

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Agronomía y Veterinaria

“Trabajo Final Presentado para Optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

Potencialidades de *Azospirillum brasilense* como inoculante para el cultivo
de trigo.

Alumno: Sosa, Mauricio Gabriel

DNI: 27896851

Directora:

Dra. Thuar, Alicia

Río Cuarto-Córdoba

Noviembre 2009

Índice del Texto

Certificado de aprobación	I
Dedicatoria	II
Agradecimiento	III
Resumen	IV
Summary	V
Introducción	1
Importancia del cultivo de trigo	1
Empleo de inoculante	2
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	3
Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	4
Mecanismos de promoción directa del crecimiento	5
Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento	6
Hipótesis	8
Objetivos	8
Materiales y métodos	9
Método de cuantificación de la promoción del crecimiento	11
Resultados y discusión	12
Determinación de la longitud total en estado fenológico Z21	12
Determinación del Rendimiento	14
Conclusiones	17
Referencias bibliográficas	18
Anexos	24

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Agronomía y Veterinaria

Certificado de Aprobación

Título del trabajo final:

Potencialidades de *Azospirillum brasilense* como inoculante para el cultivo
de trigo.

Autor: Sosa, Mauricio Gabriel

DNI: 27896851

Directora: Dra. Truar, Alicia

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:

Ing. Agr. Bianco, Cesar

Ing. Agr. Bonamico, Natalia C

Dra. Thuar, Alicia

Fecha de presentación: _____ / _____ / _____

Aprobado por Secretaría académica: _____ / _____ / _____

Secretario Académico

Dedicatoria

A esta tesis se la dedico a Julio mi padre, “-Tronco viejo pensé yo que este ventarrón no lo desgaja me dio su raíces su sombra su sabia su cariño su alma¹-” y a mamá y amigos por toda la ayuda y esfuerzo que me brindaron durante toda la carrera y mi formación como profesional.

¹ Fragmento de “Cuando me fui de las casas”, (poema) ADRIÁN MAGGI.

Agradecimiento

A Julio y Julia mis padres por todo el apoyo que me brindaron durante estos años.

A mis grandes amigos, compañeros y cómplices de implacables resacas. Carla, Marcos y Paola por darme fuerzas para que nunca baje los brazos.

A mi directora Dra. Alicia Thuar por su dedicación, paciencia y colaboración en la realización de la tesis.

A la Dra. Carmen Olmedo, al Dr. Javier Andrés y a Jorge Vázquez por su cooperación y optimismo.

A todos mis amigos y colegas que me acompañaron durante estos años.

Resumen

La biofertilización o inoculación de semillas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), es una práctica agronómica que consiste en mejorar las condiciones vitales de las plantas mediante el agregado de bacterias y hongos. Adoptar esta metodología puede resultar conveniente si lo que se pretende es proveer al cultivo de aportes para la fijación biológica de nitrógeno y de otros estimuladores del crecimiento. Dentro de las bacterias asociativas más estudiadas, se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*. Dicho género fue estudiado en el presente trabajo al evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo a campo con diferentes dosis de fertilizantes. El ensayo se realizó en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Durante el ciclo de desarrollo del cultivo se realizaron evaluaciones de; Longitud media de las raíces en Z21 y a cosecha se evaluó el rendimiento en $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. La Longitud de raíces mostró diferencia significativa importante entre los diferentes tratamientos. A cosecha, los rendimientos mostraron en general diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos con mayor nivel de fertilización.

Palabras clave: inoculación, *Azospirillum*, trigo, rendimiento.

Summary

The biofertilization or inoculation of promotional seeds with rizobacterias of the vegetal growth (PGPRs), is an agronomic practice that consists of improving the vital conditions of the plants by means of the aggregate of bacteria and fungi. To adopt this methodology can be advisable if what is tried it is to provide to the culture of contributions for the biological fixation of nitrogen and other stimulators with the growth. Within the studied associative bacteria more, are the pertaining ones to the *Azospirillum* sort. This sort was studied in the present work when evaluating the effect of the inoculation with *Azospirillum brasilense* in wheat to field with different doses from fertilizers. The test was realized in the experimental field of the Univerisdad Nacional de Río Cuarto. During the development cycle of the crop evaluations of the average length by the roots were realized in Z21 and, to harvest, I evaluate the yield in $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. The length by roots showed a significant difference between the realized treatments. Harvest, the yields generally showed significant differences for the treatments with greater level of fertilization.

Key words: inoculation, *Azospirillum*, wheat, yield

Introducción

Importancia del cultivo de trigo

El cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) es de gran importancia económica por su amplia difusión mundial, lo que lo convierte en el principal cultivo por superficie sembrada. Ocupando un área total de 218.200000 de hectáreas, con una producción mundial de 621.900.000 tn (29,78 % de la producción mundial de granos) (SAGPyA, 2006).

