

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

“Trabajo final presentado para optar al grado de Ingeniero Agrónomo”

EVALUACION DEL EFECTO DE LA INOCULACION EN MAIZ
(*Zea mays* L.) CON *Azospirillum brasilense* BAJO DISTINTAS
FORMULACIONES

Alumno: Leopoldo Enrique López
DNI : 30154276

Directora: Dra. Carmen Olmedo

Río Cuarto - Córdoba
Marzo de 2006

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

**Título del trabajo final: EVALUACION DEL EFECTO DE LA
INOCULACION EN MAIZ (*Zea mays* L.) CON *Azospirillum brasilense* BAJO
DISTINTAS FORMULACIONES**

Autor: Leopoldo Enrique López

DNI : 30154276

Directora: Dra. Carmen Olmedo

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del jurado evaluador

Alcalde, Mónica

Barotto, Omar

Thuar, Alicia

Fecha de presentación: ____/____/____

Aprobado por secretaria académica: ____/____/____

Secretario Académico

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres y hermanos por el apoyo que me brindaron durante mi preparación como profesional.

A mis amigos por haber estado siempre y estar en los momentos importantes de mi vida.

Agradecimientos

A mi directora Dra. Carmen Olmedo por su dedicación y paciencia durante todo el tiempo empleado en la realización de esta tarea.

A la Dra. Alicia Thuar por la cooperación y consejos aportados para la culminación de la misma.

Al Dr. Javier Andrés por su constante cooperación y optimismo.

A Jorge Vázquez por su compañerismo.

Al Cr. Raúl Manellí por ceder su establecimiento para realizar el ensayo y su constante colaboración.

A mis compañeros y amigos por el incalculable apoyo brindado para la posible presentación de este trabajo final.

RESUMEN

La práctica biotecnológica de la inoculación, es una técnica cuyo objetivo es optimizar la productividad de los sistemas agropecuarios, con menor efecto sobre el ambiente, haciendo de esta manera que los sistemas de producción sean sustentables a lo largo del tiempo. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en maíz a campo bajo distintas formulaciones. El estudio se realizó en cercanías del paraje Las Ensenadas, a 35 km. al sur de la ciudad de Río Cuarto. Durante el ciclo de desarrollo del cultivo se realizaron las siguientes evaluaciones: Recuento del número de bacterias en las semillas durante la siembra, en el estadio de diez hoja (v10) se evaluó; plantas/ha., altura/planta, diámetro del tallo, longitud radical, peso seco aéreo, peso seco radical, en cosecha y post-cosecha se determinó, plantas/ha, espigas/planta, peso de granos/espiga, peso de 1000 granos, rendimiento y peso seco radical.

El recuento bacteriano permaneció estable a pesar de las distintas formulaciones del inoculante, esa similitud no se manifestó en la mayoría de los parámetros evaluados durante el ciclo del cultivo.

La densidad de plantas/ha en v10, altura y el diámetro del tallo no mostraron cambios en los diferentes tratamientos. La longitud radical mostró diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos inoculados. El peso seco aéreo y radical manifestaron diferencias notorias entre los tratamientos, destacándose el tratamiento inoculado mas el protector (III).

Las plantas/ha. a cosecha no manifestaron diferencias entre tratamientos. El número de espigas/planta, peso de granos/espiga y peso de 1000 granos incrementaron significativamente en los tratamientos inoculados, manifestándose esto en mayores rendimientos (qq./ha.) con diferencias notorias entre ellos, destacándose el tratamiento inoculado mas el protector (III). El peso seco radical tuvo un comportamiento similar a los observados en los rendimientos y parámetros que lo definen. La inoculación con *Azospirillum brasilense* promovió el crecimiento del cultivo de maíz a campo.

Palabras claves: inoculación, *Azospirillum brasilense*, promoción, crecimiento.

SUMMARY

The biotechnological practice of inoculation is a technique to optimize the productivity of the agricultural systems, with smaller effect on the atmosphere, making of this way systems more sustainable along the time. The objective of the work was to evaluate the effect of the inoculation with *Azospirillum brasilense* in corn to field in different formulations. The study was carried out in proximity of the place Las Ensenadas, 35 km. to the south of Río Cuarto city.

The number of bacterias per seeds was evaluated at the moment of sows and during the development of the cultivation the following evaluations were carried out: in the stadium of ten leaves (v10): plants per hectare, height of plant, diameter of shoots, length of roots, air dry weight and roots dry weight. To the crop moment and in post-crop it was determined: plants for hectare, number of spikes for plant, weight of grains for spike, weight of 1000 grains, yield and dry weight of roots.

The bacterial recount remained stable in spite of the different formulations of the inoculant. This similarity didn't show in the majorities of the parameters evaluated during the cycle of the cultivation.

The density of plants per hectare in v10, the height and the diameter of shoots showed changes in the different treatments. The length of roots showed significant differences between the control and inoculated treatments. The air and roots dry weight manifested notorious differences among the treatments, standing out the inoculated treatment and added with the protector (III).

The number of plants per hectare in the crop moment didn't manifest differences among treatments. The number of spikes for plant, weight of grains per spike and weight of 1000 grains increased significantly in the inoculated treatments, showing this in more yields (quintals per hectare) in this treatments with notorious differences among them, standing out the inoculated treatment with the protector (III). The dry weight of roots had a similar behavior to those observed in the yields and parameters that define it. The inoculation with *Azospirillum brasilense* stimulated the growth of corn in field.

Key words: inoculation, *Azospirillum brasilense*, promotion, growth.

INDICE DEL TEXTO

Resumen.....	V
Summary.....	VI
Introducción.....	1
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	9
Materiales y Métodos.....	10
Resultados y Discusión.....	15
Conclusión.....	26
Bibliografía.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	15
Figura 2.....	16
Figura 3.....	17
Figura 4.....	17
Figura 5.....	18
Figura 6.....	19
Figura 7.....	20
Figura 8.....	20
Figura 9.....	21
Figura 10.....	22
Figura 11.....	23
Figura 12.....	24
Figura 13.....	25

INTRODUCCION

De los alimentos que consume la población mundial el 97% proviene del suelo, siendo el mismo un recurso renovable, cuya capacidad de producir se conserva sólo si se maneja adecuadamente, este tiene una pequeña capa cultivable de aproximadamente 20 cm, allí se encuentran la mayoría de los elementos que los cultivos necesitan para crecer y brindar productos alimenticios, cuidar este recurso limitado, cuya formación demanda miles de años, es el primer requerimiento para la agricultura sustentable del nuevo siglo (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

La producción argentina de granos se duplicó en la última década, cuando las cosechas récord se sucedieron año tras año, como resultado de la aplicación de numerosas y modernas técnicas tales como, genética de avanzada, fertilizantes, agroquímicos, técnicas para el control de plagas, enfermedades y malezas, y además siembra directa (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

Este aumento notable de la agricultura y su productividad, se originó debido a la elevada demanda de productos provenientes de esta actividad, produciendo un aumento de la intervención del hombre sobre los recursos naturales, fundamentalmente, el suelo y el agua. Las áreas más productivas han sido sometidas a mayor diversidad y presiones en su uso a través de rigurosas prácticas de manejo como la fertilización con sales químicas y aquellas áreas no utilizadas anteriormente por su marginalidad, hoy, son transformadas y ocupadas para su aprovechamiento (Cantero y Cholaky 1997). Consecuencia de su uso y manejo irracional, se ha llegado a una degradación parcial y en ciertos casos total, con el deterioro que esto acarrea.

La práctica biotecnológica de la inoculación ha abierto nuevos horizontes en cuanto a la aplicación de microorganismos que favorecen la promoción del crecimiento de las plantas a través de la fertilización biológica. Entre los géneros más usados podemos mencionar; *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, de esta forma se lograría un menor efecto contaminante sobre el suelo, debido a un menor uso de productos químicos.

Los microorganismos PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), de la rizosfera son capaces de promover el crecimiento de un cultivo a través de la producción de fitohormonas y de diferentes sustancias biológicas benéficas (Perotti y Pidello, 1999).

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan nitrógeno, pero solo algunas se destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras del crecimiento (Beringer,1984; Ferrera-Cerrato,1995; Rodríguez,1995). Dentro de las

bacterias asociativas más estudiadas se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*, la cual ha sido objeto de estudio desde la década del 70 (Bouillant M., 1997).

Algunos antecedentes de *Azospirillum brasilense* muestran efectos en la fijación de nitrógeno atmosférico, producción y liberación de hormonas promotoras del crecimiento radical (auxinas, giberelinas, citocininas), de enzimas tales como las pectinolíticas, distorsionando la funcionalidad de las células de las raíces y el aumento en la producción de exudados, promoviendo el crecimiento de otros organismos rizoféricos (Bashan y Levanony, 1990; Okon y Labandera-Gonzalez, 1994).

La inoculación lleva a un aumento significativo del sistema radical, induce la resistencia a agentes patógenos y provee elementos como el nitrógeno, además inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, lo que permite un desarrollo más económico y saludable de los cultivos (Bouillant M., 1997).

En México durante el año 1999, se inocularon alrededor de 450.000 hectáreas de maíz (*Zea mays L.*) y 150.000 hectáreas de sorgo (*Sorghum bicolor L.*); cebada (*Hordeum vulgare L.*) y trigo (*Triticum aestivum L.*) con *A. brasilense*, demostrándose incrementos de aproximadamente 26% en los rendimientos cuando se implantaron en suelos pobres y con un bajo aporte de nitrógeno. El programa “**Biofertilización**” ha seguido durante el año 2000, inoculándose alrededor de un millón y medio de hectáreas (Caballero Mellado, 2002).

En Israel durante 1998 y 1999 se han realizado experiencias de inoculación con *Azospirillum brasilense* en plantas de maíz, obteniéndose incrementos en el rendimiento de hasta un 13% (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Una amplia revisión sobre los resultados de los experimentos desarrollados entre los años 1974-1994 fue realizada por Okon y Labandera-Gonzalez

, (1994). Esta evaluación reveló que el éxito de la inoculación fue en el rango del 60-70% de experiencias realizadas en suelos y regiones climáticas diferentes, con incrementos significativos, en el rango de 5-30% en el rendimiento de los cultivos, sin embargo, cuando se evaluó el efecto de la inoculación en conjunto con la aplicación de niveles intermedios de fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, el éxito de los experimentos se incrementaron hasta un 90% (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994).

