

Certificado de aprobación del trabajo final presentado

El presente trabajo final se realizó en la orientación Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto para optar por el título de Ingeniero Agrónomo.

Alumno: Marcos Gabriel Ligorria

Director: Dr. Javier Alberto Andrés

Co-director: Dra. Carmen Ana Olmedo

Aprobado por el jurado

DEDICATORIA

*Con profundo cariño y sinceridad
dedico este logro a quienes me dieron la vida
y me enseñaron a valorarla y transitarla con pasión y esperanza,
a todos los que generaron oportunidades para
que progresara en mi formación profesional y crecimiento personal
y, por supuesto,
a mi hijo Joaquín y a su flamante mamá.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud

a quienes hicieron posible la realización de este trabajo.

A los doctores Javier Andrés y Carmen Olmedo,

por su permanente disponibilidad y el profesionalismo con que me dirigieron,

a mis padres y a mi familia, por su incondicional apoyo y su permanente empuje.

ÍNDICE

RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
Algunas consideraciones conceptuales	12
Hipótesis y objetivos del trabajo	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Cepas bacterianas	16
Material vegetal	16
Ensayo de Co-inoculación en plantas a nivel invernáculo	16
Ensayo de Co-inoculación en condiciones de campo	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Experiencia de co-inoculación en invernáculo	21
Experiencia de co-inoculación en condiciones de campo	24
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la inoculación mixta con las cepas *Bradyrhizobium* sp. C145 y *Bacillus* R19 sobre la fijación simbiótica del nitrógeno y otros aspectos fisiológicos del crecimiento del maní. El estudio se implementó en dos etapas. La primera fase de la coinoculación se llevó a cabo en los invernáculos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC, donde se empleó como soporte una mezcla de tierra, arena y perlita (2:1:1). La segunda fase de la experiencia se desarrolló en condiciones de campo, donde las cepas empleadas se formularon como inoculantes sólidos, utilizando turba estéril como soporte. Los resultados muestran efectos favorables de la coinoculación con C145-R19 en los siguientes parámetros evaluados en la promoción del crecimiento del cultivo del maní: número de nódulos por planta, peso seco y longitud de raíces y rendimiento.

Palabras claves: *Bradyrhizobium* – *Bacillus* – Inoculación – Maní – Promoción del crecimiento.

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the effects of the mixed inoculation with *Bradyrhizobium* sp. C145 and *Bacillus* R19 on the symbiotic fixation of nitrogen and other physiological aspects of peanut growth. The study was implemented in two stages. The first stage of the coinoculation was carried out in the greenhouses of the Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC. A mixture of earth, sand and perlite (2: 1: 1) was used as support for the plant growth. The second phase of the experience was developed in field conditions, where the used strains were formulated like solid inoculants, using sterile turf as support. The results shows favorable effects of the coinoculation with C145-R19 upon the peanut growth in different parameters evaluated: number of nodules per plant, dry weight and length of roots and yield.

Key words: *Bradyrhizobium* – *Bacillus* – Inoculation – Peanut - Promotion of the growth.

INTRODUCCIÓN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los cultivos oleaginosos de origen sudamericano con mayor impacto a nivel mundial. Actualmente, es una de las leguminosas de grano de mayor difusión en el mundo, cultivado prácticamente en casi todos los lugares cálidos del planeta (Monge, 2006).

Desde el punto de vista de la alimentación humana, el maní figura entre los veinte cultivos más importantes del mundo. No obstante su amplia difusión como alimento básico y su indiscutible importancia comercial y nutritiva, autores como Williams (2006, citado por Monge, 2006) consideran que en la actualidad el maní enfrenta desafíos fuertes y cambiantes de producción y mercado, lo que puede contribuir a acrecentar el interés de investigadores por mejorar su producción, calidad y rendimiento.

En la República Argentina se observa un incremento sostenido del cultivo del maní durante la última década. En tal sentido, el maní se presenta como uno de los cultivos de mayor importancia económica en la provincia de Córdoba. Así, en la citada provincia el área sembrada alcanzó las 215.000 ha en la cosecha del período comprendido entre los años 2004-2005, lo que representa más de un 90% de la superficie sembrada con maní en el país. El área de producción ha ocupado tradicionalmente la zona central de la provincia (Departamento de Río Segundo, Tercero Arriba y norte de Juárez Celman), desplazándose luego al sur, hacia las áreas centro-sur de los Departamentos Gral. San Martín y Juárez Celman y centro-norte de Río Cuarto (Gorgas *et al.*, 1997).

El cultivo de maní es susceptible a numerosas enfermedades, las cuales son consecuencia de la confluencia entre un cultivar susceptible, un organismo patógeno (hongo, bacteria o virus) y un ambiente favorable. Dentro del ambiente, incluimos no sólo al clima, sino también al sistema productivo desarrollado por el hombre (March y Marinelli, 1998).

Los fungicidas constituyen el medio más efectivo para el control de enfermedades, aunque su uso ha demostrado traer consecuencias adversas e

importantes para la salud humana y para el equilibrio natural de la microbiota del suelo (Andrés *et al.*, 1998a, b, 1999). En los últimos años se ha prestado especial atención al empleo de nuevas tecnologías que posibiliten el uso de prácticas de producción agrícola sustentables, dirigidas hacia la explotación racional de los recursos naturales y tendiendo a reducir el uso de pesticidas sintéticos.

Una posibilidad de lograr buenos rendimientos sin consecuencias negativas en el medio ambiente es emplear microorganismos, preferentemente aislados de medios naturales, que permitan a través de distintos mecanismos controlar la flora patógena e incluso estimular el crecimiento vegetal (Lucy *et al.*, 2004).

Un aspecto fundamental para evaluar el posible empleo de microorganismos en la rizósfera de maní y de otras leguminosas es conocer la interacción que pueda tener con cepas de rizobia capaces de fijar N₂ de manera simbiótica y los efectos de esa interacción sobre la planta.

De acuerdo con lo expuesto, el trabajo aquí presentado se orienta al estudio e implementación de una herramienta agrotecnológica, como es el diseño de nuevos inoculantes formulados con microorganismos que pueden promover el crecimiento vegetal de manera directa (por ejemplo, facilitando la toma de nutrientes o aportando fitohormonas) o de manera indirecta (a través del control biológico de otros organismos potencialmente patógenos). Este tipo de productos biológicos contribuye a la conservación del medio ambiente suelo por cuanto limitaría el empleo de productos químicos, tanto fertilizantes como pesticidas, algunos de ellos de importante impacto ambiental (Glick, 1995).

Si bien la aplicación de inoculantes a las semillas de maní ha brindado resultados contradictorios, la posibilidad de lograr mejores rendimientos a través de esta técnica sigue motivando investigaciones en el marco de brindar a la agricultura herramientas que permitan no sólo una mayor productividad sino también compatibilidad con la conservación del medio ambiente suelo (Bogino *et al.*, 2006).