En Argentina la campaña 2005/06 tuvo una superficie sembrada de 5.212.450 ha. (2,38 % de la superficie mundial) con una producción de 12.575.176 tn (2 % de la producción mundial), con un rendimiento promedio de 25,32 qq.ha⁻¹ (SAGPyA, 2006). En la actualidad, el mercado interno absorbe entre 4 y 5 millones de tn siendo el principal destino la elaboración de harinas de panificación, mientras que el excedente se exporta, principalmente con destino al MERCOSUR (Clarín Rural, 2004). En la pampa húmeda, Córdoba se encuentra en el segundo lugar en cantidad producida y superficie sembrada (SAGPyA, 2004). Los suelos en esta región son de texturas gruesas, con contenidos de materia orgánica medios a bajos por lo que las reservas de agua edáficas son normalmente limitantes para la obtención de cultivos de alta producción (Díaz Zorita *et al.* 1998). El rendimiento del cultivo de trigo depende de la cantidad y disponibilidad tanto de agua como de nutrientes en el suelo para crecer y desarrollarse (Espósito *et al.* 2001).

En Argentina, la intensificación del uso agrícola de los suelos durante los últimos años no ha sido acompañada con una práctica adecuada de fertilización. Los contenidos de fósforo (P) y nitrógeno (N) de los suelos han disminuido en forma significativa debido a la extracción de los cultivos, a la erosión, a la insolubilización causadas por el manejo inadecuado y a las prácticas de cultivo. Paralelamente, la baja reposición de nutrientes por medio de fertilizantes, y solo basadas en diagnósticos y recomendaciones económicas óptimas, ha hecho evidente el balance negativo entre la tasa de extracción y la fertilización (García y Annone, 2004).

En los últimos años se ha difundido la utilización de inoculantes biológicos que han demostrado tener un efecto positivo, junto al uso de fertilizantes, y un gran impacto sobre el

rendimiento de muchos cultivos (Nahas, 1996; Schreiner *et al.* 1997; Mohammad, *et al.* 1998).

Empleo de inoculante

El empleo de microorganismos en las prácticas agrícolas cuenta con remotos antecedentes. En 1886 Hellriegel y Wilfarth, dos científicos alemanes, descubren la existencia de una asociación simbiótica entre plantas de leguminosas y bacterias, las cuales pudieron ser aisladas. Por su parte, en 1890 otros dos científicos alemanes, Nobbe y Hiltner, demuestran las ventajas de adicionar cultivos puros de estas bacterias (grupo al que hoy denominamos rizobios) al sembrar las semillas de leguminosas. Es así como surge el concepto de la inoculación y la posibilidad de una producción industrial de inoculantes.

En la actualidad la utilización de fertilizantes biológicos aplicados como tratamientos de semillas es una práctica que está siendo cada vez más estudiada y utilizada por los productores. Diversos trabajos han informado resultados promisorios cuando la fertilización química fue complementada por la adición de microorganismos que producen una mejora del estado fisiológico del cultivo y facilitan la absorción de nutrientes. El caso más conocido es la interacción entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium* que posibilitan la fijación biológica de nitrógeno (N) (Racca, 2003), la cual es la más conocida (Gibson y Nutman, 1960; Pate, 1973). Las bacterias del género *Azospirillum*, son organismos fijadores de N de vida libre, que habitan la rizósfera del suelo. Okon y Labandera-González (1994) mencionan una estimulación en el crecimiento de raíces, que aumentaría su longitud, densidad y velocidad de crecimiento. También promueve la producción de auxinas, lo cual incrementaría la tasa de crecimiento aéreo y radicular. Esto se vería reflejado en una mayor absorción de agua y nutrientes. Sin embargo es muy abundante la información que apunta a fitohormonas como el AIA (ácido 3-indol acético) como responsable de las respuestas cuando es descartada la vía de más nutrientes absorbidos (Caballero-Mellado 2002). De una amplia revisión realizada por Okon y Labandera-González (1994) se pueden citar un 60 a 70% de experiencias con resultados favorables respecto al éxito de la inoculación con incrementos de rendimientos que oscilan entre 5 y 30% (Bashan, 1999).

La información en la actualidad es muy abundante, pero cada vez es mayor el volumen de trabajos de enfoque tecnológico en donde se estudia la respuesta vegetal en cultivos de interés comercial, analizando las interacciones con otras variables de manejo. Este es el caso de un gran número de experimentos que analizan la interacción en maíz y trigo entre la inoculación con *Azospirillum* y la respuesta al agregado de N. Si bien existen muchos informes en donde las ventajas resultan en la posibilidad de ahorro de fertilizantes (40 a 50%) (Caballero, 2002), es también muy abundante y consistente aquella en la cual se observan efectos aditivos, en forma independiente del agregado de nutrientes, (Diaz Zorita *et al.* 2006).

Olmedo *et al.*, (2002), observaron que los tratamientos con PGPR del género *Azospirillum brasilense*, más urea y fosfato presentaron una mayor longitud radicular. Esas diferencias se mantienen en los variables peso seco del sistema radical y de la biomasa aérea en estado Z3 o fin de macollaje e iniciación floral según escala de Zadoks *et al.*, 1974 de un cultivo de trigo a campo; estos resultados coinciden con los obtenidos por Okon, (1998) cuando inoculo semillas de trigo con *Azospirillum brasilense* encontrando 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.

En Argentina, 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).