El efecto de la inoculación sobre el incremento del rendimiento total en ensayos de campo generalmente oscila entre un 10-30%. Se considera que incrementos moderados en el rendimiento (hasta alrededor de un 20%) son comercialmente valiosos en la agricultura moderna si se obtienen consistentemente (Bashan, Y. y Levanony, H., 1990).

Rodríguez Cáceres *et al.*, (1996) observaron que la efectividad de la inoculación, varía con el contenido de agua y la fertilidad de los suelos, determinando la importancia que puede tener la relación cepa-cultivo adaptadas a los distintos suelos.

Lucangelli y Bottini, (1996) demostraron que la aplicación de microorganismos fijadores de vida libre incrementan el largo de los entrenudos en maíz y arroz.

Belloné *et al.*, (1999), registraron en maíz mejoras en el peso del sistema radical y en los parámetros de la parte aérea. Por su parte Ruiz *et al.*, (1996) sostiene que la inoculación con *Azospirillum* modificó parámetros del crecimiento vegetal asociados al rendimiento del cultivo de trigo.

Experiencias realizadas por la cátedra Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en su campo experimental, con maíz inoculado con *Azospirillum* se encontró un incremento del 50% del peso seco del grano, aumentó al doble el número de granos en la espiga y se observó un mayor volumen en la raíz (Fulchieri M. y Frioni L., 1994); en trabajos realizados con sorgo y trigo inoculados con *Azospirillum*, se estimuló la elongación de las raíces, el número de raíces laterales y adventicias (Bhattarai, 1993).

En un ensayo de trigo a campo inoculado con *Azospirillum* incrementó los rendimientos con respecto al control no inoculado en un rango de 23% a 63% (Caballero Mellado, 2002).

Okon desde 1985 viene demostrando los efectos favorables de la asociación entre *Azospirillum* y los cultivos sobre el crecimiento y la producción; el cultivo de mijo y maíz son los más estudiados (Tien *et al.*, 1979).

En Argentina, en estudios a nivel experimental de comparación de cepas, existen antecedentes de mejoras en la producción de granos en la región semiárida con *Azospirillum brasilense* en varios cultivares de trigo (Rodríguez Cáceres *et al.*, 1996). No obstante, en ensayos de producción se han observado resultados contradictorios, con ausencia de respuesta en la provincia de Córdoba (Olmedo *et al.*, 2002) y con respuestas medias de 325 kg./ha en Balcarce, Buenos Aires (Cattáneo *et al.*, 1996).

Olmedo *et al.*, (2002) observaron que los tratamientos con bacterias PGPR del género *Azospirillum*, más urea y fosfato presentaron una mayor longitud radical y esas diferencias se mantienen en los parámetros, peso seco del sistema radical y de la biomasa aérea en estado V5 de un cultivo de trigo a campo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Okon (1998), cuando inoculó trigo con *Azospirillum* y encontró un marcado efecto en la proliferación de pelos radicales, lo que proporcionó un mejor anclaje y un mayor volumen de suelo explorado por parte del sistema radical.

Olmedo *et al.*, (2002), concluyeron que la inoculación de semilla de trigo con *Azospirillum brasilense*, en combinación con media dosis nitrogenada y fosforada arroja los mismos rendimientos en kg./ha que el tratamiento de nitrógeno y fósforo con dosis completa sin inocular, lo que daría la pauta de que el empleo de esta rizobacteria reemplazaría en un 50% a la fertilización química, bajo ciertas condiciones ambientales.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El termino **Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal** o **PGPR** (del ingles; Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) fue empleado por primera vez en 1978 por Kloepper y Schroth, para describir un grupo de bacterias rizoféricas (o rizobacterias) que beneficiaban el crecimiento vegetal cuando se inoculan sus semillas.

Las bacterias que proporcionan algún beneficio a las plantas son de dos clases, las que establecen una relacion simbiótica con las plantas y las de vida libre, pero a menudo se las encuentra cerca, sobre o incluso dentro de las raíces de las plantas (Klopper *et al.*, 1988; van Peer and Schippers, 1989; Frommel *et al.*, 1991).

Las bacterias simbióticas, especialmente los rizobios, han sido estudiados extensamente como un medio biológico para incrementar el rendimiento de cultivos en determinadas condiciones (Vance, 1983; Bohlool, 1990; Paau, 1991; Sharma *et al.*, 1993). Dentro de las bacterias que actúan como PGPR de vida libre, pueden ser considerados diferentes microorganismos, incluyendo especies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Brown, 1974; Elmerich, 1984; Kloepper *et al.*, 1988, 1989; Bashan and Levanony, 1990; Tang, 1994; Okon and Labandera-González, 1994).

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Las bacterias PGPR pueden inducir la promoción del crecimiento, directa o indirectamente. Las influencias directas incluyen producción de fitohormonas, liberación de fosfatos y micronutrientes, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos. El efecto indirecto que causan las PGPR es la alteración de la ecología y el ambiente de la raíz (Bowen and Rovira, 1991; Glick, 1995; Hornby, 1990; Kapulnik, 1991; Lynch, 1990a, 1990b, 1990c; Okon and Hadar, 1987) por ejemplo, actuando como agentes de biocontrol y reduciendo las enfermedades, por liberación de sustancias antibióticas que matan microorganismos nocivos, por competencia con agentes deletéreos y metabolismo de productos tóxicos.

Mecanismo de promoción directa del crecimiento

- Producción de fitohormonas:

Las PGPRs pueden beneficiar directamente el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas (Lippman *et al.*, 1995), entre ellas se encuentran auxinas, citocininas y giberelinas. Estos compuestos incrementan el número de raíces laterales y de pelos radicales, aumentando notablemente la superficie de la raíz y, en consecuencia, favoreciendo una mayor absorción de nutrientes (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

La atención principal ha sido enfocada en las auxinas (Brown, 1974; Tien *et al.*, 1979). Dentro de las mismas, la más común y mejor caracterizada ha sido el ácido 3-indol acético (AIA), el cual se ha visto que estimula la respuesta vegetal, tanto en velocidad (por ejemplo, incrementando la elongación celular), como en tiempo (por ejemplo, la división celular y la diferenciación) (Cleland, 1990; Hagen, 1990).

La inoculación de plantas de trigo con la mutante de *A. brasilense* nif-AIA+ incrementa el número de raíces laterales comparado con la cepa salvaje, la cual no produce AIA (Barbieri *et al.*, 1986).

La síntesis de auxinas y giberelinas por microorganismos, incrementa la tasa de germinación de las semillas y el desarrollo de pelos radicales, siendo esta la principal característica de *Azospirillum* (Brown, 1974).

- Solubilización de Fosfatos:

El fósforo es un elemento químico esencial para la vida y muy abundante en la corteza terrestre, sin embargo una pequeña proporción está disponible para las plantas (5 %), por lo que debe ser suministrado por medio de fertilizantes minerales, pero gran parte de éste tiende a acumularse en el suelo en forma de compuestos insolubles (Richardson, 1994). El aprovechamiento de dicho nutriente depende de la actividad microbiana; la inoculación de plantas con microorganismos solubilizadores de fósforo, frecuentemente estimula el crecimiento vegetal, por incremento en la absorción del mismo (Chabot *et al.*, 1993; Kucey *et al.*, 1989).

- Fijación de Nitrógeno:

La fijación biológica del nitrógeno, es el proceso por el cual las plantas se asocian con bacterias capaces de transformar el nitrógeno atmosférico en amoníaco, y de esta forma las plantas asimilan el nitrógeno antes fijado por la bacteria (Frioni, 1999).

La fijación de nitrógeno no simbiótica, es realizada por microorganismos como *Azospirillum*; estas son bacterias de vida libre que fijan nitrógeno bajo ciertas condiciones ambientales y de suelo, en asociación con las raíces (Frioni, 1999) y que influyen positivamente en el crecimiento y rendimiento de los cultivos.

Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento – Supresión de agentes fitopatógenos.

- Competencia por nutrientes – Producción de sideróforos:

Dado que la cantidad de hierro del suelo que es aprovechable es demasiado baja para mantener el crecimiento microbiano, los microorganismos del suelo excretan moléculas quelantes (sideróforos) que se unen al Fe^{+3} , transportándolo al interior de la célula

microbiana y luego lo hacen aprovechable para el crecimiento de la bacteria (Neilands and Leong, 1986; Briat, 1992).

Una vía por la cual las PGPRs pueden evitar la proliferación de fitopatógenos, y por lo tanto facilitar el crecimiento vegetal, es a través de la producción y secreción de sideróforos con una alta afinidad por el hierro (Castignetti and Smarelli, 1986).

- **Inducción de Resistencia Sistémica:**

Las Rizobacterias no patógenas pueden inducir una resistencia sistémica en las plantas similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) cuando son atacadas por patógenos. La medición de diferentes cepas bacterianas en la resistencia sistémica inducida (SIR) ha sido demostrada contra hongos, bacterias y virus en diversos cultivos (Van Loon *et al.*, 1998).

Determinadas bacterias inducen la resistencia sistémica, produciendo diferentes compuestos tales como los lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico; sin embargo, esta inducción depende de que las bacterias colonicen el sistema radical en número suficiente (Van Loon *et al.*, 1998).

- **Producción de Antibióticos:**

Uno de los mecanismos más efectivos que puede emplear una PGPR para prevenir la proliferación de fitopatógenos es la síntesis de antibiótico, un gran número de compuestos antibióticos producidos por *Pseudomonas fluorescens* han sido caracterizados químicamente.

- **Producción de Cianida de Hidrógeno:**

La propiedad de algunas *Pseudomonas* de sintetizar este compuesto (al cual ellas mismas son resistentes), puede estar vinculada a la capacidad de estas cepas para inhibir algunos hongos patógenos (Voisard *et al.*, 1989).

- **Competencia por nutrientes y en el establecimiento sobre la superficie de la raíz:**

Por este mecanismo los microorganismos, pueden proteger a la planta de agentes fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1988; O'Sullivan and O'Gara, 1992).

