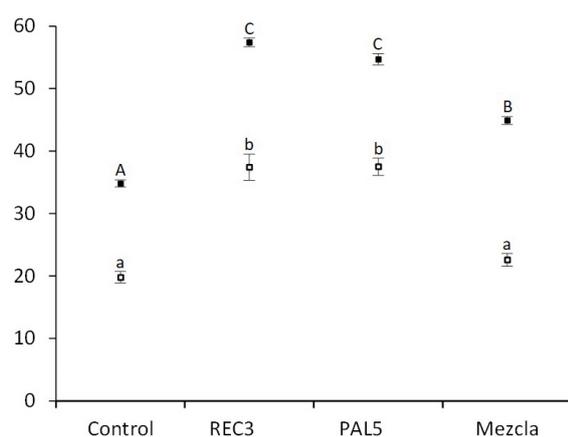
Tabla 3. Valores de SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) (promedio \pm error estándar) de plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* (REC3), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) o mezcla de ambas (REC3+PAL5) medidas a los 15, 30 y 45 días después de la inoculación (DDI) en suelo limitado en nutrientes.

Tratamiento	SPAD		
	15 DDI	30 DDI	45 DDI
Control	31,97 \pm 1,78 bc	32,3 \pm 1,51 bc	34,32 \pm 1,44 b
REC3	35,13 \pm 1,44 c	34,2 \pm 1,32 c	38,75 \pm 3,7 c
PAL5	29,25 \pm 2,47 ab	27,22 \pm 3,17 a	28,83 \pm 2,15 a
Mezcla	25,36 \pm 1,23 a	28,35 \pm 2,03 ab	28,78 \pm 0,59 a

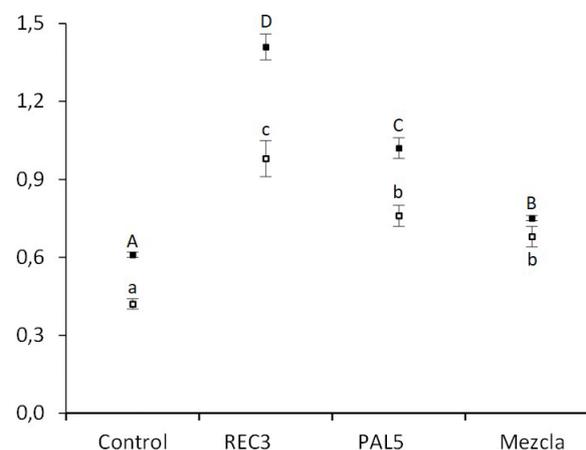
Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).

lación, las plantas inoculadas con REC3 tuvieron un incremento en el contenido de clorofila en las hojas en ambos tipos de suelo.

La longitud radicular se vio afectada por los tratamientos tanto para el suelo fértil, no limitado en nutrientes ($F = 47,29$; g.l. error = 36; $p < 0,0001$) como para el suelo limitado en nutrientes ($F = 210,23$; g.l. error = 36; $p < 0,0001$). Los valores máximos de longitud radicular se observaron en plantas inoculadas en forma individual con REC3 y PAL5 en ambos tipos de suelos (Figura 1).

**Figura 1.** Longitud radicular expresada en centímetros de las plantas de maíz inoculadas con los distintos tratamientos y el correspondiente control sin inocular en suelo fértil (puntos blancos) y en suelo limitado en nutrientes (puntos negros). Letras distintas (mayúsculas para suelo limitado en nutrientes y minúsculas para suelo fértil) indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).

La superficie radicular también se vio incrementada significativamente en las plantas inoculadas en el suelo fértil ($F = 28,23$; g.l. error = 35; $p < 0,0001$) y en el suelo limitado en nutrientes ($F = 122,54$; g.l. error = 36; $p < 0,0001$). En el suelo limitado en nutrientes los valores máximos se presentaron en el tratamiento con REC3 (Figura 2).

**Figura 2.** Superficie radicular expresada en gramos de nitrato de calcio de las plantas de maíz inoculadas con los distintos tratamientos y el correspondiente control sin inocular en suelo fértil (puntos blancos) y en suelo limitado en nutrientes (puntos negros). Letras distintas (mayúsculas en suelo limitado en nutrientes y minúsculas en suelo fértil) indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).

El índice de crecimiento también se vio afectado por el tratamiento tanto en suelo fértil ($F = 630,48$; g.l. error = 35; $p < 0,0001$) como en suelo limitado ($F = 443,24$; g.l. error = 36; $p < 0,0001$). Las

plantas que presentaron mayor crecimiento fueron las inoculadas con REC3 en el suelo limitado en nutrientes (Figura 3).