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son bacterias aisladas de la rizósfera y cuando son inoculadas sobre los cultivos o en el suelo colonizan las raíces de la plantas, incrementan el crecimiento de la planta o reducen el daño de algunas enfermedades. El manejo de estos microorganismos del suelo (PGPR), que está involucrado en varios ciclos biogeoquímicos (C, N, P, S, etc.), salud de las plantas, y recuperación de los suelos ofrece nuevas posibilidades de tratamientos biológicos. En suelos agrícolas, el mejoramiento de la calidad y la diversidad de las poblaciones microbianas a partir de la incorporación de cepas seleccionadas según sus funciones específicas es un proceso

relevante que contribuye al mejor establecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos siendo una alternativa para lograr mejores cultivos (Caballero- Mellado, 2002).

Básicamente, son dos los mecanismos o procesos que explican las respuestas de los cultivos a la inoculación con cepas de PGPR: (a) procesos directos, que favorecen el estado nutricional de los cultivos (incluyendo agua) basados en incrementos en la disponibilidad de nutrientes o aumentando la superficie de raíces para una mejor captación de agua y nutrientes, y (b) procesos indirectos a partir de la interacción con otros microorganismos o cambios en el metabolismo de las plantas que facilitan su crecimiento (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Algunas cepas PGPR han sido aisladas y multiplicadas permitiendo la formulación de inoculantes y su aplicación bajo condiciones extensivas de producción (Bashan, 1999). Una de éstas es *Azospirillum brasilense*, y como resultado de su aplicación se muestran efectos positivos sobre el crecimiento y los rendimientos de cultivos a partir de la acción de fitohormonas, estimulantes genéticos y también por su contribución en la fijación libre de nitrógeno (Bashan y Levanony, 1990, Okon y Labandera-González, 1994). Por ejemplo, en Argentina algunos estudios en trigo han mostrado beneficios sobre su crecimiento aéreo y de raíces, en los componentes del rendimiento (aumento en el número de granos) y en la producción de granos luego de la aplicación de formulaciones líquidas específicas y con variados métodos de tratamiento en maíz, algodón, girasol y otros cultivos (Díaz-Zorita *et al.*, 2006).

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden actuar sobre el vegetal de dos maneras diferentes, directa o indirectamente. La influencia directa, consiste en que las bacterias le proporcionan a la planta compuestos sintetizados por ellas mismas, produciéndole un beneficio a la planta. Estos compuestos pueden ser la producción de fitohormonas, la liberación de fosfatos y micronutrientes, la fijación de nitrógeno y producción de sideróforos. El efecto indirecto que causa las PGPR es la alteración de la ecología y el ambiente de la raíz (Bowen y Rovira, 1991; Glick, 1995; Hornby, 1990; Kapulnik, 1991; Lynch, 1990^a, 1990^b, 1990^c; Okon y Hadar, 1987) por ejemplo, actuando como agentes de biocontrol y reduciendo las enfermedades mediante la liberación de

sustancias antibióticas que matan microorganismos nocivos, por competencia con agentes deletéreos y metabolismo de productos tóxicos.

Estos métodos suponen una alternativa potencial porque es un método de control biológico y su utilización como herramienta biotecnológica parece una esperanzadora realidad que reduzca los impactos adversos de agroquímicos, y permita una gestión más razonable y sostenible del suelo.

Mecanismos 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 y Vanderleyden, 2000).

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

La inoculación de plantas de trigo con la mutante de *Azospirillum 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 de 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 éstos tienden a acumularse en el suelo en forma de compuestos insolubles (Richardson, 1994).

La disponibilidad del fósforo en el suelo depende principalmente de la actividad microbiana. Los estudios para mostrar que se podía mejorar la disponibilidad de fósforo fueron realizados con *Bacillum megaterium* y *Pseudomonas fluorescens* mostrando que estas bacterias pueden incrementar la disponibilidad de fósforo para las plantas porque ellas solubilizan fosfato orgánico por la acción de fosfatasas (mineralización) o por solubilización de fosfatos inorgánicos no disponibles con ácidos orgánicos. Distintos autores han propuesto que se produce un mejor desarrollo del sistema radical de la planta y mejora la sanidad (Gerretsen, 1948, Katznelson y Bose, 1959, Kloepper, 1993). Otros investigadores sugieren que mejora la absorción del mineral (Bashan y Levanony, 1990).

Diversos estudios han demostrado que la solubilización del fosfato por microorganismos solubilizadores es una importante característica de diversas cepas PGPR (Kloepper *et al.*, 1989, Kucey *et al.*, 1989). En experimentos de invernáculos, Thuar (2005), demostró que algunos microorganismos solubilizadores estimulan el crecimiento de maíz. La solubilización de fosfato puede ser importante para la planta porque es un elemento esencial y por su baja disponibilidad.

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 previamente fijado por las bacterias (Frioni, 1999).

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

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

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 quelatos (sideróforos) que se unen al Fe, transportándolo al interior de la célula microbiana y luego lo hacen aprovechable para el

crecimiento de la bacteria (Neilands y 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 y 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: Son sustancias orgánicas sintetizadas por bacterias para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos para las plantas.

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

Producción de Cianida de Hidrógeno: Este compuesto puede producir dos efectos antagónicos, por un lado induce mecanismos de defensa frente a organismos fitopatógenos y por otro induce alteraciones en las actividades fisiológicas de las plantas.

La facultad de algunas *Pseudomonas* sp 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).

Hipótesis

La utilización de inoculante con diferentes dosis de fertilizantes promueve el crecimiento de plantas de trigo.