Características del cultivo de Maíz

El maíz es uno de los principales cereales, junto al arroz y al trigo, y se emplea en alimentación humana y animal. Originario de América, comenzó a cultivarse entre los mayas y los aztecas, y ahora tiene difusión mundial, en especial en zonas templadas. En Argentina, el 44% de la superficie cultivada se realiza en siembra directa.

En su larga trayectoria, el mejoramiento genético permitió multiplicar su rinde al desarrollarse híbridos convencionales y transgénicos,

El maíz, perteneciente a la familia de las gramíneas, es una planta anual, de hábito de crecimiento primavero-estival, produce altos rendimientos en comparación con el trigo la soja y el girasol.

Desde la siembra del grano hasta la cosecha, la planta atraviesa los siguientes estadios, en los cuales se utilizan caracteres externos (macroscópicos) para su identificación:

Estados vegetativos:

* Siembra: Con condiciones adecuadas, la semilla absorberá agua y comenzará a crecer, se elonga la radícula, luego el coleóptilo y crecen las primeras raíces seminales. La actividad de la semilla comienza con una temperatura igual o mayor a 10° centígrados, a 5-7 cm de profundidad, durante tres días seguidos.

* VE (Emergencia): Con humedad y alta temperatura, la plántula emerge 4-5 días después de la siembra; si estas condiciones climáticas no son las adecuadas la emergencia puede verse retardada.

* V1 (Una hoja expandida): Comienza a crecer y a desarrollarse el sistema de raíces nodales o aéreas, responsables del abastecimiento de agua y nitrógeno a partir de V6.

* V6 (Crecimiento del tallo): La caña comienza su período de mayor elongación y puede realizarse la fertilización nitrogenada hasta el estadio de ocho hojas, para que los nutrientes estén disponibles para el cultivo en el período crítico.

* V9 (Nace la panoja): Aunque no visible, la panoja comienza su desarrollo en este momento (y finaliza en R1, es fundamental en la reproducción del maíz), y el tallo continúa su elongación debido al alargamiento del quinto nudo en adelante.

* V12 (Formación de espigas): La espiga comienza a formarse unos 10 días después que la panoja, en este periodo se preparan las funciones reproductoras, el número de hileras de granos ya se ha establecido y se define la cantidad de granos potenciales (los cuales quedan definidos una semana previa a la polinización) en cada una de ellas.

Generalmente se pierden las dos hojas basales.

* VT (Aparición de la panoja): Comienza cuando la última rama de la panoja está enteramente visible y generalmente unos dos o tres días antes de que los estigmas puedan estar visibles. Durante este periodo la planta alcanzará su altura máxima, que rondará entre 2-2,5 mts.

Estados reproductivos:

* R1 (Aparición de estigmas): Comienza cuando algunos de los estigmas se encuentran visibles fuera de las chalas. La polinización sucede cuando algunos granos de polen son atrapados por los estigmas.

El polen crece hasta alcanzar el óvulo y producirse la fecundación; las anteras liberan polen (el rocío de la noche y la primera luz del día facilitan la liberación de polen) durante ocho días aproximadamente, coincidiendo con la aparición de los estilos femeninos.

* R6 (Madurez): Se alcanza cuando todos los granos de la espiga han alcanzado su máximo peso seco (alrededor de dos meses después de la fecundación), los granos están completamente llenos con un 30 a 35% de humedad y comienza el periodo de secado, hasta alcanzar entre el 13 y 15% de humedad en la cosecha; hasta este momento la capa dura de almidón ha venido avanzando hacia el marlo. La chala y la mayoría de las hojas en este estadio ya están secas (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

Importancia del cultivo de Maíz

El maíz es uno de los productos agrícolas más importantes y el tercero más cultivado en el mundo; durante la campaña agrícola 2001/2002 los principales productores mundiales fueron: Estados Unidos (250), China (120), Brasil (38), México (19), Francia (18), Argentina (14,7), otros países (160) millones de toneladas respectivamente.

La posición de nuestro país en el mercado del maíz tiene regular relevancia; es el segundo exportador y el sexto productor mundial. El maíz se produce desde Salta hasta el sur bonaerense; la zona núcleo maícera abarca el sudeste de Córdoba, sur de Santa Fe y norte bonaerense. Su rendimiento promedio es de 60 quintales por hectárea, el más alto entre los granos cultivados.

En las últimas tres décadas, en la Argentina hubo un aumento gracias al incremento de la producción por hectárea que paso de 17 qq./ha. a 60 qq./ha., esto ocurrió especialmente, por la introducción de nuevos materiales genéticos, con mayor potencial de rendimiento y mejor respuesta a nuevas técnicas de producción.

El maíz es un cultivo de gran potencialidad. Así lo demuestran más de 600 subproductos, que abarcan desde alimentos hasta plásticos, papeles y biocombustibles. En la Argentina, el valor bruto de la producción es de 1.500 millones de dólares, cifra a la que hay que agregarle la facturación de su agroindustria: alrededor de 4.500 millones (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

Hipótesis:

La inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz a campo, favorece el crecimiento y la producción.

Objetivos:

El presente trabajo tiene como:

Objetivo general:

- * Evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en maíz a campo bajo distintas formulaciones.

Objetivos específicos:

- * Recuento de bacterias en las semillas en los distintos tratamientos al momento de la siembra
- * Evaluar en el estado fenológico de seis hojas (v6) densidad de plantas/ha. y biomasa aérea.
- * Evaluar en madurez fisiológica plantas cosechadas, peso de granos (mg/grano) y rendimiento en qq./ha. en madurez fisiológica.
- * Determinar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre los rendimientos en grano del cultivo de maíz a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente ensayo se realizó en el establecimiento Los Sauces, ubicado en cercanías del paraje Las Ensenadas, pedanía Santa Catalina, provincia de Córdoba, Argentina. Las Ensenadas se ubica 35 km. al sur de la ciudad de Río Cuarto.

Previo a la siembra se tomó una muestra compuesta de los primeros 20 centímetros de suelo para realizar un análisis físico-químico; la muestra estaba constituida por 20 submuestras. El muestreo se realizó siguiendo el tipo de muestreo sistemático en “M” logrando de esta manera que la muestra sea homogénea y representativa.

El resultado de este análisis es:

Materia orgánica.....	2.15 %
Nitrógeno de nitratos.....	16.9 ppm
Nitratos.....	74.9 ppm
Fósforo.....	27 ppm
pH (en agua).....	6.1
Humedad.....	14.8 %

Metodología utilizada:

-Materia orgánica.....	Método Walkley-Black
-N-Nitratos.....	Reducción por cadmio
-Fósforo.....	Método Kurtz y Bray 1
-pH.....	Potenciometría 1:2,5

Instalación del ensayo

Se realizarón cuatro parcelas de 500 metros de largo por 10 metros (14 hileras/parcela) cada una, a una distancia entre hileras de 0,7 metros.

Los tratamientos en cada parcela fueron los siguientes:

Tratamiento I:

Testigo, fertilizado con urea y fosfato diamonico (PDA), la única diferencia con el resto de los tratamiento es que no fue inoculado.

Tratamiento II:

Se inoculó las semillas con *Azospirillum brasilense* formulación líquida (Nitragin bonus líquido) a razón de 10 ml por kg. de semilla.

Tratamiento III:

Se inocularon las semillas con *Azospirillum brasilense* en formulación líquida (Nitragin bonus líquido) a razón de 10 ml por kg. de semilla; además, se le aplicó el protector (HP) a razón de 2 gr. por kg. de semilla.

Tratamiento IV:

Se realizó una mezcla con 10 ml de *Azospirillum brasilense* formulación líquida más 10 gr. de *Azospirillum brasilense* formulación sólida y luego se tomó la proporción correspondiente a la cantidad de semilla a utilizar y se inoculó.

La inoculación en todos los casos se realizó al momento de la siembra, de forma manual, teniendo en cuenta la dosis a utilizar y la cantidad de semilla a inocular en cada uno de los tratamientos respectivamente. A todos los tratamientos se los fertilizó al momento de la siembra con 98 kg. de urea granulada (que contiene 46% de nitrógeno) y 42 kg. de fosfato diamónico (que contiene 18% de nitrógeno y 46% de fósforo), los cuales fueron mezclados y aplicados a 6 cm. de profundidad y a 3 cm. al costado de la línea de siembra.

La siembra se realizó el 23 de octubre de 2004, el suelo en dicho momento se encontraba con un 14,8% de humedad, lo que permitió realizar la siembra en adecuadas condiciones hídricas.

El sistema de siembra utilizado fue de labranza cero (o directa); se colocaron 5 (cinco) semillas de maíz por metro lineal (71500 semillas/ha), las mismas fueron colocadas a 5 centímetros de profundidad y a 20 centímetros entre semillas dentro de la misma línea de siembra.

Los cuatro tratamientos (parcelas) se realizaron en el mismo lote, el cultivo antecesor fue soja en siembra directa durante la campaña agrícola del 2003/2004. Previo a la emergencia del maíz se realizó una aplicación de 1,5 litros/ha. de glifosato, 2 litros/ha. de atrazina y 2 litros/ha. de acetoclor, estos herbicidas fueron pulverizados juntos en una sola aplicación; además se colocó 100 cm³/ha. de cipermetrina (insecticida) para la prevención y control de orugas cortadoras durante los primeros estadios del cultivo, estos insectos suelen causar serios problemas en el stand de plantas.

La semilla de maíz que se utilizó fue un híbrido simple “Pucará” que ya viene tratada con dos fungicidas curasemillas (Fludioxinil + Metalaxil), para el control de hongos del suelo y de la semilla, cuya marca comercial utilizada fue Máxim xl.

Características del híbrido:

Tipo de cruzamiento	Simple modificado
Días a floración	73-75
Madurez relativa	125 días
Días a cosecha	169-173
Tipo de grano	Colorado duro
Altura de inserción de la espiga	1.0 metro
Altura de plantas	2.3 metros
Tolerancia al Mal de Río Cuarto	Tolerante
Resistencia al quebrado	Alta
Resistencia al vuelco	Alta
Comportamiento a sequía	Muy bueno
Pérdida de humedad del grano	Rápida
Respuestas a mejores ambientes	Muy buena
Prolificidad (espigas/planta)	1.1
Densidad de siembra sugerida (sur Cba.)	65000 plantas/ha.