El empleo de microorganismos en las prácticas agrícolas tiene lejanos antecedentes. En 1886, Hellriegel y Wilfarth, dos científicos alemanes, descubrieron la existencia de una asociación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias que se ubican dentro de estructuras nodulares en las raíces. Estas bacterias pudieron ser aisladas y en 1890 otros dos científicos alemanes, Nobbe y Hilmer, demostraron la

ventaja de adicionar cultivos puros de estas bacterias (grupo al que hoy denominamos los rizobios) al sembrar las semillas leguminosas. Es así como surge el concepto de la inoculación y la posibilidad de una producción industrial de inoculantes (Guía de Inoculación, 2002).

En el año 1897, se presentó en el mercado un “fertilizante biológico para la inoculación de cereales”, producto que estaba basado en una especie de género *Bacillus* y al que citas de la época atribuyen mejoras en los rendimientos cercanos a un 40% (Kilian *et al.*, 2000).

El término “rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas” (PGPR) reúne a un grupo de bacterias que pueden colonizar las raíces e incrementar el crecimiento vegetal (Kloepper y Schroth, 1978). Los mecanismos a través de los cuales microorganismos rizosféricos pueden afectar el crecimiento de los cultivos incluyen: la fijación simbiótica o asimbiótica del nitrógeno atmosférico, la capacidad de producir o cambiar la concentración de fitohormonas, la solubilización de fosfatos y otros minerales y el antagonismo contra organismos fitopatógenos (Glick, 1995). El último aspecto mencionado, contempla la producción de quelantes de hierro, enzimas hidrolíticas, sustancias antibióticas, cianidas y la inducción de resistencia sistémica en el cultivo.

La inoculación mixta de diversos géneros bacterianos junto a rhizobia ha sido reportada como responsable del incremento en la tasa de nodulación, materia seca y rendimiento en distintas leguminosas (Dashti *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2002; Sindhu *et al.*, 2002).

Las especies de *Bacillus* se encuentran entre los microorganismos más comunes aislados desde muestras de suelo. Han sido citados varios mecanismos que pueden contribuir a un incremento en los rendimientos y a reducir el ataque de patógenos luego de la aplicación de especies de *Bacillus* a los cultivos: competencia por la colonización temporaria de la rizósfera y el rizoplano, síntesis de metabolitos con capacidad antibiótica frente a hongos y otras bacterias, inducción de resistencia por la actividad de genes de defensa en la planta y promoción del crecimiento de raíces (Handelsmann y Stabb, 1996).

En cuanto a la competencia por la colonización temporaria de la rizósfera y el rizoplano, Parke (1991) sostiene que poblaciones relativamente altas de *Bacillus* se

pueden aislar desde la superficie de las raíces. Como resultado de esta colonización, la ocurrencia natural de otros microorganismos se ve limitada por una cuestión de espacios y/o sitios de anclaje sobre las raíces (Handelsmann y Stabb, 1996).

Respecto del segundo mecanismo que puede contribuir a incrementar el rendimiento y a reducir el ataque de patógenos –síntesis de metabolitos con capacidad antibiótica frente a hongos y otras bacterias- cabe precisar que varios antibióticos pueden ser producidos por cepas de *Bacillus*, presentando la mayoría de ellos estructuras de lipopéptidos. En el caso de *Bacillus*, los compuestos lipopéptidos se pueden detectar en los medios en el mismo momento de la formación de las endosporas, durante la fase estacionaria del crecimiento. La eficacia de estos lipopéptidos purificados desde medios de cultivo se encuentra en el rango de 5 a 100 ug/ml, similar a la de otros agentes fungicidas (Krebs *et al.*, 1998).

Atendiendo a la inducción por resistencia por la activación de genes de defensa en la planta como otro mecanismo para incrementar el rendimiento, experiencias realizadas con *B. subtilis* mostraron, tanto por métodos de biología molecular como por ensayos fitopatológicos, que la presencia de la bacteria, e incluso filtrados en su cultivo, disparan una señal que puede ser sistemáticamente traslocada por la planta y activar la expresión de genes de defensa por parte del vegetal (Podile y Laxmi, 1998).

Por último, aludiendo a la promoción del crecimiento de raíces por la síntesis de sustancias fitohormonas tipo auxinas y citocininas, cabe precisar que ésto conlleva un incremento en las posibilidades de adquisición de agua y nutrientes, en la velocidad de crecimiento y en la resistencia en condiciones de estrés. Inclusive, la promoción del crecimiento también se puede considerar como una posibilidad de escape a la enfermedad, dado que la planta puede superar más rápidamente estados fisiológicos susceptibles y la mayor expansión del sistema radical permite compensar las partes enfermas de las raíces (Glick, 1995; Kilian *et al.*, 2000).

Trabajos previos en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de Río Cuarto mostraron la producción “in vitro” de metabolitos por parte de *Bacillus* spp. con capacidad antibiótica frente a hongos patógenos de maní, la capacidad de dichas cepas de limitar la incidencia de algunos fitopatógenos de maní en ensayos en invernáculos y la presencia de otras propiedades no ligadas al

biocontrol pero que podrían resultar en una promoción directa del crecimiento vegetal, como la producción de análogos de auxinas y solubilización de fosfato y de hierro (Audisio *et al.*, 2005). Otros ensayos muestran coexistencia en medios de cultivo y sobre semillas inoculadas de tres cepas de *Bacillus* spp. con *Bradyrhizobium* sp. C145, la cepa recomendada por INTA para la implementación de la inoculación de maní en suelos argentinos (Monge *et al.*, 2007).

Algunas consideraciones conceptuales

El término ‘*práctica de inoculación*’ hace referencia al procedimiento por el cual se agregan artificialmente rizobios seleccionados sobre la semilla o el suelo, cuando en el suelo no se dispone de los rizobios adecuados (Guía de Inoculación, 2002). El producto biológico desarrollado para este fin se denomina entonces *inoculante*.

En la década del 70 se produjo una importante expansión del cultivo del maní en nuestro país. No obstante, dado que los suelos no contaban con *Bradyrhizobium japonicum* o *B. elkanii*, se consideró necesaria la incorporación de este tipo de bacterias a las semillas por intermedio de la inoculación (Peticari *et al.*, 2007). Los efectos positivos sobre el rendimiento del cultivo fueron evidentes y ésto favoreció una alta adopción de los inoculantes.

En la actualidad, la agrotecnología pone al servicio del agricultor al menos cuatro *tipos de inoculantes*: inoculante en polvo, inoculante granular, inoculante líquido acuoso e inoculante líquido oleoso (Balotti, 1992).

El *inoculante en polvo* consiste en un preparado que se obtiene con soportes molidos adecuadamente hasta ser llevados a un estado de partículas finas que se impregnan con un cultivo de rizobios de alta concentración celular. El material más difundido a nivel mundial para la fabricación de inoculantes en polvo es la ‘turba’. No obstante, en países donde no existe turba o donde su adquisición es muy costosa, se emplean soportes alternativos. Uno de los más efectivos es la ‘perlita’, material inerte constituido básicamente por silito-aluminato que ha demostrado tener una alta capacidad de retención de agua aunque no ofrece una buena sobrevivencia para las bacterias. Al respecto, cabe señalar que se logró mejorar su comportamiento, agregándole nutrientes o mezclándolo con suelo húmico.