Objetivos:

Objetivo general:

- * Evaluar a campo, el efecto que produce la utilización de *Azospirillum brasilense* en trigo con diferentes dosis de fertilizantes.

Objetivos específicos:

- * Evaluar si hay interacción entre los factores inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización nitrogenada, para el crecimiento del largo de las raíces y el rendimiento en el cultivo de trigo.
- * Evaluar el efecto en el crecimiento del largo de las raíces y el rendimiento de cada factor por separado, en caso de ser no significativa la interacción entre inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización nitrogenada en el cultivo de trigo.

Materiales y métodos.

El ensayo se realizó el año 2005 en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ubicado en la ruta provincial número 36 Km 601, de la localidad de Las Higueras, 33° 17' latitud sur, 64° 14' longitud oeste.

El clima está caracterizado por un régimen de precipitaciones Monzónico, que concentra el 80% de las lluvias en el período de octubre a abril. La precipitación media anual es de 801,2 mm con valores extremos mínimos de 451,1 mm en el año 1989 y máximos de 1195,2 mm en el año 1984, para la serie 1974–1993 (Séiler *et al.* 1995).

La precipitación (Figura 1) hasta la siembra fue de 426 mm. El perfil se encontraba cargado de humedad a capacidad de campo hasta 1,60 metros de profundidad y durante el desarrollo del cultivo llovió 107 mm.

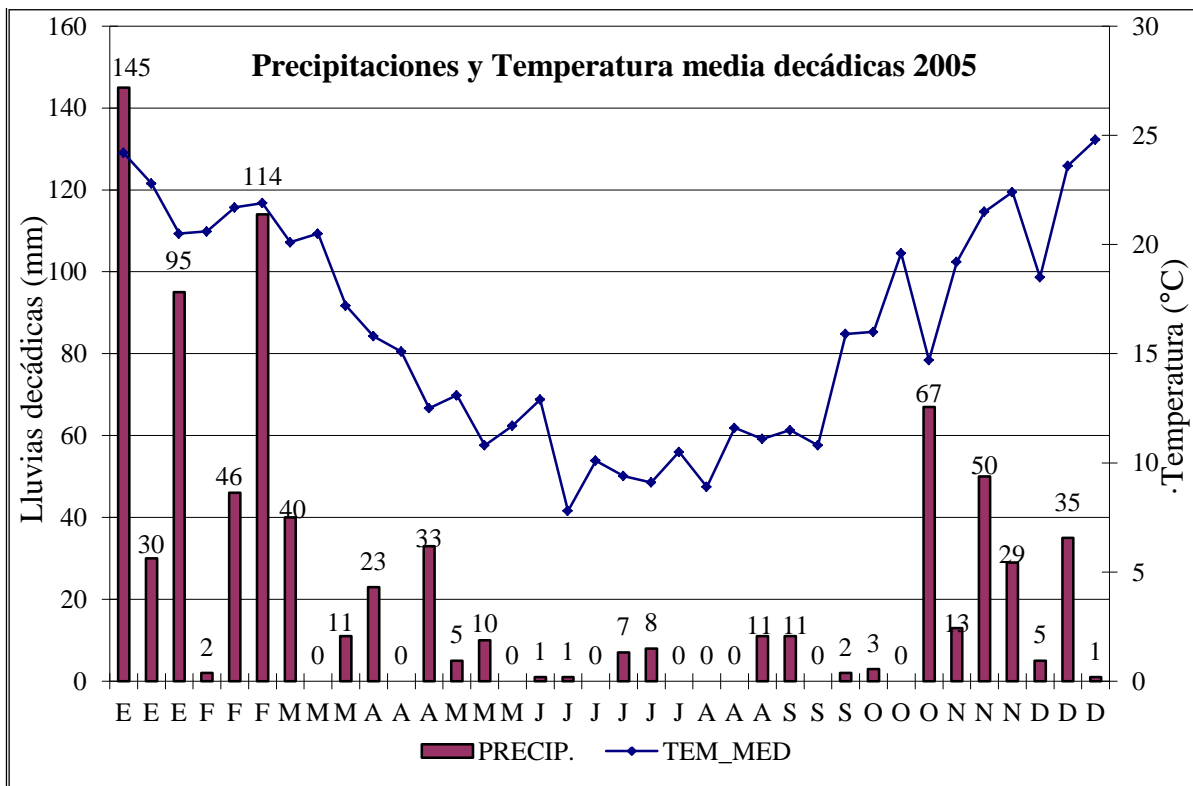


Figura 1. Condiciones meteorológicas durante el ciclo del cultivo (2005), Río Cuarto.

El suelo, es un Hapludol Típico. De textura franco arenoso a franco arenoso fino. Las características químicas del mismo se detallan en la Cuadro 1.

Cuadro 1: Características fisicoquímicas del suelo al momento de la siembra,

Datos analíticos del perfil	*Valor analítico del perfil
Materia orgánica	2,56%
Nitrógeno de nitratos	5,30 ppm
Nitratos	23,5 ppm
Nitrógeno total	0,13%
Fósforo	80,00 ppm
Ph	6,2
Humedad	20,71%

*Profundidad de 0 -20 cm.