Fuente: Catalogo de semillas de maíz NK 2002

Diagrama de las parcelas sembradas

Trat. I:	Trat. II:	Trat. III:	Trat. IV:
Testigo	<i>Azospirillum brasilense</i> líquido	<i>Azospirillum brasilense</i> Líquido + Protector (hp)	<i>Azospirillum brasilense</i> Líquido + <i>Azospirillum brasilense</i> Sólido

· Evaluación del recuento de *Azospirillum brasilense* de las semillas de los diferentes tratamientos

Se realizó con el fin de conocer el número de microorganismos viables presentes en las semillas al momento de la siembra. Para ello se tomó 1 gr. de las semillas inoculadas de cada tratamiento, y se las colocó en 9 ml de buffer fosfato, se agitó mecánicamente durante unos segundos, con el fin de obtener que los microorganismos adheridos a la superficie de la semilla, se desprendieran, luego se tomó 1 ml de esta suspensión, a partir del cual se hicieron las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6}

fueron sembradas en placas de petri con medio Nfb, por duplicado siendo el volumen de siembra de 0,1 ml.

Métodos de Cuantificación de la promoción del crecimiento.

Determinación en 10 hojas (v10).

** Medición de la densidad de plantas/ha.:*

Esta medida se realizó con una cinta métrica de cinco metros de largo, en la cual se cuantificaron las plantas que había en los cinco metros lineales, y luego se los extrapoló a 14.300 metros lineales que tiene una hectárea (esto es para siembras con un espacio entre hileras de 0,7 metros), de esta manera se pudo conocer la densidad de plantas por hectárea. Esta medición fue realizada al azar, sobre las parcelas de cada uno de los tratamientos, con cuatro repeticiones por tratamientos.

** Altura de la planta:*

Se midió la altura en metros desde la base de la planta (sin incluir la raíz) hasta la punta.

** Diámetro del tallo:*

Se midió el diámetro en centímetros con un calibre, la medición se tomo a 5 cm. de la base del tallo.

** Medición de la longitud total de las raíces:*

La determinación se realizó por el método de la intersección de líneas (Newman E., 1966). Para ello se utilizaron un área rectangular, dentro de la cual se construyó una cuadrícula. La raíz, luego de removido el suelo adherido a ella, se colocó sobre la grilla, y se procedió a contar el número de intersecciones entre las líneas de estas y los pelos radicales. A partir del número de intersecciones se puede estimar la longitud de la raíz, mediante la siguiente ecuación:

$$R = \pi \cdot N \cdot A / 2 \cdot H$$

Donde **R**: Longitud total de la raíz.

N: Número de intersecciones entre los pelos radicales y las líneas de las cuadrícula.

A: Area del rectángulo.

H: Longitud total de las líneas de la cuadrícula.

π : 3.14

Se tomaron muestras de cada tratamiento (cuatro plantas) con cuatro repeticiones por cada una de las parcelas realizadas.

** Determinación del peso seco aéreo y de la raíz:*

Las plantas a las que se le determinó la longitud total de raíces, fueron cortadas a fin de dividir la parte aérea y la raíz. Ambas se colocaron en estufa, por separado, durante 48 horas a 60° C, hasta peso constante. Luego de este tiempo se determinó el peso seco.

Determinaciones a cosecha

** Densidad de plantas/ha:*

Se realizó de la misma manera que la medición en el estado de diez hojas del cultivo.

** Espigas por planta:*

Se cuantificó el número de espigas por planta, en los cuatro tratamientos, con cuatro repeticiones.

** Peso de granos/espiga:*

Se desgranaron espigas y se pesó (sin incluir el marlo) la cantidad de granos que tenían cada una para posteriormente estimar el rendimiento.

** Peso de 1000 granos:*

Se pesaron 100 granos de cada uno de los tratamientos, y luego se extrapó a peso de 1000 granos.

** Rendimiento:*

Con los datos, de plantas/ha, espigas por planta, peso de granos/espiga (sin incluir el peso del marlo), se estimó el rendimiento en cada tratamiento.

Rto: plantas/ha. x espigas/planta. x peso de los granos/espiga

** Peso seco de la raíz:*

Se realizó de igual manera que en v10.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Infostat, con una (p=0,05) con el cual se realizó ANOVA y se compararon los promedios con el test de Duncan.

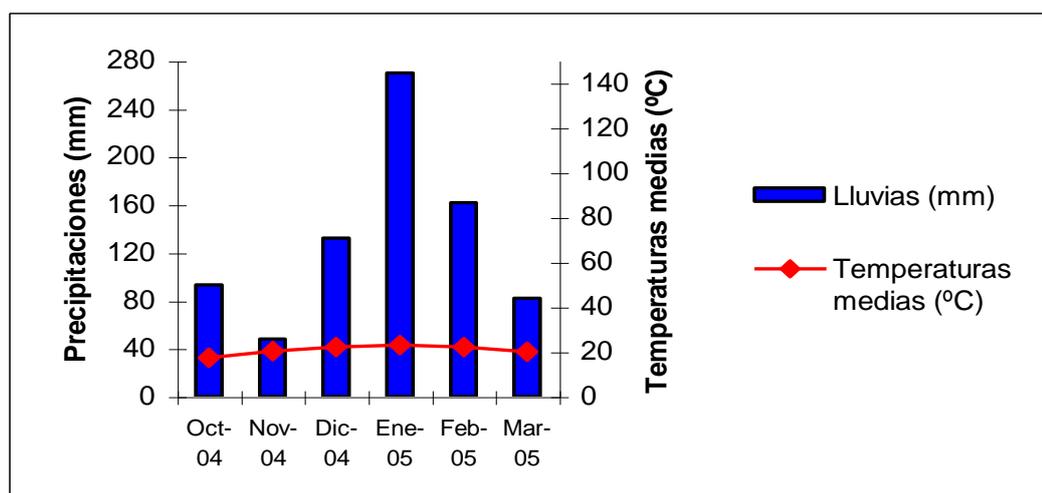
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de *Azospirillum brasilense* en las semillas luego de la inoculación fue de $1,3 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (ufc)/semilla, no presentando diferencias entre los tratamientos en cuanto al número de bacterias adheridas/semilla. Esta similitud no se manifestó en la mayoría de los parámetros evaluados durante el desarrollo del ciclo del cultivo; este valor se encuentra dentro de los valores normales, para el caso de los inoculantes utilizados, los cuales contenían 1×10^9 ufc/ml de inoculante, según marbete.

Considerando las condiciones ambientales durante el ciclo del cultivo (*Fig. 1*) se puede observar que la disponibilidad de agua durante el ciclo fue suficiente, ya que las precipitaciones alcanzaron los 787 mm. Este valor es mayor a los 550-600 mm necesarios para cubrir los requerimientos del cultivo en un régimen hídrico no limitante. Teniendo en cuenta que la floración en el híbrido utilizado se dio entre el 7-10 de enero de 2005 y que el período crítico del maíz comienza 20 días antes de floración y se extiende 20 días luego de la misma, se puede decir que el cultivo pudo expresar su potencial de rendimiento ya que la condiciones hídricas (Enero, 270 mm) y térmicas (Enero, 22,9°C) en dicho periodo fueron la adecuadas.

El cultivo sufrió una granizada en el estadio de seis hojas (v6) lo que hizo retrasar la toma de muestra en ese estadio hasta diez hojas (v10).

Fig. 1: Condiciones ambientales durante el ciclo del cultivo. Datos mensuales



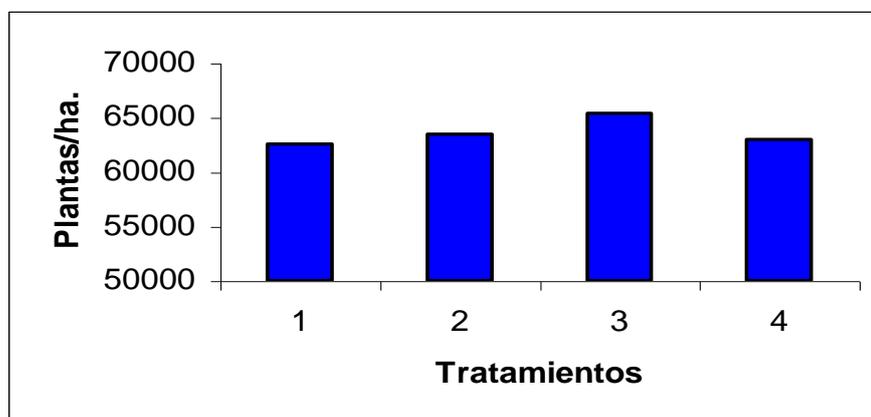
Fuente: Cátedra de Agrometeorología, F.A.V. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Determinaciones en diez hojas (v10)

Para lograr una máxima producción de materia seca el maíz debe captar el 95% de la radiación solar incidente; cuanto antes alcance el cultivo el área foliar necesaria para captar la máxima radiación y más tiempo se mantenga, mayor será la producción de materia seca y de granos. La densidad (plantas/ha.) juega un importante rol en la captación de radiación, agua y nutrientes; motivo por el cual es muy importante una densidad óptima. En bajas densidades, el cultivo no puede compensar un menor número de plantas con un mayor crecimiento o ramificaciones como ocurre en otros cultivos, la soja por ejemplo (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

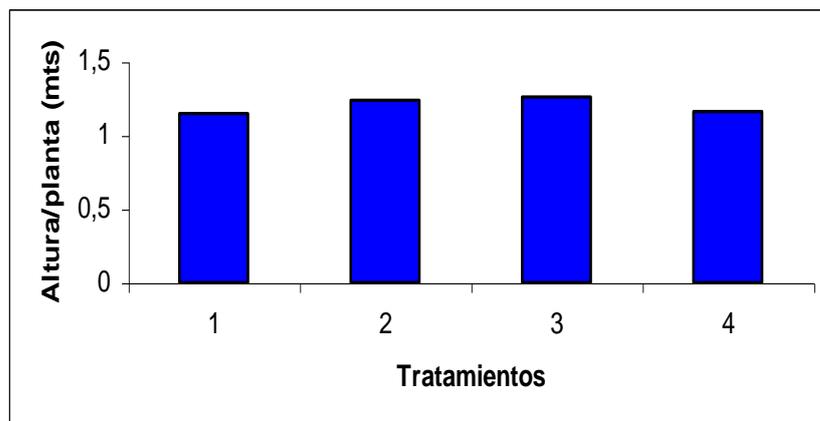
En la densidad de plantas/hectárea en v10 (Fig. 2), no hubo diferencias entre los distintos tratamientos, alcanzando una densidad promedio de 63.363,5 plantas/ha. Este valor muestra un stand de plantas/ha del 11% menos de la cantidad de semillas sembradas (71.500 semillas/ha.). Esto puede ocurrir por problemas en la siembra, debido que el porcentaje de germinación no es del 100%, lo que determina una disminución en la cantidad de plantas logradas. En cuanto a la diferencia entre los tratamientos se observa un mayor stand de plantas en todos los tratamientos inoculados II (62.562), III (65.350) y IV (62.980) plantas/ha. respectivamente comparados con el testigo (I) que fue de 62.562.