El *inoculante granular* es un formulado a base de turba aglomerada en pequeños gránulos que permite la aplicación de dicho inoculante dispersado dentro del surco de siembra junto con las semillas.

Por su parte, el *inoculante líquido acuoso* se diseña en base a la obtención de caldo de muy alta concentración celular. En este tipo de inoculante los microorganismos presentan prolongados períodos de sobrevivencia (de 4 a 8 meses) manteniendo sus propiedades fisiológicas. Esto se logra agregando sustancias que regulan la presión osmótica y protegen la membrana celular.

Finalmente, el *inoculante líquido oleoso* se obtiene en principio de un caldo de alta concentración celular aunque, a diferencia del inoculante líquido acuoso, posteriormente se somete a un proceso de centrifugado. Este proceso de centrifugado permite preparar la biomasa que se dispersa o suspende luego en un aceite de origen vegetal o mineral.

En cuanto a los *métodos de inoculación* que existen, conviene señalar que la elección del más apropiado es de fundamental importancia para incorporar el número adecuado de bacterias por simiente y para disminuir la mortandad de las mismas. Los métodos de inoculación más usuales pueden ser de dos clases: pulverulentos o líquidos.

En la *inoculación pulverulenta* puede utilizarse *inoculante húmedo o en pasta* o bien un *inoculante semihúmedo o salpicado*. La inoculación húmeda consiste en mezclar previamente el inoculante con una pequeña cantidad de agua recomendada para inocular la semilla. Una vez que se ha formado una pasta espesa, se completa el proceso agregando la cantidad de agua necesaria para inocular y se mezcla la semilla. Por su parte en la inoculación semihúmeda, se humedece previamente la semilla con agua azucarada y luego se espolvorea el inoculante y se homogeniza tratando de que todas las simientes queden cubiertas.

En la *inoculación líquida* se mezcla directamente el inoculante con semilla. No se recomienda efectuar este proceso sobre la tolva de la sembradora pues se corre el riesgo de lograr una mala distribución del inoculante sobre la semilla.

La inoculación puede realizarse empleando máquinas inoculadoras específicamente desarrolladas para este proceso, o en su defecto, mediante

implementos adecuados como un chimango. Es imprescindible ajustar el proceso de modo tal que todas las semillas reciban la misma cantidad de inoculante.

Una técnica que se ha desarrollado en los últimos años es la inoculación líquida de la semilla sobre el surco de siembra. Para esta técnica se utilizan tanques montados sobre la sembradora donde se agrega el inoculante diluido en agua, una bomba y un sistema distribuidor con mangueras y discos perforados que permiten la dosificación. Los picos de bajada se ubican detrás de los caños de bajada de la sembradora de manera que el caldo con el inoculante se aplica directamente sobre la semilla y el surco de siembra.

El proceso de inoculación debe realizarse preferentemente a la sombra y a temperaturas moderadas. Como una importante cantidad de bacterias muere en el momento de la inoculación, es conveniente efectuar la siembra en lo posible antes de las doce horas de aplicado el producto. Si el proceso incluye el agregado de fungicidas o insecticidas, los tiempos se acortan y en este caso se recomienda no superar las cuatro horas para realizar la siembra (Monge, 2006).

Hipótesis y objetivos del trabajo

Teniendo en cuenta el problema que convoca nuestra atención y los antecedentes arriba comentados, nuestra hipótesis de trabajo sostiene que la inoculación mixta de maní con *Bradyrhizobium* y *Bacillus* presenta efectos promotores y protectores del crecimiento vegetal. En tal sentido, el objetivo general que orientó la ejecución de este estudio apuntó a evaluar el potencial de microorganismos aislados del suelo en la promoción del crecimiento vegetal y en el manejo de organismos patógenos en cultivos de importancia regional. Específicamente, pretendimos evaluar el efecto de cepas de *Bacillus* sobre microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno y sobre aspectos fisiológicos del crecimiento del maní.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla I se muestran las diferentes cepas con las cuales se trabajó así como su proveniencia.

Tabla 1: Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepas	Características	Origen
<i>Bacillus</i> sp. R19	aislamiento de rizósfera de soja	Olmedo 2002
<i>Bacillus</i> sp. TO1	aislamiento de rastrojo de soja	Audisio <i>et al.</i> 2005
<i>Bradyrhizobium</i> sp. C145	Simbionte de maní	INTA

Material vegetal: Arachis hypogaea L. (maní).

Ensayos de co-inoculación en plantas a nivel invernáculo. Las experiencias se llevaron a cabo en los invernáculos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y se empleó como soporte una mezcla de tierra, arena y perlita (2:1:1) contenida en bolsas de polietileno. La humedad del sustrato se mantuvo a un 60% de la capacidad de campo regándose con agua estéril y solución nutritiva de Jensen libre de nitrógeno (CIAT, 1988) diluida 1/10, de manera periódica y alternada. Las semillas de maní fueron superficialmente desinfectadas con Hipoclorito de Sodio (solución comercial 55 gr/l) al 2% durante 3 minutos y luego lavadas varias veces con H₂O destilada estéril a fin de eliminar restos del desinfectante. Las cepas de *Bradyrhizobium* y *Bacillus* fueron cultivadas en medio YEM (Vincent, 1970) y TSA (tripticosa soya – Laboratorio Britania) respectivamente, a 28° C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

En los tratamientos de inoculación con una cepa, semillas desinfectadas de maní se sumergieron durante 20 minutos en el cultivo de *Bradyrhizobium* o de *Bacillus*. En los tratamientos de co-inoculación se procedió de igual manera pero sumergiendo las semillas en una mezcla 1:1 V/V de cada cultivo bacteriano. En el caso de los controles no inoculados, las semillas se sumergieron igual tiempo pero en medio de cultivo estéril.

Se realizaron los siguientes tratamientos:

1. Control no inoculado
2. Control nitrógeno. A los diez días de la emergencia de las plántulas, se aplicó al sustrato una solución de KNO_3 al 0,5%
3. Control *Bacillus* (cepas seleccionadas R19 y TO1)
4. Control *Bradyrhizobium* (cepas C145)
5. Co-inoculación *Bradyrhizobium* – *Bacillus*.

Cada tratamiento contó con un mínimo de 25 plantas y los parámetros evaluados a los 90 días posteriores a la siembra fueron:

- altura de la planta y longitud de la raíz principal desde el nudo cotiledonal hasta el ápice caulinar o radical
- diámetro de tallo y raíz a 0,5 cm del nudo cotiledonar
- número de folíolos
- biomasa seca aérea y radical, luego del secado del material en estufa a 60° C durante 72 horas.
- número de nódulos y posición de los mismos
- efecto general de las inoculaciones sobre el crecimiento vegetal.

Los resultados de los ensayos realizados a nivel laboratorio (Marro, 2008) e invernáculo permitieron seleccionar una cepa de *Bacillus* y una cepa de *Bradyrhizobium* que fueron empleados en los ensayos a campo.