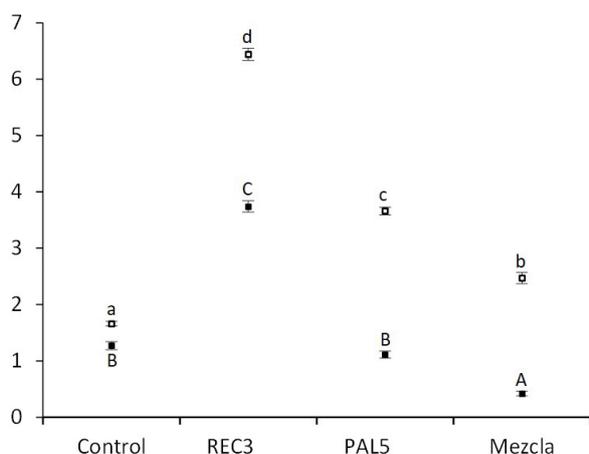


Figura 3. Índice de crecimiento de las plantas de maíz inoculadas con los distintos tratamientos y el correspondiente control sin inocular en suelo fértil (puntos blancos) y en suelo limitado en nutrientes (puntos negros). Letras distintas (mayúsculas en suelo limitado en nutrientes y minúsculas en suelo fértil) indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).

El contenido de clorofila medido en las hojas indica que el tratamiento de inoculación con REC3 permitió una mayor captación de nutrientes por parte de las plantas de maíz inoculadas con esta cepa. Resultados similares fueron observados en plantas de frutilla inoculadas con esta misma cepa (Lovaisa *et al.*, 2015). También fue informado que en plantas de maíz inoculadas con una mezcla de *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* se encontró un mayor contenido de clorofila en sus hojas (Kouchebagh *et al.*, 2012). Estos datos concuerdan con lo observado en este trabajo y el mayor índice de verdor en las hojas de maíz inoculadas con la cepa REC3 se correlacionan con los demás parámetros analizados para estudiar la acción benéfica de *A. brasilense* en la promoción del crecimiento vegetal.

La longitud radicular de las plantas de maíz fue mayor en los tratamientos inoculados con REC3 y PAL5 de forma individual, tanto en el suelo fértil como en el limitado en nutrientes. Biari *et al.* (2008) observaron el incremento en la longitud radicular en plantas de maíz en suelos empobrecidos empleando *A. brasilense* y *Azotobacter chroococcum* obteniendo un mayor contenido de N y P en las semillas, lo que afectó positivamente otras variables como la germinación temprana, el peso seco de raíces y brotes y una mayor altura de

la planta. Efectos similares fueron reportados por Ríos Rocafull *et al.* (2016) empleando una cepa de *G. diazotrophicus* (INIFAT Gd 42) aislada de mango e inoculada en remolacha y zanahoria que, no sólo estimuló el crecimiento radicular, sino también el de la parte aérea de las plantas.

En el presente trabajo la variable superficie radicular permitió observar el mayor efecto causado por la inoculación, siendo el tratamiento correspondiente a la inoculación con REC3 el que generó incrementos notables en el suelo limitado en nutrientes. Es importante mencionar en este contexto, que los demás tratamientos, PAL5 y Mezcla, también generaron incrementos superiores al control. Las plantas crecidas en el suelo limitado en nutrientes fueron las que evidenciaron la mejor respuesta al tratamiento con REC3 (78,86 % mayor al control). Resultados similares fueron reportados por Fulchieri y Frioni (1994) donde la inoculación con distintas cepas de *A. brasilense* produjo un desarrollo radicular comparativamente mayor con respecto al control sin inocular. En un estudio realizado por Herschkovitz *et al.* (2005) con dos cepas de *A. brasilense* inoculadas en maíz en suelos limitados en nutrientes, se observó una mayor producción de raíces como así también una mayor densidad radicular.

Okon y Vanderleyden (1997) infieren que luego de la inoculación, *A. brasilense* modifica indirectamente el ambiente rizosférico a través del desarrollo radicular proporcionando mayor superficie para la absorción de nutrientes y la colonización de rizobacterias incrementando los exudados radiculares, por lo tanto, un efecto que trae aparejado un sistema radicular más desarrollado puede ser la mayor disponibilidad de C, N y P por unidad de volumen de suelo. Este mayor desarrollo radicular podría deberse a la producción de hormonas vegetales, principalmente de auxinas (Bashan y de Bashan, 2005). Teniendo en cuenta lo antes mencionado, puede inferirse que existe una mayor afinidad entre este genotipo de maíz y *A. brasilense* REC3.