Fig. 2: Densidad (plantas/hectárea) en v10, según distintos tratamientos.



La altura de las plantas en v10 (Fig. 3), no fue diferente en los distintos tratamientos evaluados, el promedio de los tratamientos inoculados fue de 1,22 mts. aunque se observa que en todos los tratamientos inoculados II (1,24 mts), III (1,26 mts), IV (1,16 mts) fueron superiores al testigo (1,15 mts), debido al efecto de *Azospirillum brasilense*, el cual actuó promoviendo el crecimiento; posiblemente sino hubiera sido afectado el cultivo por el granizo en el estado de seis hojas, hubiera habido diferencias entre los tratamientos.

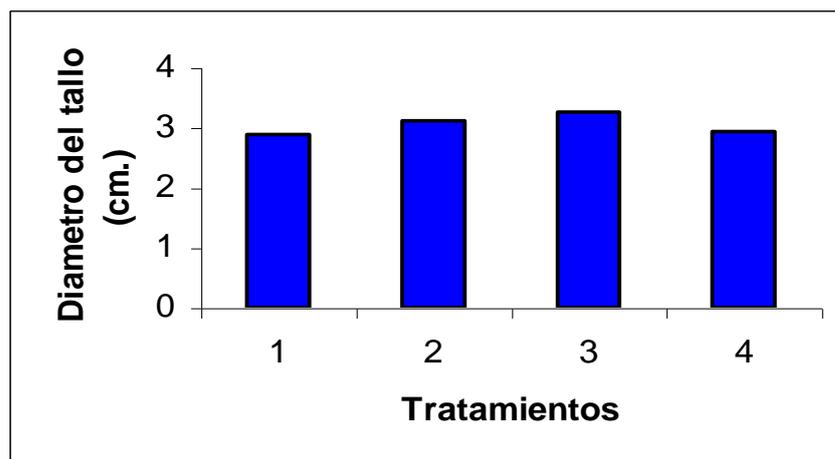
Fig. 3: Altura/planta en v10, según distintos tratamientos



Esto coincide con lo demostrado por Lucangelli y Bottini (1996), que observaron un incremento en el largo de los entrenudos en maíz y arroz cuando se inoculó con microorganismos fijadores de vida libre.

El diámetro del tallo en v10 (Fig. 4), no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, el promedio de los tratamientos inoculados fue de 3,09 cm. aunque en los tres tratamientos inoculados II (3,11 cm.), III (3,25 cm.), IV (2,93 cm.) con las distintas formulaciones fueron mayores al testigo (2,88 cm.), lo que pone en evidencia la promoción del crecimiento que tiene *Azospirillum* sobre el cultivo de maíz.

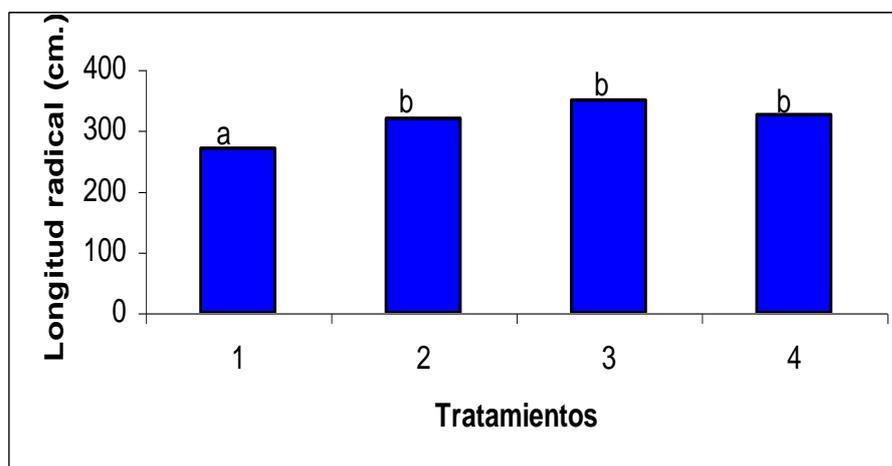
Fig. 4: Diámetro del tallo/planta en v10, según distintos tratamientos.



En cuanto a la longitud radical en v10 (Fig. 5), se observó que hay diferencias notorias entre el tratamiento sin inocular y el resto de los tratamientos inoculados, esto coincide con lo expresado por Bouillant M., (1997) quien asegura que la inoculación lleva a un aumento significativo del sistema radical; algo similar demostró Okon Y., (1998), cuando

inoculó semillas de trigo con *Azospirillum* y encontró un marcado efecto en la proliferación de pelos radicales, lo que proporcionó un mejor anclaje por parte del sistema radical. Esto concuerda con lo observado por Brown, (1974) quien afirma que la síntesis de auxinas y giberelinas por microorganismos, incrementa el desarrollo de pelos radicales.

Fig. 5: Longitud radical/planta en v10, según distintos tratamientos

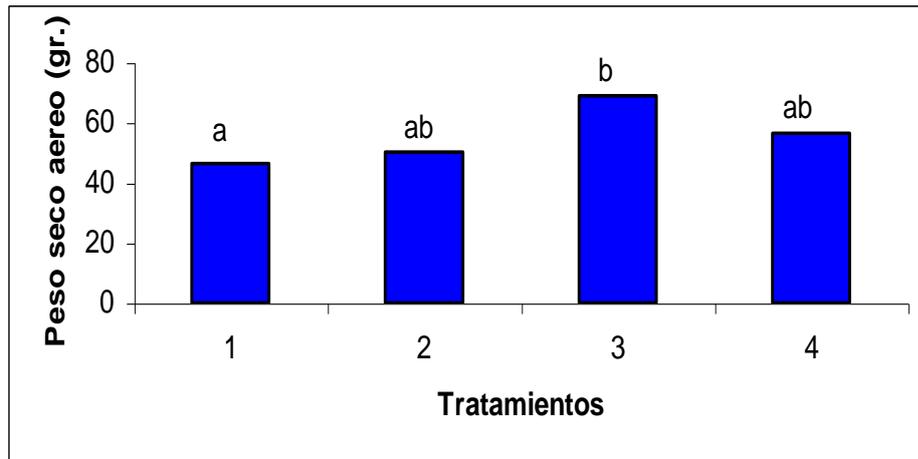


Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El promedio de la longitud radical para los cuatro tratamientos fue de 317,5 cm. El promedio tratamientos inoculados (333,3 cm.) fueron superiores en un 23,4% respecto al testigo (270 cm.) aunque entre ellos no presentaron diferencias significativas; pero hubo diferencias de todos los tratamientos inoculados con el testigo.

En cuanto al peso seco aéreo en v10 (Fig. 6) se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos evaluados. En todas las parcelas inoculadas (58,5 gr. promedio) fue superior en un 26% al testigo (46,42 gr.). Esto coincide con lo observado por Tien *et al.*, (1979) quien determinó que la inoculación con *Azospirillum* tuvo efectos favorables sobre el crecimiento de mijo, al igual que Bellone *et al.*,(1999) que registró en maíz mejoras en los parámetros de la parte aérea. Se destaca en esta diferencia el tratamiento III (68,95 gr.) en un 48,5% superior al testigo y un 29,4% respecto al promedio de los tratamientos II y IV (los que no presentaron diferencias entre ellos, pero si del testigo), la diferencia que se presenta entre los tratamientos también se explica por una mayor altura/planta (Fig. 3), diámetro del tallo (Fig. 4), como así también una mayor longitud radical (Fig. 5) lo que le permitió una mayor superficie de absorción de agua y nutrientes.

Fig. 6: Peso seco aéreo/planta (gr.) en v10, según distintos tratamientos.



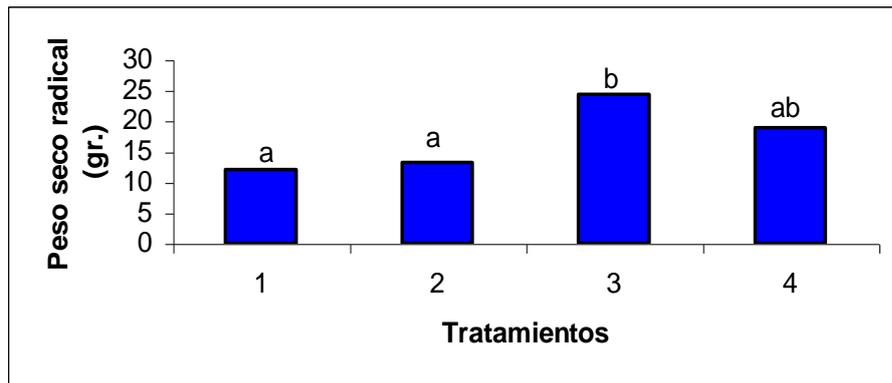
Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En cuanto al peso seco radical/planta en v10 (Fig. 7), no se observaron diferencias entre el testigo y el tratamiento II (13,25 gr.), en cambio se observaron diferencia significativa entre el tratamiento I (12,03 gr.) y el tratamiento III (24,3 gr.) siendo este último superior al tratamiento IV (18,9 gr.). El promedio de los tratamientos inoculados (18,8 gr.) fue superior en un 56,2% al tratamiento no inoculado (12,03 gr.), esto coincide con Steenhoudt and Vanderleyden (2000) quien afirma que la producción de fitohormonas tales como auxinas, citocininas y giberelinas por las PGPRs como *Azospirillum*, incrementan el número de raíces laterales y pelos radicales, lo que hace aumentar notablemente la superficie de la raíz favoreciendo una mayor absorción de nutrientes.