Ensayo de co-inoculación en condiciones de campo. Las cepas de *Bradyrhizobium* y de *Bacillus* empleadas para este estudio, se formularon como inoculantes sólidos, empleando turba estéril como soporte y siguiendo procedimientos estándares del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1988). Se calculó el número de microorganismos por gramo de inoculante procurando alcanzar una densidad en el orden de 10^9 unidades formadoras de colonias para *Bradyrhizobium* y de 10^6 para *Bacillus*. Los inoculantes fueron aplicados a las semillas, previo a la siembra, de manera convencional y por el método húmedo, utilizándose una solución de carboximetilcelulosa 2% como adherente. En el tratamiento de co-inoculación se aplicó a las semillas doble cantidad de un inoculante constituido por la mezcla 1:1 V/V de los inoculantes individuales de *Bradyrhizobium* y de *Bacillus*.

El estudio se realizó en el campo experimental de la UNRC (33° 17' latitud sur, 64° 14' longitud oeste) en un suelo clasificado como hapludol típico. Las propiedades fisicoquímicas de este suelo se muestran en la Tabla 2, mientras que la Tabla 3 y la Figura 1 muestran datos relativos al régimen de precipitaciones durante el ensayo.

Los ensayos se realizaron en parcelas separadas por 1 m entre sí y con un diseño experimental de bloques al azar con 3 repeticiones. Cada parcela presentó 5 surcos de 5 m de largo cada uno y distanciados 0,7m entre sí.

Tabla 2: caracterización del suelo empleado.

Parámetro.	
Materia Orgánica ¹ (%)	1.82
Nitrógeno ² (de NO ₃ en ppm)	17.1
Densidad de la solución del suelo (g*cm ⁻³)	1.32
pH en agua ³	5.9
Fosforo asimilable ⁴ (ppm)	31.2

- 1- Técnica Walkey-Black
- 2- Técnica reducción por cadmio.
- 3- Técnica potenciométrica 1:2.5
- 4- Técnica de Kurtz y Bray.

Tabla 3: detalle de precipitaciones en el periodo del estudio.

MES-AÑO	AGUA (mm).
Diciembre 2006	160
Enero 2007	169
Febrero 2007	155
Marzo 2007	85
Abril 2007	11

Fuente: Orientación, Meteorología Agrícola, Fac. de Agronomía y Veterinaria, UNRC.

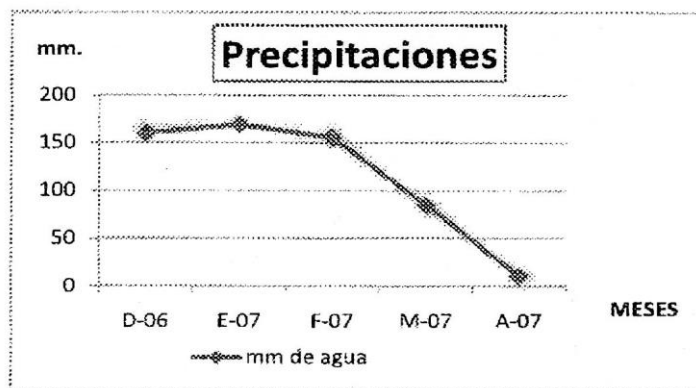


Figura 1. Distribución de las lluvias (diciembre 2006–abril 2007)

Se realizaron los siguientes tratamientos: 1) control no inoculado; 2) inoculado con *Bradyrhizobium sp.* C145; 3) co-inoculado *Bradyrhizobium sp.* C145 – *Bacillus spp.* R19.

Se realizaron muestreos a los 30 y 60 días posteriores a la siembra a fin de seguir el proceso de nodulación y el estado general del cultivo. A los 90 días se evaluaron los parámetros antes propuestos para el ensayo en invernáculo y a cosecha el rendimiento de cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que, en los ensayos de coexistencia entre *Bradyrhizobium* sp. C145 y *Bacillus* R19 y TO1, las cepas pueden crecer sin interferencias cuando son sembradas al mismo tiempo en los medios utilizados. Asimismo, los resultados indican que tampoco se observó inhibición del crecimiento cuando C145 se sembró en los medios donde ya resultaba visible el crecimiento de R19 y TO1.

Experiencia de co-inoculación en invernáculo

La Tabla 4 sistematiza los resultados obtenidos en la experiencia de inoculación realizada en condiciones de invernáculo. Por su parte, la Figura 2 muestra los diferentes valores obtenidos en los parámetros evaluados en cada tratamiento.

Tabla 4. Tratamiento de inoculación y coinoculación de maní con *Bradyrhizobium* y *Bacillus* en condiciones de invernáculo*.

Tratamiento	Nº de foliolos por planta	Longitud aérea (cm)	Longitud radical (cm)	Nº de nódulos por planta	Peso seco aéreo (gr/planta)	Peso seco radical (gr/planta)
Control no inoculado	82,2 ±6,9a	46,3 ±2,2a	22,1 ±2,3a	39,2 ±5,1a	2,01 ±0,13c	0,92 ±0,07b
Control N	110,4 ±9,1a	51,2 ±3,1ab	23,2 ±1,6a	11,5 ±4,2b	2,26 ±0,15c	1,23 ±0,06a
Inoculado C 145	86,5 ±7,8a	63,8 ±3,8c	21,8 ±2,1a	44 ±6,3a	4,21 ±0,28b	0,87 ±0,05b
Inoculado R 19	93,1 ±6,5a	54,6 ±2,6ab	21,2 ±2,2a	25 ±3,7b	2,4 ±0,21c	1,18 ±0,06a
Inoculado TO1	87 ±8,2a	57,2 ±3,3bc	20,3 ±1,5a	16 ± 3b	1,87 ±0,16c	0,81 ±0,03b
Coinoculado C 145-R19	118,3 ±9,2b	67,7 ±3,2b	26,5±0,7b	17 ±2,7b	5,41 ±0,33a	1,16 ±0,04a
Coinoculado C 145-TO1	94 ±8,4a	67,3 ±3,6b	22,4 ±0,7a	22 ±2,9b	3,83 ±0,27b	0,95 ±0,04b

* Los resultados estimados a los 90 días de siembra representan la media de 25 plantas por tratamiento. Los valores dentro de las mismas columnas seguidos por las mismas letras no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Scheffe ($p=0,05$).