El cultivo antecesor fue alfalfa, el cual se realizó un barbecho previo el 10 de enero del 2005; la siembra se realizó el 03 de agosto del 2005, con una sembradora de ensayos experimentales que posee una distancia entre surco de 17,5 cm en sistema convencional, El cultivar utilizado es de ciclo corto Klein Don Enrique con una densidad de 140 kg.ha⁻¹. Se evaluaron 6 tratamientos con 4 repeticiones en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2x3. El factor inoculante con 2 niveles, sin inoculante y con inoculante, y el factor fertilizante con 3 niveles de fertilizante (A: 0 gr de urea por m²; B: 38 gr de urea por m²; C: 77 gr de urea por m²), El número de parcelas fue 24 y cada una fue de 7 m². La fertilización C es empleada porque es aquella requerida para alcanzar el máximo rendimiento del lote donde se realizó el ensayo.

El inoculante empleado fue una marca comercial, Nitrasoil. El recuento de bacterias a la fecha de elaboración fue de: 1 x 10⁹ ufc.ml⁻¹. El inoculante se empleó a una dosis de 1 litro por cada 100 kg de semillas de trigo.

Las semillas se trataron con fungicida comercial Duo 25 Flow Nitrasoil (cardendazin 25gr.; tizam 25gr.). No se realizaron controles químicos de malezas, controlándolas mecánicamente con azada. Durante el ciclo del cultivo se realizaron tres controles.

Los tratamientos fueron:

Tratamiento 1

Semilla sin inocular y tratada con el nivel de fertilizante (A).

Tratamiento 2

Semilla sin inocular y tratada con el nivel de fertilizante (B).

Tratamiento 3

Semillas sin inocular y tratadas con el nivel de fertilizante (C).

Tratamiento 4

Semillas inoculadas con inoculante comercial (*Azospirillum brasilense*) y tratada con el nivel de fertilizante (A).

Tratamiento 5

Semillas inoculadas con inoculante comercial (*Azospirillum brasilense*) y tratada con el nivel de fertilizante (B).

Tratamiento 6

Semillas inoculadas con inoculante comercial (*Azospirillum brasilense*) y tratada con el nivel de fertilizante (C).

Método de cuantificación de la promoción del crecimiento

Las mediciones efectuadas durante el ciclo de crecimiento del cultivo fueron: en el estado Z21 (tres hojas y un macollo) la longitud total de raíces utilizando el método de intersección de líneas (Newman, 1966) y el rendimiento con cosecha manual con 14% de humedad en 1 m² y trilla en el laboratorio en el estado Z9 (madurez fisiológica) (Zadoks *et al.* 1974).

Los datos obtenidos fueron evaluados, con el programa InfoStat, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y el Test Tukey de comparaciones múltiples de las medias con un nivel de significancia del 5%, se probó el supuestos de normalidad de residuos con la prueba de Shapiro-Wilks (modificado).

Resultados y discusión

La respuesta a la inoculación varía en función del grado de fertilidad y la disponibilidad de agua de los suelos, observando la gran importancia que puede adquirir la relación cepa – cultivar (Rodríguez Cáceres *et al.* 1996).

Determinación de la longitud total de raíces en estado fenológico Z21

La longitud de crecimiento de raíces nos da un panorama del posible incremento en la exploración de suelo. En el trigo inoculado en el estado Z21 se obtuvo que no hay interacción estadísticamente significativa con una probabilidad de $p=0.6398$, los efectos de los factores actúan independientemente (Cuadro 2). Hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) entre los niveles de *Azospirillum brasilense* en la longitud de raíz y diferencias significativas ($p = 0.0053$) entre los niveles de fertilizante.

Hay evidencia para aceptar que los datos siguen una distribución normal ($p=0,8414$) (anexo).

Cuadro 2. Análisis de la varianza para la longitud de raíces en el estado Z21.

Fuente de variación	Sc	gl	CM	F	p-valor
<i>Azospirillum</i>	4886,62	1	4886,62	33,93	<0.0001
Fertilizante	2050,14	2	1025,07	7,12	0.0053
<i>Azospirillum</i> *Fertilizante	131,87	2	65,94	0,46	0.6398
Error	2592,32	18	144,02		
Total	9660,95	23			

SC = Suma de cuadrados; gl = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

El trigo inoculado con *Azospirillum brasilense* obtuvo un crecimiento en el estado Z21 en la longitud de las raíces de 126,53 cm, contra 98,00 cm de crecimiento en longitud del

trigo no inoculado, (Cuadro 3). El uso de inoculante (*Azospirillum brasilense*) otorgó mayor desarrollo de la raíz en su longitud en 28,56 cm.

Cuadro 3. Valores originales correspondientes al promedio de longitud de raíces de las 4 repeticiones.

Tratamiento	Longitud de raíz (cm) *
Sin <i>Azospirillum</i>	98 a
Con <i>Azospirillum</i>	126,53 b

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) Test: Tukey Alfa=0.05
DMS=10.29248.

El Figura 2 muestra la diferencia obtenida en la longitud media de las raíces de trigo inoculado y no inoculado con *Azospirillum brasilense* dando un marcado incremento del 27,47% a favor de la inoculación.

Estos datos coinciden con los observados por Abatedaga y Thuar, 2004, en donde la longitud radical en la etapa de macollaje se incremento con la inoculación fertilizada con 50 PDA/25 urea mostrando diferencias estadísticamente significativas con los testigos fertilizados y sin fertilizar.