Una de las posibles causas de la elevada diferencia en el peso seco de raíces, entre el tratamiento I y III, es que este último además del inoculó con *Azospirillum brasilense*; contaba con un protector de bacterias el cuál le proporciona a la bacteria un ambiente mas propicio alrededor de la semilla, que mejora la interacción semilla-bacteria, beneficiando el crecimiento de la planta, tanto aéreo como radical.

Las diferencias en el peso seco radical de los tratamientos inoculados (Fig. 7) en comparación con el testigo guardan en alguna medida una relación con la longitud de raíces/planta (Fig. 5), sólo que para el caso de longitud radical los que más aporta para este valor son los pelos radicales y en el peso radical lo que más influye son las raíces de mayor tamaño y en menor medida los pelos radicales, en base a esto se deduce la no concordancia directa entre los tratamientos inoculados para longitud radical/planta y peso seco radical/planta.

Fig. 7: Peso seco radical/planta (gr.) en v10, según distintos tratamientos.



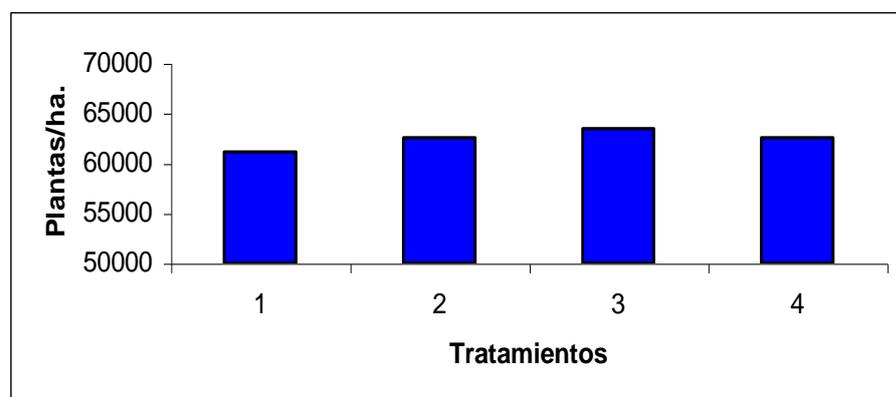
Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Determinaciones en cosecha

La densidad (plantas/ha.) a cosecha es un componente directo del rendimiento del cultivo, por tal motivo es de suma importancia llegar a cosecha con un stand adecuado de plantas/ha, debido a que el mismo va a incidir directamente en los rendimientos. También es un factor importante una uniformidad en la distribución entre plantas ya que la misma va a determinar una menor competencia intraespecífica y será mas competitiva con respecto a malezas.

Se observa que la densidad de plantas/ha. a cosecha (Fig. 8) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, aunque en todos los tratamientos inoculados (62.860,4 plantas/ha. promedio) fue superior al testigo (61.132,5 plantas/ha.).

Fig. 8: Densidad a cosecha (plantas/ha), según distintos tratamientos

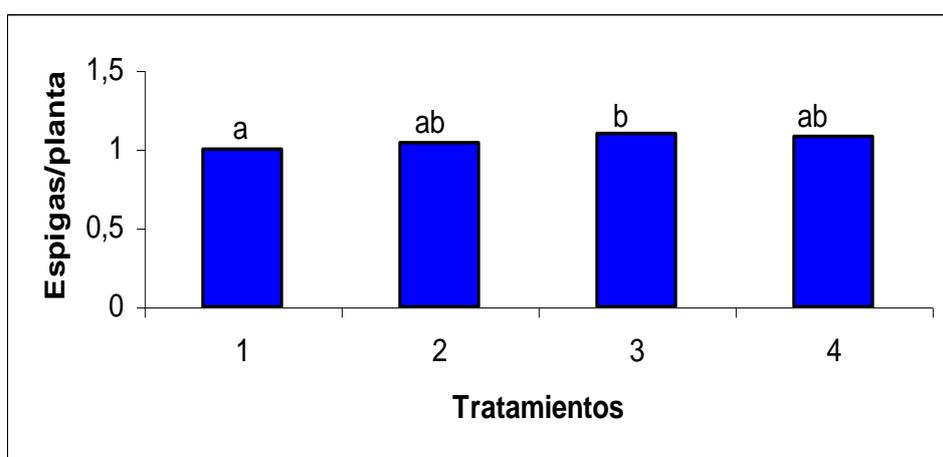


De los tratamientos inoculados el tratamiento III, es el que presentó mayor densidad de plantas a cosecha (63.456,25), estos valores concuerdan con las densidades observadas en el estado de diez hojas (Fig. 2). Además se puede determinar que desde el

estadio de diez hoja hasta cosecha, hubo una disminución de la densidad, fundamentalmente debido al vuelco en las plantas, ocasionado por el viento momentos previos a la cosecha.

La cantidad de espigas/planta a cosecha (Fig. 9) es otro de los componentes directos del rendimiento del maíz. La prolificidad (espigas/planta) es una característica que depende del híbrido utilizado; además esta característica depende de las condiciones en que se encuentre el cultivo, ya que si la densidad es menor a la adecuada y/o una distribución entre plantas no óptima; las plantas con menor competencia tienen tendencia a emitir más de una espiga.

Fig. 9: Número de espigas/planta, según distintos tratamientos



Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

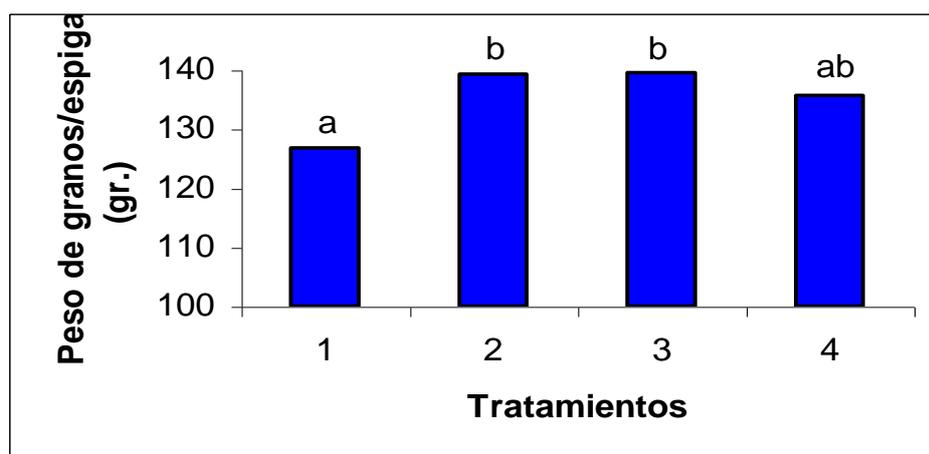
Se puede observar que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo en todos los casos inoculados (promedio 1,07 espigas/planta) superiores al testigo (1 espiga/planta), destacándose aquí en tratamiento III (1,1 espigas/planta) lo que determina un 10% más de espigas/planta respecto al testigo lo que incidió directamente en los rendimientos (Fig. 12). Recordemos que este tratamiento (III) el inoculó de *Azospirillum brasilense* era acompañado con un protector el que indirectamente mejoró la interacción planta (raíz) bacteria, por lo tanto promocionó los efectos sobre el crecimiento. El tratamiento II (1,04 espigas/planta) y IV (1,08 espigas/planta) presentaron diferencias con el testigo, pero no fueron significativas entre ellos. Estas diferencias en cuanto al testigo con el resto pone en evidencia los efectos favorables sobre el crecimiento dado por *Azospirillum*. Estos valores se correlacionan con la longitud radical (Fig. 5), peso seco aéreo (Fig. 6) y el peso seco radical (Fig. 7).

El peso de granos/espigas (Fig. 10) es otro de los componentes directos del rendimiento, a mayor peso por espiga el rendimiento es mayor, este valor está determinado por el número de granos/espiga y el peso individual de los mismos.

Se puede observar que hay diferencias entre los distintos tratamientos, siendo en los tres tratamientos inoculados (138,1 gr.) un 8,8% superiores al testigo (126,83 gr.). Esto coincide con lo observado por Fulchieri y Frioni (1994), en un ensayo a campo en la región, quien encontró que la inoculación en maíz con *Azospirillum* incremento un 50% de peso seco del grano, aumentó al doble el número de granos en la espiga y determinó también un mayor volumen en la raíz. En cuanto a la diferencia entre los tratamientos, se puede observar que el III (139,5 gr.) y el II (139,3 gr.) no presentaron diferencias y el tratamiento IV (135,7 gr.) se comportó de manera intermedia entre el tratamiento I (testigo) y el II y III.

Las diferencias entre los tratamientos inoculados en el peso de las espigas no es del todo notoria debido a que los tratamiento que tenían más de una de espigas/planta (Fig. 9), presentaban una espiga normal y la otra un tanto menor a lo normal. Por lo cual los tratamientos con mayor prolificidad (espigas/planta) generalmente el promedio del peso de granos/espiga no es tan elevado, un comportamiento similar se observó al medir longitud de espigas y diámetro de las mismas.

Fig. 10: Peso de granos/espiga, según distintos tratamientos



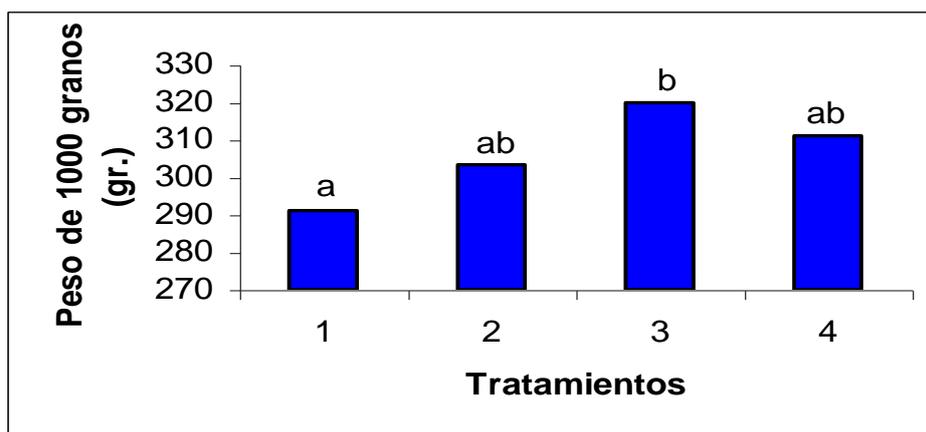
Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Otra de las variables que influye directamente sobre el rendimiento es el peso de los granos. Para este caso se midió el peso de 1000 granos (Fig. 11), el cuál presentó diferencias significativas entre los tratamientos, siendo en todos los tratamientos inoculados (311,4 gr.) superior en un 7% respecto al testigo (291 gr.); esto coincide con el resultado de Fulchieri y Frioni (1994), quien observó que la inoculación en maíz con *Azospirillum* incrementó un 50% el peso seco de granos.