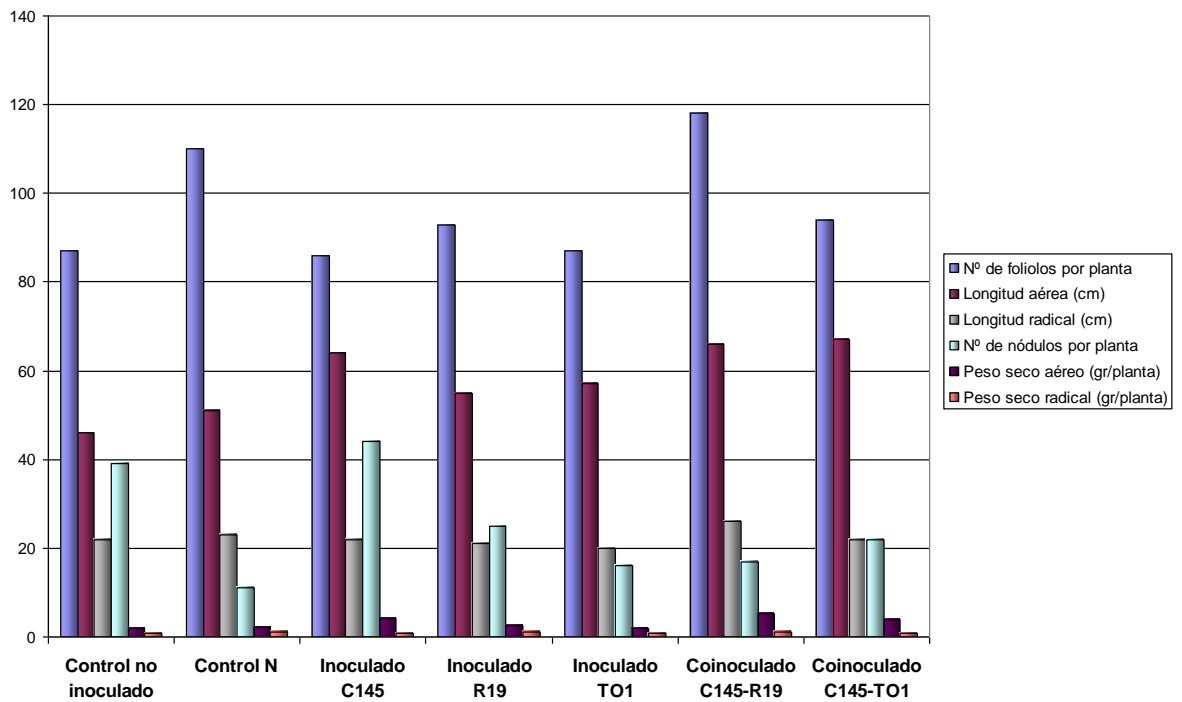


Figura 2. Comparación entre tratamientos para cada parámetro evaluado

Los ensayos de inoculación mostraron que la inoculación mixta R19–C145 determinó incrementos significativos en los parámetros peso seco de raíz, peso seco de tallo, número de foliolos y longitud aérea y radical respecto del control no inoculado y el inoculado sólo con C145. También se hallaron diferencias significativas en los parámetros: número de foliolos, longitud radical y peso seco aéreo respecto del control N. La inoculación sólo con la cepa R19 mostró incremento en biomasa radical, equivalente a la inoculación mixta R19–C145. La inoculación simple o mixta con la cepa con *Bacillus sp.* TO1, reportada por Audisio *et al.* (2005) como un importante biocontrolador de hongos fitopatógenos de maní, y *Bradyrhizobium sp.* C145, no mostró diferencias tan significativas respecto del control no inoculado y del control N como lo hizo R19 en la mayoría de los parámetros de crecimiento vegetal evaluados. Una característica distintiva entre R19 y TO1 es la capacidad de la primera de producir ácido indol acético (AIA) o análogos, propiedad no presente en TO1 (Audisio *et al.*, 2005), lo que podría relacionarse con las diferencias observadas en el crecimiento del maní,

fundamentalmente en los parámetros longitud radical, peso seco de raíces y parte aérea.

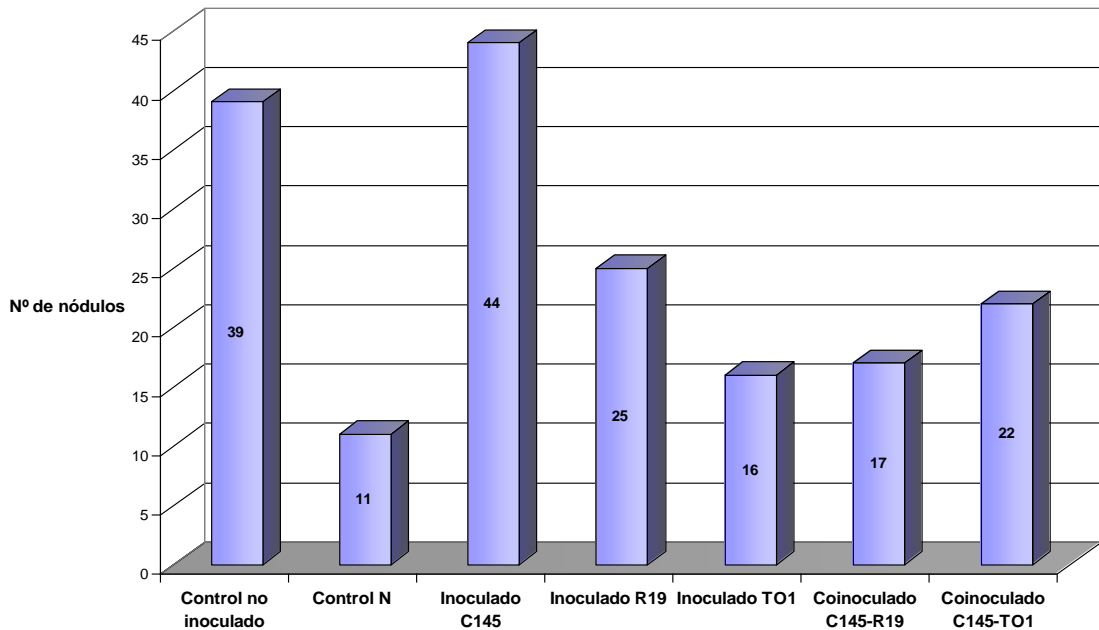


Figura 3. Número de nódulo por planta en cada tratamiento

La nodulación fue menor en el tratamiento de inoculación mixta respecto de la observada en el control no inoculado y en el inoculado con C145 (Figura 3). Este resultado podría adjudicarse a que *Bacillus* interfiere en la formación de nódulos posiblemente adjudicado a una competencia por la colonización de la raíz con los rizobios dada la mayor velocidad de crecimiento que presenta el género *Bacillus*, o a una diferente situación nutricional de las plantas respecto a la disponibilidad de nitrógeno. También es importante destacar que es frecuente observar en estas leguminosas las nodulaciones espontáneas debido a la presencia de rizobios nativos infectivos (Bogino *et al.*, 2006). Sin embargo, éstos suelen tener una limitada eficiencia de FBN.

Tal como ocurre en otras leguminosas (soja y alfalfa), la incorporación de cepas seleccionadas por la eficiencia de la FBN podría mejorar el aporte de este nutriente y la productividad del maní.

Experiencia de co-inoculación en condiciones de campo

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos a los 90 días de la siembra, encontrándose las plantas en estado fenológico R6

Contribución de la inoculación con
Bradyrhizobium y *Bacillus* en el crecimiento y productividad del cultivo de maní

Tabla 5: Ensayo de coinoculación de maní con *Bradyrhizobium* y *Bacillus* en condiciones de campo.
Los datos mostrados fueron obtenidos a los 90 días de la siembra.