Aunque todos los tratamientos inoculados generaron incrementos significativos en la biomasa respecto al control, la cepa REC3 promovió el crecimiento de las plantas en ambos suelos de manera significativa diferenciándose de los demás tratamientos y del control. El efecto de la inoculación bacteriana fue mayor en el suelo limitado en nutrientes, donde las plantas tuvieron un incremento en el crecimiento un 74,65 % superior a sus con-

troles, mientras que en el suelo fértil fue de 62,86 % con respecto al testigo. Se observaron resultados similares en un suelo erosionado y otro suelo desértico ubicado al noroeste de California Sur y en México, ambos limitados en nutrientes, para diferentes cultivos como remolacha azucarera y de cactus tipo cardón gigante donde la inoculación con *Azospirillum* tuvo una respuesta significativamente mayor en la promoción del crecimiento en comparación con los suelos sin limitación de nutrientes (Bacilio *et al.*, 2006; Çakmakçı *et al.*, 2006). Asimismo, en plantas de frutilla cultivadas en medio hidropónico limitado en nutrientes e inoculadas con *A. brasilense*, se observaron incrementos en el crecimiento similares a los obtenidos en este trabajo (Guerrero-Molina *et al.*, 2014). Otro ensayo realizado en condiciones de campo para plantas de frutilla inoculadas con *A. brasilense* REC3 también reportó un incremento en el índice de crecimiento en comparación a las plantas no inoculadas (Lovaisa *et al.*, 2015). Por otra parte, en estudios realizados en maíz en condiciones de invernadero en dos tipos de suelos se observó también que la inoculación bacteriana tuvo un mayor efecto sobre el crecimiento y la absorción de nutrientes (N, P y K) del maíz en suelos deficientes en nutrientes que en los suelos no limitados en los mismos (Egamberdiyeva, 2007).

Con los resultados obtenidos del contenido de clorofila en las hojas, la longitud y superficie radicular, y el índice de crecimiento se puede inferir que la cepa *A. brasilense* REC3 puede ser considerada una potencial alternativa biotecnológica para su aplicación en el cultivo de maíz.

Referencias bibliográficas

- Bacilio M., Hernandez J.P., Bashan Y. (2006). Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* 43 (1): 112-119.
- Baldani J.I., Reis V.M., Videira S.S., Boddey L.H., Baldani V.L.D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil* 384: 413-431.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. (2005). Plant growth-promoting. En: *Encyclopedia of soils in the environment*. Hillel D. (Ed.). Elsevier, Reino Unido. Pp. 103-115.
- Biari A., Gholami A., Rahmani H.A. (2008). Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran. *Journal of Biological Sciences* 8 (6): 1015-1020.
- Çakmakçı R., Dönmez F., Aydın A., Şahin F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 38 (6): 1482-1487.
- Carley H.E., Watson R.D. (1966). A new gravimetric method for estimating root-surface areas. *Soil Science* 102 (5): 289-291.
- Cavalcante V.A., Döbereiner J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108 (1): 23-31.
- Delaporte-Quintana P., Grillo-Puertas M., Lovaisa N.C., Rapisarda V.A., Teixeira K.R., Pedraza R.O. (2016). Solubilization of different sources of insoluble phosphate by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 36 (1): 33-35.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2016). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>.
- Egamberdiyeva D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36: 184-189.
- Eskin N., Vessey K., Tian L. (2014). Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. *International Journal of Agronomy* 2014: 208-383.
- Fulchieri M., Frioni, L. (1994). *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 26 (7): 921-923.
- Guerrero-Molina M.F., Lovaisa N.C., Salazar S.M., Díaz Ricci J.C., Pedraza R.O. (2014). Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Plant Biology* 16: 726-731.
- Herschkovitz Y., Lerner A., Davidov Y., Rothballer M., Hartmann A., Okon Y., Jurkevitch E. (2005). Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50 (2): 277-288.
- Kouchebagh S.B., Mirshekari B., Farahvash F. (2012). Improvement of corn yield by seed biofertilization and urea application. *World Applied Science Journal* 16 (9): 1239-1242.
- Lovaisa N.C., Guerrero-Molina M.F., Delaporte-Quintana P.G.A., Salazar S.M. (2015). Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. *Revista Agronómica*

- ca del Noroeste Argentino 35 (1): 33-36.
- Maheshkumar K.S., Krishnaraj P.U., Alagawadi A.R. (1999). Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugar cane. *Current Science* 76: 874-875.
- Mehnaz S. (2015). *Azospirillum*: A biofertilizer for every Crop. En: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Arora N.K. (Ed.). Springer, India. Pp. 297-313.
- Okon Y., Vanderleyden J. (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *American Society for Microbiology News* 63: 366-370.
- Pedraza R.O., Motok J., Tortora M.L., Salazar S.M., Díaz-Ricci J.C. (2007). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant and Soil* 295: 169-178.
- Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Díaz-Ricci J.C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 265-272.
- Ríos Rocafull Y., Dibut Álvarez B., Rojas Badía M., Ortega García M., Arozarena Daza N., Rodríguez Sánchez J. (2016). Interacción de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y hortalizas de raíz. *Cultivos Tropicales* 37: 28-32.
- Salazar S.M., Lovaisa N.C., Guerrero Molina M.F., Ragout A.L., Kirschbaum D.S., Pedraza, R.O. (2012). Fruit yield of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense* RLC1 and REC3 under field conditions. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 32: 63-66.