En la interacción bacteria-fertilizante, no se presentaron diferencia significativa al 5%.

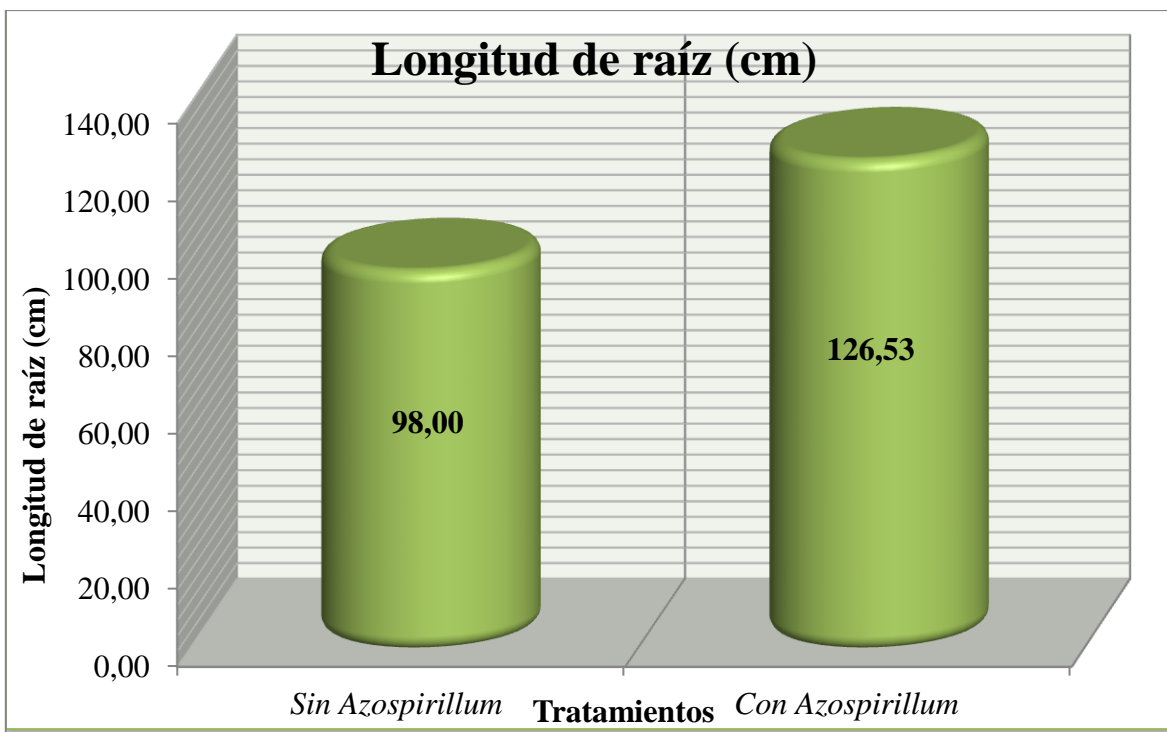


Figura 2. Longitud total de raíces (cm). Test: Tukey

En el Cuadro 4 se presentan los resultados conseguidos con diferentes dosis de fertilizantes encontrando diferencias estadísticamente significativa en Z21 entre las dosis A (0gr) y C (77gr) de urea con la dosis B (38gr), siendo la respuesta de estas en la longitud de raíz de 124,82 cm un 16,94% más largo que la obtenida con la dosis A y un 21.45% mayor que la obtenida con la dosis C.

En la interacción bacteria-fertilizante, no se presentaron diferencia significativa al 5%.

Cuadro 4. Longitud total de raíces (cm) correspondientes al promedio de longitud de raíces de las 4 repeticiones.

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)*
77 gr de urea	102,79 a
0 gr de urea	109,21 a
38 gr de urea	124,8 b

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=15.31264.

Determinación del rendimiento

El rendimiento en grano no es solo el resultado final de un cultivo, sino que además es la consecuencia de interacciones entre el genotipo, el ambiente y el manejo cultural producidas en forma continua a través del ciclo del cultivo (Miralles y Slafer, 2001).

Para los rendimientos del cultivo de trigo, en este ensayo y para esta situación se obtuvo que hay interacción estadísticamente significativa con una probabilidad de $p=0.0052$ (Cuadro 5).

Hay evidencia para aceptar que los datos siguen una distribución normal ($p= 0,2213$) (Anexo).

Cuadro 5. Análisis de la varianza para el rendimiento.

Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	p-valor
<i>Azospirillum</i>	504655.10	1	504655.10	9.37	0.0067
Fertilizante	2210129.37	2	1105064.68	20.52	<0.0001
<i>Azospirillum</i> *Fertilizante	769894.61	2	384947.30	7.15	0.0052
Error	969409.88	18	53856.10		
Total	4454088.96	23			

SC = Suma de cuadrados; gl = Grados de libertad; CM = Cuadrado medio.

Si analizamos la magnitud de las repuestas en kg de granos.ha⁻¹ entre los tratamientos (Cuadro 6 y Figura 3). Se encuentra diferencia estadísticamente significativa a favor del tratamiento 6 el cual obtuvo 795,86 kg más de producción de granos.ha⁻¹ (43,1% de incremento) que el tratamiento 3.