Tratamiento	Altura desde el nudo cotiledonar al ápice (cm)	Diámetro del tallo, a 0,5 cm del nudo cotiledonar	Longitud de raíz del nudo cotiledonar al ápice (cm)	Diámetro de raíz a 0,5 cm del nudo cotiledonar (cm)	Nº de nódulos en raíz principal	Nº de nódulos en raíces laterales	Nº total de nódulos en raíz	Peso seco de parte aérea (g)	Peso seco de raíces (g)
Control no inoculado	49,8 ±1,7a	0,8 ±0,3a	16,4 ±2,8a	0,83 ±0,29a	27 ±8,54a	242 ±82,29a	269 ±56,7a	106,25 ±56,75a	13,8 ±7,6a
Inoculado C145	50,1 ±2,7a	0,9 ±0,25a	14,67 ±2,21a	0,7 ±0,1a	14,3 ±9,1a	196 ±36,39a	210,3 ±63,9 ^a	121,19 ±63,99a	10,4 ±7,91a
Coinoculado C145 - R19	50,25 ±2,8a	1,03 ±0,29a	20,6 ±2,81b	0,85 ±0,18a	41,6 ±6,1b	331,3 ±38,2b	372,9 ±24,8b	181,2 ±71,3a	17,3 ±5,6b

Valores de la misma columna y con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos de acuerdo a la prueba de Scheffe (p= 0.05)

Como lo muestran los datos de la *Tabla 5*, en algunos de los parámetros evaluados (número de nódulos en raíces, peso seco en raíces y longitud de raíces) la co-inoculación C145–R19 evidenció valores significativamente superiores al control no inoculado y al inoculado con C145.

Se observa nodulación en las plantas de control no inoculado, lo cual evidencia la presencia en el suelo de cepas nativas de rizobios. El número de nódulos, fundamentalmente en raíz principal, disminuye al inocularse con C145, lo que supone una competencia entre esta cepa y la nativa. Sin embargo, al co-inocular con C145 y R19, se recuperan los valores de la nodulación siendo superiores a los no inoculados. Esta última observación no coincide con lo observado en la experiencia a nivel de invernáculo, donde la co-inoculación con C145-R19 mostró una significativa disminución en la nodulación. La diferencia observada podría atribuirse a que las condiciones de invernáculo favorecieron la colonización radical por R19, limitando a C145.

A continuación, el *Figura 4* muestra los valores obtenidos en número de nódulos en raíz principal y en raíces secundarias en cada uno de los diferentes tratamientos.

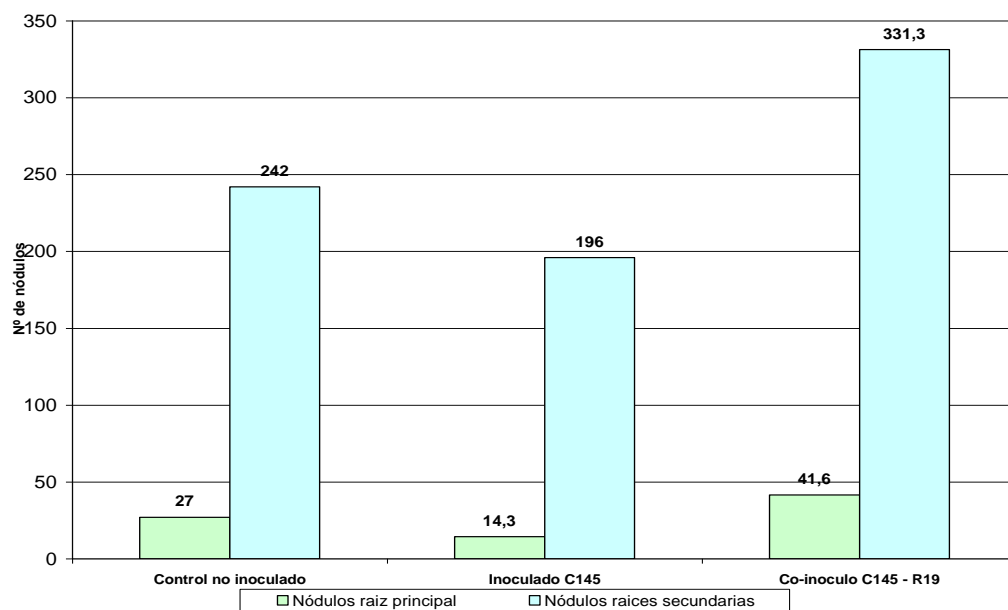


Figura 4. Número de nódulos en raíz principal y en raíces secundarias en cada tratamiento

Con la inoculación se pretende proveer un número importante de rizobios viables que puedan inducir una rápida colonización de la rizósfera de modo tal que la nodulación ocurra luego de la germinación y produzca óptimos rendimientos. Sin embargo, la introducción de un inóculo de rizobios a un suelo que contiene poblaciones nativas de los mismos, frecuentemente resulta en una baja proporción de nódulos que contienen la cepa introducida. Según Mc Loughlin *et al.* (1985), ésto se debe a la competencia con cepas nativas ineficaces y otras bacterias rizosféricas. Este problema de la competitividad de las cepas inoculadas ha llevado a enfatizar las investigaciones en la selección de cepas con alta habilidad competitiva, el uso de mayores tasas de inoculación, la inoculación repetida, el desarrollo de mejores soportes para la inoculación, estudios de las bases moleculares de la competencia y estudios ecológicos de las cepas nativas (Peoples y Craswell., 1992).

Los resultados muestran diferencias significativas en peso seco de raíces y longitud de raíces que favorecen a la coinoculación con C145 y R19. Las figuras expuestas a continuación presentan, respectivamente, los datos referidos.

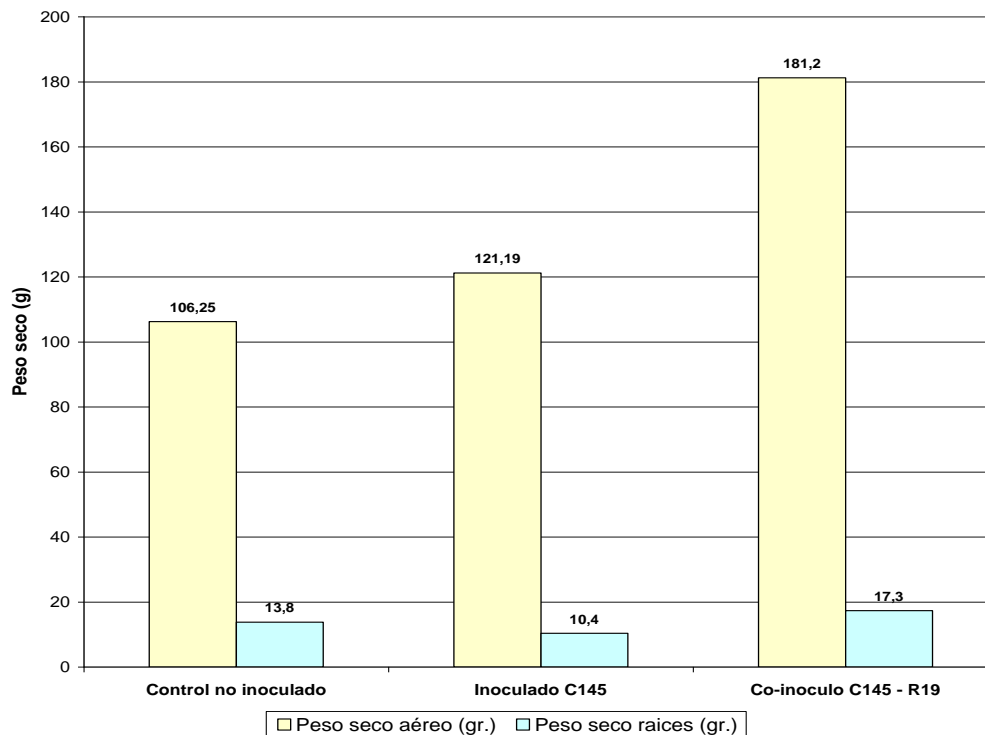


Figura 5. Peso seco aéreo y radical en los diferentes tratamientos.