Entre los tratamientos inoculados también se observaron diferencias significativas, siendo el tratamiento III (320 gr.) superior al resto; destacándose en un 9,96% sobre el testigo. Cabe recordar que dicho tratamiento; además del inoculante, fue tratado con el

protector de bacteria cuando se inoculó, lo que influyó marcadamente sobre el rendimiento. Los tratamientos II (303,25 gr.) y IV (311 gr.) se diferenciaron del testigo, pero no presentaron diferencias significativas entre ellos. Esto último pone en evidencia que la inoculación en el caso del tratamiento II tuvo igual efecto sobre el peso de granos que la inoculación (50% líquido y 50% sólido), en el tratamiento IV.

Fig. 11: Peso de 1000 granos (gr.), según distintos tratamientos.



Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El rendimiento (Fig. 12), es el parámetro que determina el empleo de una nueva tecnología. En el cultivo de maíz existe un período crítico en el cual se define el número de granos producidos y por lo tanto el rendimiento; dicha etapa se inicia unos 20 días antes de floración y se prolonga 20 días después de la misma; por tal motivo el manejo agronómico debe apuntar a que el cultivo transcurra en dicho período en condiciones óptimas para maximizar el rendimiento (Álvarez C. y Mulin E., 2004).

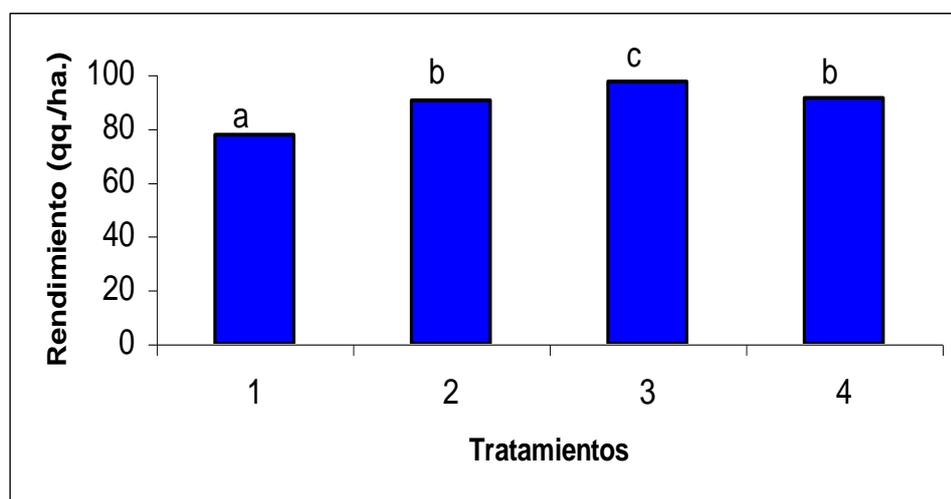
Se puede observar las condiciones climáticas durante el período crítico del cultivo (Fig. 1), y concluir diciendo que no hubo limitantes ya que se dieron aquí las mayores precipitaciones y temperaturas, que fueron óptimas para su desarrollo permitiendo al híbrido utilizado expresar su potencial.

Se pudo cuantificar que en todos los tratamientos inoculados (promedio 92,3 qq./ha.) los rendimientos fueron superiores en un 19,9% al testigo sin inocular (77,5 qq./ha.) esto coincide con lo observado por Caballero Mellado, (2002) que en un ensayo de trigo a campo inoculado con *Azospirillum*, los rendimientos incrementaron con respecto al control no inoculado en un rango de 23 a 63 %. Este mismo autor en ensayos realizados en 1999 en una extensa área inoculada con *Azospirillum brasilense* en los cultivos de sorgo, cebada y trigo demostró incrementos de aproximadamente 26% en los rendimientos cuando se implantaron en suelos pobres y con un bajo aporte de nitrógeno.

En maíz Dobbelaere *et al.*,(2001) encontró que la inoculación con *Azospirillum brasilense* incremento en el rendimiento de las cosechas de hasta un 13%.

Entre los tratamientos inoculados, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos II (90,3 qq./ha.) y IV (91,3 qq./ha.) lo que pone de nuevo en evidencia que la mezcla de inoculante formulación líquida y sólida en el tratamiento IV no es conveniente debido a su escasa diferencia con el tratamiento II, como así también sus dificultades operativas para inocular la semilla al momento de la siembra, en el caso del tratamiento III que fue el que casi siempre arrojó los mayores valores en todos los parámetros evaluados, fundamentalmente las variables que intervienen directamente sobre el rendimiento tales como; plantas/ha (*Fig. 8*), espigas/planta (*Fig. 9*), peso de granos/espiga (*Fig. 10*); también logró el mayor rendimiento (97,3 qq./ha.), superando al testigo en un 25,5%.

Fig. 12: Rendimiento (qq./ha), según distintos tratamientos

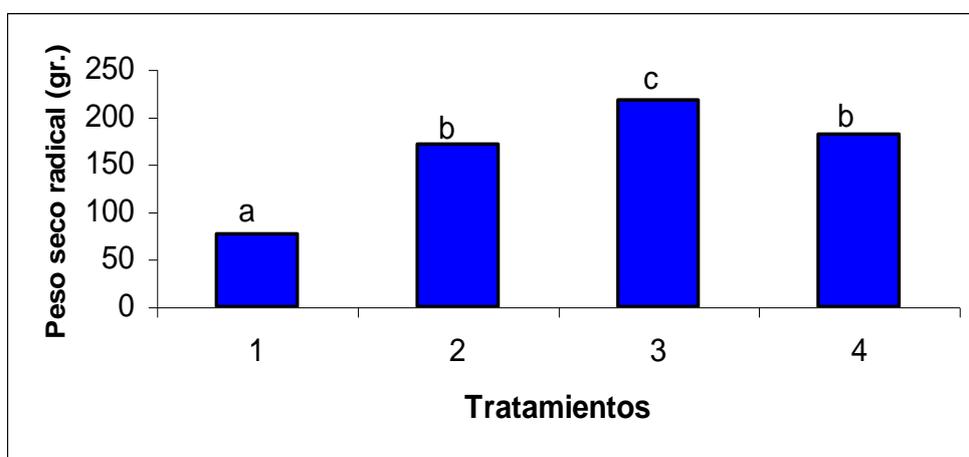


Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

El peso seco de la raíz (*Fig. 13*) a cosecha, es un dato que nos permite evaluar el efecto de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo. Todos los tratamientos inoculados, (cuyo promedio 190 gr.) superaron ampliamente al testigo (76,3 gr.); el mismo efecto fue observado en el peso radical en el estadio de diez hojas (*Fig. 7*). Estos resultados concuerdan con Bouillant (1997), quien determinó que la inoculación lleva a un aumento significativo del sistema radical, induce a la resistencia de agentes patógenos y produce una mayor absorción de nutrientes; además inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, sobre todo de la raíz, algo similar fue lo expresado por Steenhoudt and Vanderleyden (2000) y Bellone *et al.*, (1999) que en ensayos de maíz, registraron mejoras en el peso del sistema radical y en los parámetros de la parte aérea. Este mayor volumen y peso radicular observado en los

tratamientos inoculados le permitió a la planta un mejor anclaje, incremento en la toma de agua y captación de nutrientes, junto con una mayor producción de hormonas que promovieron el crecimiento tanto radical como aéreo lo que se tradujo en los tratamientos inoculados en mayores rendimientos (*Fig. 12*). Se observa que hay diferencias entre los tratamientos inoculados, el tratamiento III es el que presentó un mayor peso seco radical (218 gr.) y este tratamiento se vio beneficiado en casi todos los parámetros evaluados. La diferencia con los otros tratamientos inoculados es la incorporación al inoculó de un protector de bacterias que permitió, que la misma pudiera expresar su potencial, al estar protegida de la variaciones de temperatura, humedad, oxígeno, pH entre otros cambios que se producen en el suelo cuando se realiza la siembra. Estos resultados que expresó el tratamiento III en cuanto al peso seco radical se vieron reflejados en el rendimiento y parámetros que lo definen como así también en el resto de los componentes que lo determinan indirectamente. Esto nos estaría dando la pauta que para realizar inoculación en maíz en la zona de Río Cuarto sería de vital importancia, para obtener óptimas respuestas a dicha técnica, usar un inoculante que posea un protector de bacterias para que las mismas puedan expresar su máximo potencial en la interacción con el cultivo.

Fig. 13: Peso seco radical (gr.)/plantas, según distintos tratamientos.



Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En cuanto al tratamiento II (170,8 gr.) y IV (182 gr.) presentaron diferencias significativas con el testigo, pero no entre sí, por lo que se pone de manifiesto que la inoculación formulado con un 50% del inoculante como líquido y el 50% restante como sólido en tratamiento (IV) aplicado en mezcla no sería una práctica conveniente en un cultivo de maíz a campo, por los resultados aquí obtenidos.

CONCLUSIÓN

* El recuento del número de bacterias adheridas a la semilla en el momento de la siembra no presentó diferencias significativas entre los tratamientos realizados y esa similitud manifestó diferencias en los parámetros evaluados durante el ciclo del cultivo.

* La densidad de plantas/ha. en el estadio de diez hojas (v10) no mostró variación entre los tratamientos.

* En el mismo estadio la longitud radical y el peso seco aéreo presentaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados en relación al testigo; el peso seco aéreo también presentó diferencias significativas entre tratamientos inoculados, un similar comportamiento manifestó el peso seco radical.

* La densidad de plantas/ha. a cosecha no presentaron diferencias entre los distintos tratamientos.