Comparando los valores obtenidos en el tratamiento 6 con los tratamientos 2 y 5, la diferencia a favor del tratamiento 6 oscila en promedio en 1086,62 kg.ha⁻¹ (69% de incremento).

En los tratamientos 1 y 4 se alcanzó una diferencia de 1041,81 kg.ha⁻¹ (62,3% incremento) y 954,16 kg.ha⁻¹ (56,5% incremento) respectivamente a favor del tratamiento 6.

Díaz Zorita *et al.* (2004), encontraron que en promedio para 160 casos en 2 campañas (2002-2003) la inoculación con *A. brasilense* indujo a aumentos en el rendimiento (significativos estadísticamente) de 236 kg.ha⁻¹, equivalente al 8% más sobre el control sin inoculante.

Espósito *et al.* (2002), hallaron como respuesta favorable a la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de trigo en un 25,30% más (678 kg.ha⁻¹) en promedio comparado con el testigo, cuando la disponibilidad hídrica luego de la aplicación y al momento de la floración no fue una limitante.

Cuadro 6. Valores originales en kg.ha⁻¹ correspondientes al promedio de rendimiento de las 4 repeticiones.

Tratamiento	Rendimiento kg. ha⁻¹*	
Testigo + 38grUrea (2)	1548,96	a
<i>Azospirillum</i> +38grUrea (5)	1562,48	a
Testigo + 0grUrea (1)	1627,53	a
<i>Azospirillum</i> +0grUrea (4)	1688,18	a
Testigo + 77grUrea (3)	1846,49	a
<i>Azospirillum</i> +77grUrea (6)	2642,36	b

*Letras distintas indican diferencias significativas al 5% de probabilidad según Test Tukey. Alfa=0.05 DMS=521.57548.

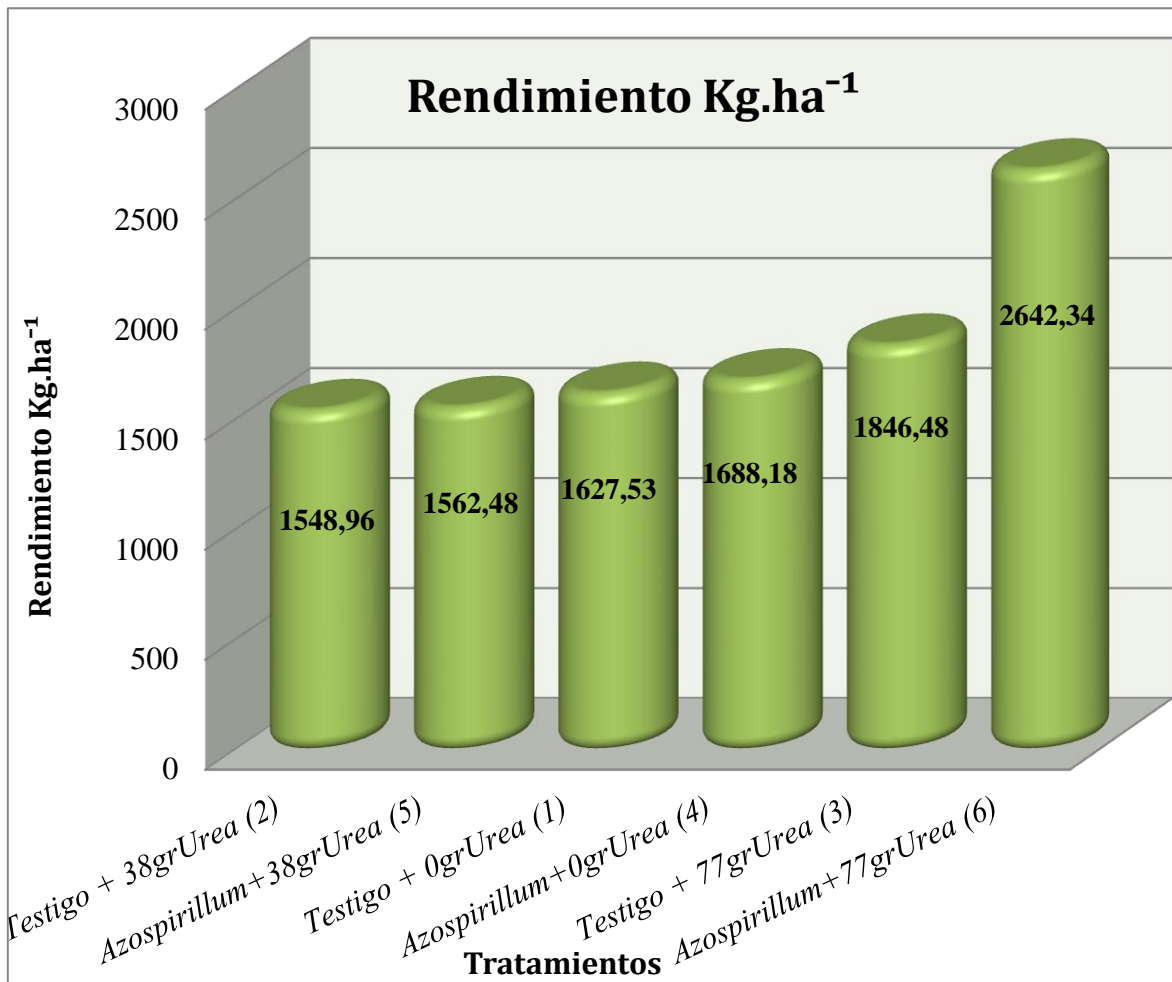


Figura 3. Rendimiento del cultivo de trigo

Conclusiones

Los resultados permiten concluir que la inoculación con bacterias del género *Azospirillum brasilense* y diferentes dosis de fertilizante nitrogenado produce un efecto positivo sobre el cultivo de trigo, observando incrementos estadísticamente significativa en distintas variables como el desarrollo en la longitud de raíces y el rendimiento.