Contribución de la inoculación con
Bradyrhizobium y *Bacillus* en el crecimiento y productividad del cultivo de maní

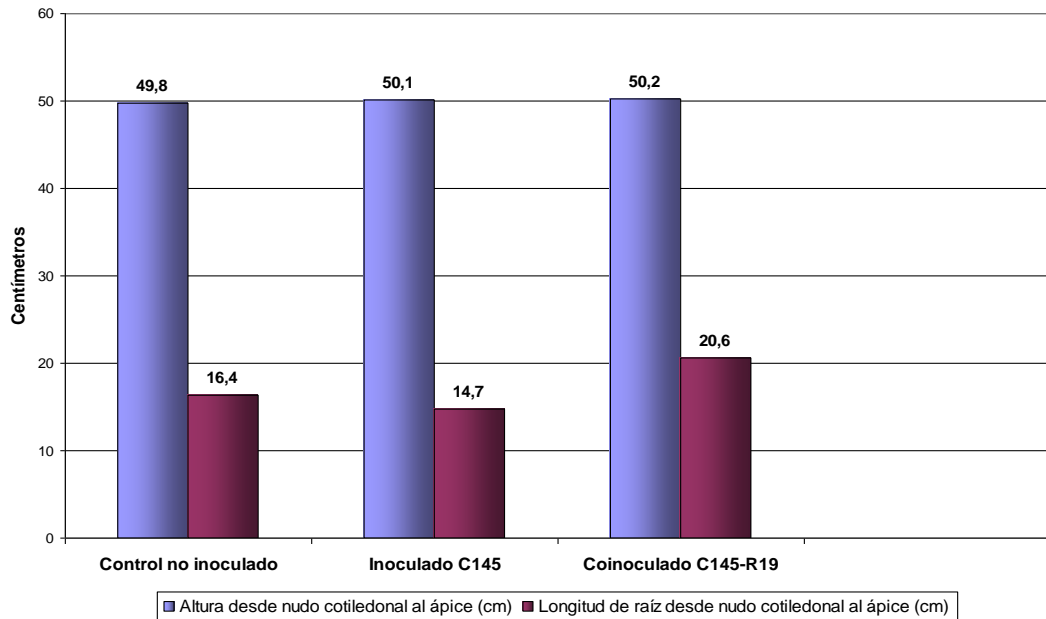


Figura 6. Longitudes aéreas y radicales de los diferentes tratamientos

Las diferencias observadas en los valores relativos a peso seco y longitud de raíz podrían atribuirse a la capacidad del *Bacillus* R19 de sintetizar auxinas, tales como el ácido indol acético (AIA) o análogos del mismo, que son promotores del crecimiento (Audisio *et al.*, 2005).

Los efectos del coinóculo C145-R19 sobre el crecimiento de la planta son muy importantes ya que el crecimiento del sistema radical conlleva un incremento en las posibilidades de la planta de adquirir agua y nutrientes, en la velocidad de crecimiento y en la resistencia en condiciones de estrés. Inclusive, la promoción del crecimiento también se puede considerar como una posibilidad de escape a enfermedades, dado que la planta puede superar más rápidamente estados fisiológicos susceptibles y la mayor expansión del sistema radical permite compensar las partes enfermas de las raíces (Glick, 1995; Kilian *et al.*, 2000).

La Tabla 6 y la Figura 7 presentan los rendimientos en cada uno de los diferentes tratamientos.

Tabla 6: Efecto de la inoculación sobre el rendimiento de maní

Tratamiento	kilogramos / hectárea
Control	3613,5 a
Inoculado C145	4418,5 b
Inoculado C145-R19	4130,2 b

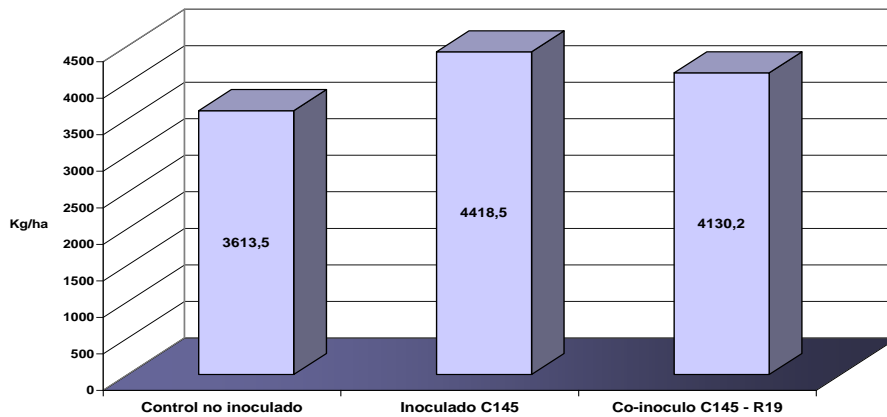


Figura 7. Rendimiento obtenido en cada uno de los diferentes tratamientos

Como puede apreciarse, el rendimiento obtenido con la inoculación C145 se muestra claramente superior. No obstante, si lo comparamos con el rendimiento obtenido a en la coinoculación C145-R19, los análisis efectuados no muestran una diferencia significativa sí, en cambio, los valores obtenidos con los tratamientos de inoculación con C145 y coinoculación con C145-R19 son significativamente superiores en comparación a los logrados con el Control no inoculado.

La diferencia señalada puede deberse a que el control no inoculado es nodulado por cepas nativas ineficaces o poco eficaces en la fijación de nitrógeno en comparación con la cepa seleccionada C145.

CONCLUSIONES

La aplicación de inoculantes a la semilla de maní ha brindado resultados positivos en diferentes parámetros evaluados; entre ellos, peso seco y longitud de raíces, cantidad de nódulos por planta y rendimiento.

Un dato que parece interesante destacar tiene que ver con la diferencia advertida en los resultados obtenidos en los ensayos en invernáculo, diferencias que, por cierto, destacan los beneficios que supone la aplicación de inoculantes en condiciones de campo. En este sentido, los hallazgos en invernáculo demostraron una disminución de la nodulación con respecto al ensayo de coinoculación. En próximos estudios sería importante profundizar en las causas que pueden haber originado las diferencias señaladas, ya que cuando se realizó el ensayo en invernáculo se utilizaron muestras de suelo extraídas del campo donde luego se replicó el estudio. Una hipótesis que contribuiría a explicar las diferencias referidas tiene que ver con las condiciones poco favorables en invernáculo para el desarrollo de las cepas introducidas con el inoculante, exceso en la cantidad de *Bacillus* y competencia en la colonización de las raíces.