* De los componentes del rendimiento evaluados; el rendimiento (qq./ha.), el número de espigas/planta, peso de granos/espiga y peso de 1000 granos presentaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y el testigo, como así también dentro de los tratamientos inoculados.

* La mezcla de un inoculante formulación líquida 50% y 50% sólida no evidenciaron diferencias significativas en el crecimiento respecto al resto de los tratamientos inoculados.

* Podemos decir que: el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz a campo favoreció el crecimiento y desarrollo del cultivo lo que se manifestó en el rendimiento.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ C. y MULIN E., 2004. **El gran libro de la siembra directa**. Clarin. Cap. 1 (pag. 3); Cap. 3 (pag. 34); Cap. 15 (pag. 166-189).
- BARBIERI, P., ZANELLI, GALLI, E. and ZANETTI, G. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* sp. and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiol. Lett.** 36: 87-90.
- BASSHAN, Y.; LEVANONY, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology; *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Can. J. Microbiol.** 36:591-608.
- BELLONE C. H.; CARRIZO DE BELLONES S.; JAIME M.A.; MANLLA A.M. y MONZON DE ASCONEGUI M.A.: 1999. Respuesta de dos cultivares de maíz a la inoculación con distintos aislamientos de *Azospirillum* spp. **II Reunión Científico Técnica de Biología de suelo-Fijación del Nitrógeno**. Universidad Nacional de Catamarca, Facultad de Ciencias Agrarias.
- BERINGER, J.E.; 1984. The Significance of Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant Production. **Plant Sci.** 2:269-286.
- BHATTARAI T. and HEES D. 1993. Yield responses of nepalese spring wheat (*triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation whit azospirillum spp. of nepalase origin. **Plant soil** 151: 67-76.
- BOHOOL, B.; 1990. Introduction to nitrogen fixation in agriculture and industry : contribution of BNF to sustainability of agriculture. **In Nitrogen Fixation : achievements ans objectives**. Edited by P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey and W.E. Newton. Chapman and Hall, New York. pp. 613-616.
- BOUILLANT, M., 1997. Inhibition of Striga seed germination with sorghum growth promotion by soil bacteria. **Sciences de la Vie**. Vol. 320, no.2,p. 159-162.
- BOWEN, G.D. and ROVIRA, A.D. ; 1991. The rizosphere, the hidden half. pp.661-669. In :Y. waisel, A. Eshel and U. Kafkafi (eds). **Plant roots, the hidden half**. Marcel Dekker, New york.
- BRIAT, J.F.; 1992. Iron assimilation and storage in prokaryotes. **J. Gen. Microbiol.** 138 : 2475-2483.
- BROWN, ME.; 1974. Seed and root bacterization. **Annual Rev. of Phytopathology** 12 : 181-197.
- CABALLERO MELLADO N.; 2002. publicado en **actas 12th Internatinalo Congress on Nitrogen Fixation**. 12-17 de Septiembre de 1999, Parana, Brasil.-

- CANTERO A. y CHOLAKY C.; 1997. Evaluación de tierras. Apunte de uso y Manejo de Suelos año 2000. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina.
- CASTIGNETTI, D. and SMARRELLI, J. JR.; 1986. Siderophes, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. **FEBS Lett.** 209: 147-151.
- CATTANEO, S.H.; CREUS, C.M.; BARIFFI, H.; SUELDO. R.J. y BARASSI. C.A.; 1996. Estudios a campo sobre la acción de *Azospirillum* en trigo sometido a estrés hídrico, II. Rendimiento y sus componentes. En: **Actas XXI Reunión Nacional de Fisiología Vegetal**. Mendoza. Argentina. 296-297 p.
- CHABOT, R., ANTOUN, H. and CESCAS, M.P.; 1993. Stimulation de croissance du maïs et de la laitue romanie par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.** 39 : 941-947.
- CLELAND, R.E.; 1990. Auxin and cell elongation. In Plant Hormones and their role plant growth and development. Edited by P.J. Davies. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. pp. 132-148.
- DOBBELAERE, S. CROONENBERGHS, A., THYS, A., PTACEK, D., VANDERYDEN, J., DUTTO, P., LABANDERA-GONZALZ, C., CABALLERO-MELLADO, J., AGUIRRE, J.F., KAPULNIK, Y., BRENER, S., BURDMAN, S., KADOURT, D., SARIG., and OKON, Y.2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Plant Physiol.** 28:871-879.
- ELMERICH, C., 1984. Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. **BioTechnology**, 2: 967-978.
- FERRERA-CERRATO, R., 1995. Efecto de la Rizosfera. Pp. 36-52. In:R. Ferrera- Cerrato y J. Perez M (eds). **Agro microbiología**. Elemento Util en la agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- FRIONI, L., 1999. **Procesos microbianos**. Tomo II. Ed. Fund. UNRC. ISBN: 950-665-109.
- FROMMEL, M.L., NOWAK, J. and LAZAROVITS G., 1991. Growth enhancement and development modifications of *In vitro* grown potato (*solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas sp.* **Plant Physiol.** **96**. 928-936.
- FULCHIERI M. and FRIONI L., 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. **Soil Biol. Biochem** **26**, 921-923.
- GLICK, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. microbiol.** 41: 109-117.

- HAGEN, G., 1990. The control of gene expression by auxin. **In Plant hormones and their role in plant growth and development.** Edited by P.J. Davies. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. pp. 132-148.
- HORNBY, D., 1990. Root disease, pp. 233-528. In: J.M. Lynch (ed). **The rhizosphere.** Wiley, Chichester, U.K.
- KAPULNICK, Y., 1991. **Plant growth-promoting rhizobacteria,** pp. 717-729. In: Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi (eds). *Plant roots, the hidden half.* Marcel Dekker, New York.
- KLOEPPER, J.W. and SCHROTH M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Angers. 879-882.
- KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R. and SCHROTH, M.N., 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. **ISI Atlas Sci. Anim. Plant. Sci.** Pp. 60-64.
- KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R. and ZABLOTOWICZ, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnol.** 7: 39-43.
- KUCEY, R.M.N., JANZEN, H.H. and LEGGET, M.E., 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Adv. Agron.** 42: 199-228.
- LIPPAMN, B., LEINHOS, V. and BERGMANN, H., 1995. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I. Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. **Angew Bot.** 69: 31-36.
- LUCANGELLI, C. and BOTTINI, R., 1996. Reversion of dwarfism in dwarf-1 maize (*Zea mays* L.) and dwarf-x rice (*Oryza sativa* L.) mutants by endophytic *Azospirillum* spp. **Biocell** 20 (3). 221-226.
- LYNCH, J.M. 1990c Beneficial interactions between microorganisms and roots. **Biotech. Adv.** 8: 335-346.
- LYNCH, J.M. 1990b Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil, pp. 1-10. In: Lynch, J.M. (ed.). **The rhizosphere.** Wiley, Chichester U.K.
- LYNCH, J.M., 1990a. **The rhizosphere.** Ed. Wiley, Chichester Interscience Chichester - England
- NEILANDS, J.B. and LEONG, S.A., 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 37: 187-208.
- NEWMAN, E.I., 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. **J. Appl. Ecol.** 3: 139-145.
- O'SULLIVAN, D.J. and O'GARA, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiol. Rev.** 56: 662-676.

- OKON, Y., 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends Biotechnol.** 3:223-228.
- OKON, Y., and HADAR, Y., 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. **CRC Critical Rev. In Biotechnol.** 6: 61-85.
- OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ. C.A., 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.**, 26: 1591-1601.
- OKON, Y.,1998. In Nitrogen Fixation Hundred years after 741-746.
- OLMEDO C., THUAR, A., RIBERI E. y AVANZINI G.,2002. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en un cultivo de trigo a campo. **XXI Congreso Argentino de la Ciencia de suelo.** Libro resúmenes pag. 37.
- PAAU, A.S., 1991. Improvement of *Rhizobium* inoculants by mutation, genetic engineering and formulation. **Biotechnol. Adv.** 9: 173-184.
- PEROTTI E.B.R. y PIDELLO A., 1999. **II Reunión Científico Técnica de Biología del suelo Fijación Biológica del Nitrogeno.** F.C.A. Universidad Nacional de Catamarca.
- RICHARDSON, A.E., 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In **Soil Biota. Management in sustainable Farminig Systems.** Ed. C.E. Pankhurst. Pp. 50-62.
- RODRIGUEZ CACERES E.D., DI COCO C. y PACHECO BASURCO J.C., 1996. Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en un suelo de la provincia de la Pampa, Argentina. **Ciencia del Suelo** 14: 110-112.
- RODRIGUEZ, M., M.N., 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. Pp. 105-126. In: R. Ferrera-cerrato y J. Pérez. M. (eds). **Agro microbiología.**
- RUIZ R.A.; SANCHÉZ SERRA A.P.; GARCIA I.E. y SATORRE E.H. 1996. Actas de la XXI Reunion Argentina de Fisiología Vegetal. Pag. 310-311.
- SEILER R., FABRICIUS R., ROTONDO V. y VINOCUR M., Catedra de agrometeorologia Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto; Datos 2004/2005.
- SHARMA, P.K. KUNDU, B.S. and DOGRA, R.C., 1993. Molecular mechanism of host specificity in legume-*Rhizobium* symbiosis. **Biotechnol. Adv.** 11: 741-779.
- STEENHOUDT, O. and VANDERLEYDEN, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associate with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 487-506.
- TANG, W.H., 1994. Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheat bligh of rice. **In Improving plant productivity with rhizosphere bacteria.** Edited by M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen. Commonwealth Scientific and industrial Research Organisation. Adelaide, Australia. pp. 267-268.

- TIEN T.M., GASKINS M.H. and D.H., HUBBEL., 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl. Environ. Microbiol.** 37: 1016-1024.
- VAN LOON, L.C. KABER P.A.H. and PIETERSEN., C.M.J., 1998. Systematic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Ann. Rev., Phytopathol.** 3: 453-483.
- VAN PEER R. and SCHIPPERS, B., 1989. Plant growth responses to bacterization with selectes *Pseudomonas spp.* strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Can. J. Microbiol.** 35: 456-463.
- VANCE, C.P., 1983. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? **Annu. Rev. Microbiol.** 37: 399-424.
- VOISARD, C., KEEL, C., HAAS, D. and DEFAGO, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO J.** 8: 351-358.