Por su parte, si se comparan los resultados obtenidos entre la coinoculación C145-R19 y C145-TO1 se advierten otros resultados que tienden a destacar el potencial de R19 en el crecimiento de planta de maní. Así, la coinoculación C145-R19 mostró diferencias significativas con respecto a la coinoculación con C145-TO1 realizada por Marro (2008), arrojando un mejor rendimiento, mayor peso seco de raíces y longitud de raíces e incremento en el número de nódulos. Las diferencias señaladas, pueden deberse a la capacidad del *Bacillus* R19 de producir ácido indol acético (AIA) lo que según los datos obtenidos parece no ocurrir con el *Bacillus* TO1.

Además, dado que las plantas no enfermaron, no se pudo evaluar la capacidad de biocontrol de las cepas de *Bacillus* demostrada en anteriores ensayos en laboratorio e invernáculo, por lo que ésta constituye una tarea o experiencia que podría continuar el estudio de estas cepas.

La inoculación con C145 y la coinoculación de maní con *Bradyrhizobium* C145 y *Bacillus* R19 mostraron incrementos en algunos parámetros analizados respecto de los controles no inoculados, sugiriendo que esta cepa puede ser empleada para la formulación de nuevos inoculantes que permitan mejorar rendimiento y/o mantener la sanidad del cultivo de maní.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉS, J., N. CORREA y S. ROSAS 1998a. Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram. Isolation of fungicide resistant strains. *Biol. Fertil. Soils* 26: 141-145.
- ANDRÉS, J., N. CORREA y S. ROSAS 1998b Alfalfa and soybean seed and root exudates treated with thiram inhibit the expression of rhizobia nodulation genes. *Phyton – Int. J. Exp. Bot.* 62: 47-53.
- ANDRÉS, J., N. CORREA y S. ROSAS 1999 El potencial mutagénico del fungicida thiram *Rev Arg Microbiol*, 31: 82-86.
- AUDISIO, A., J. ANDRÉS, G. AVANZINI, A. CAPRINI, A. THUAR y C. OLMEDO 2005 Biocontrol de hongos patógenos de maní por la aplicación de rizobacterias. *Libro de la V Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos – V Encuentro sobre fijación Biológica de Nitrógeno*. Universidad Nacional de Jujuy. Versión CD – ROM.
- BAI. Y., B. PAN, T. CHARLES y D. SMITH 2002 Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biol. Biochem* 34: 1953 – 1957.
- BALATTI, A. 1992. Producción de inoculantes para leguminosas. Ediciones Trabuco, La Plata, Argentina, pp. 1-4.
- BOGINO, P., E. BANCHIO, L. RINAUDI, G. CERIONI, C. BONFIGLIO Y W. GIODARNO 2006. Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. In soils of Argentina. *Annals of Applied Biology* 148: 207 – 212.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT) 1988 *Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo de la Fijación Biológica del Nitrógeno*. Cali, Colombia (sección 9, p. 5).

- DASHTI, N, F. ZHANG, R. HYNES y D. SMITH 1998 Plant growth-promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr] under short season conditions. *Plant Soil* 200: 205-213.
- GUÍA DE INOCULACIÓN 2002. Introducción a la inoculación. Disponible en <http://www.nitrugin.com.ar/guiainoc.asp#Introducción> (fecha de consulta: 02-06-09).
- GLICK, R.1995 The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- GORGAS, J., E. LOVERA, J. DARDANELLI, E. BOSNERO, H. GRIMALDI y H. SALAS 1997 *Aptitud edáfica y climática de Córdoba para el cultivo del maní*. En EEA INTA Manfredi, pp. 1-12.
- HANDELSMANN, J. y E. STABB 1996 Biocontrol of soilborne pathogens. *The Plant Cell* 8: 1855-1869.
- KILIAN, M., U. STEINER, B. KREBS, H. JUNGE, G. SCHMLEDEKNECHT y R. HAIN 2000 FZB24 *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1:72-93.
- KLOEPPER, J. y M. SCHROTH 1978 Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceeding of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* 2: 879-882. Angers, France.
- KREBS, B., B. HÖDING, S. KÜBART, M. ALEMAYEHU WORKIE, H. JUNGE, G. SCHMLEDEKNECHT, R. GROSCH, H. BOCHOW y M. HEVESI 1998 Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Z Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 105: 181-191.
- LUCY, N., E. REED y B. GLICK 2004 Applications of Free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1 – 25.
- MARCH, G. y A. MARINELLI 1998 Enfermedades del maní. In PEDELLINI, R. y C. CASINI (Eds.) *Manual del maní 3º ed.* INTA, pp. 24-35.
- MARRO, V. 2008 Inoculación mixta del cultivo de maní con cepas de *Bradyrhizobium* y *Bacillus*. Trabajo final de grado de la Carrera de Ingeniería

Agronómica, aprobado en marzo de 2008. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Disponible en Biblioteca Central de la UNRC.

MC LOUGHLIN, T. J., P. A. OWENS y S.G. ALT 1985 Competition studies with fast growing *Rhizobium japonicum* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 31: 220-223.

MONGE, M. P. 2006 *Evaluación de la inoculación mixta Bradyrhizobium-Bacillus sobre aspectos fisiológicos del maní*. Trabajo final de grado de la Carrera Microbiología, aprobado en diciembre de 2006. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Disponible en Biblioteca Central de la UNRC, pp. 6 - 21.

MONGE, M. P., GORDON, M., AUDISIO, A., VILLA, M., OLMEDO C., ANDRÉS J. 2007 Evaluación de la inoculación mixta *Bradyrhizobium* – *Bacillus* sobre aspectos fisiológicos del crecimiento de maní en condiciones de invernáculo. En Libro del VI Encuentro Nacional Científico - Técnico de Biología del Suelo - IV Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. OLMEDO, C., THUAR, A. y S. CASTRO (compiladores) versión CD-ROM ISBN 978950-665-4382 (publicado completo).

OLMEDO, C. 2002 *Selección de cepas bacterianas con actividad promotora del crecimiento en soja*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, p.53.

PARKE, J. 1991 Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. En Keister, D. y P. Cregan (Eds.) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 33-42.

PEOPLES, M. y E. CRASWELL 1992. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil* 141: 13-39

PERTICARI, A., PUENTE, M., ECHEGARAY, R. y C. PICCINETTI 2007 Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica del nitrógeno. En THUAR, A., CARSON, F. y C. OLMEDO (compiladores). *De la Biología del Suelo a la Agricultura*. Universidad Nacional de Río Cuarto, pp. 275-291.

PODILE, R. y V. LAXMI 1998 Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF1 increases phenylalanineammonia-lyase and the incidence of fusarila wilt

pigeonpea in leaves of acquired resistant broad bean. *The Plant Journal* 19: 625-633.

SINDHU, S., A. SUNITA SUNEJA, N. GOEL y K. DADARWAL 2002 Plant growth promoting effects of *Pseudomonas* sp. on co-inoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* strain under sterile and 'wilt sick' soil conditions. *Appl. Soil Ecol.* 19: 57-64.

VINCENT, J. 1970 A manual for the practical study of root nodule bacteria. *IBP Handbook* N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 3-4 y 75-76.