En el rendimiento se encontró respuesta positiva en la dosis más alta de urea, siendo mayor la respuesta en tratamientos inoculados con *Azospirillum brasilense*.

Se observaron respuestas positiva significativas en el desarrollo de la longitud de raíces y el rendimiento cuando se inoculó con *Azospirillum brasilense*.

Con respecto a la fertilización nitrogenada se encontró respuesta positiva en la longitud de raíces y el rendimiento, a medida que se incrementó la dosis de urea.

No se encontró interacción significativa entre la bacteria *Azospirillum brasilense* y el fertilizante nitrogenado para la variable longitud de raíz, es decir, que ambos factores provocaron respuestas en el cultivo, independientes para esta variable.

Se encontró interacción estadísticamente significativa entre el factor inoculante (*Azospirillum brasilense*) y el fertilizante nitrogenado para la variable rendimiento evaluado en el ensayo, es decir, que ambos factores provocaron respuestas en el cultivo actuando simultáneamente.

La inoculación con *Azospirillum brasilense*, además de los beneficios primarios por mejora del potencial en buenos ambientes, podría ser un factor clave de estabilidad en aquellos en donde el potencial finalmente se vea imposibilitado de ser concretado, como ocurrió frente a un déficit hídrico en el período que comprendió esta evaluación.

Referencias bibliográficas

- ABATEDAGA, M. y A, THUAR. 2004. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Departamento de Biología Agrícola Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto.
- BARBIERI, P., E. ZANELLI GALLI and G. ZANETTI. 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.
- BASHAN, Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp in soils: a review. **Biol Fertil Soils.** 29: 246-256.
- BASHAN, Y., and H. LEVANONY 1990 Current status of *Azospirillum* inoculation technology; *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Can J. Microbiol.** 36: 591-608.
- BOWEN, G.D. and A D. ROVIRA 1991. The rizophre, the hidden half. pp. 661-669. In: y waisel, a. Eshel and u. Kafkafi (eds). **Plants roots, the hidden half.** Marcel Dekker, New York.
- BRIAT, J.F. 1992. Iron assimilation and storage in prokaryote. **J. Gen. Microbiol.** 138: 2475-2483.
- BROWN, ME.; 1974. Seed and root bacterization. **Annual Rev. of Phytopathology** 12: 181-197.
- CABALLERO-MELLADO, J. 2002. El género *Azospirillum*. In: Microbios en Línea. Cap. 14. Ed.: Dra. Martínez Romero, E y J. Martínez Romero.
- CASTIGNETTI, D and J JR. SMARRELLI. 1986. Siderophes, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. **FEBS Lett.** 209: 147-151.
- CLARÍN RURAL 2004. El gran libro de la siembra directa, desarrollo agrícola y difusión del sistema. Capítulo 1.
- 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.
- DÍAZ ZORITA M., M. PEPI y G. GROSSO 1998. Estudio de las precipitaciones en el oeste bonaerense. EEA INTA Gral Villegas. Publicación Técnica Número. 23: pp. 15.

DÍAZ ZORITA M., RM. BALIÑA., M. FERNÁNDEZ-CANIGIA y A. PERTICARI 2004. Producción de cultivos de trigo inoculados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Actas de Congreso. Congreso “A Todo Trigo”. pp. 205-209. **Mayo de 2004**. Mar del Plata, Argentina.

DÍAZ ZORITA, M., RM. BALIÑA, MV. FERNÁNDEZ-CANIGIA y A. PERTICARI 2006. Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasilense*. INPOFOS **Informaciones agronómicas** 29: 17-19.

DOBBELAERE, S. A. CROONENBERGHS., A. THYS., D. PTACEK., J. VANDERYDEN., P. DUTTO., C. LABANDERA-GONZALZ., J. CABALLERO-MELLADO., J.F. AGUIRRE., Y. KAPULNIK., S. BRENER., S. BURDMAN., D. KADOURT., D. SARIG and Y. OKON. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *azospirillum*. **Plant Physiol.** 28: 871-879.

ESPÓSITO G., J. GESUMARIA., C. CASTILLO., R. BALBOA y W. ASNAL 2002. Respuesta del cultivo de trigo bajo siembra directa a la fertilización nitrogenada y fosfatada. Centro Agrícola. Revista del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. **Año** 29 (1), 64:70.

ESPÓSITO G., J. GESUMARIA y C. CASTILLO 2001. Fertilización del cultivo de trigo. Material didáctico cátedra Producción Vegetal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

FRIONI, L. 1999. **Procesos microbianos**. Tomo II. Ed Fund. UNRC. ISBN: 950-665-109.

GARCÍA, R.J. y G. ANNONE 2004. Efecto de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) sobre el rendimiento del trigo (*Triticum aestivum* L.) y la eficiencia de uso de fertilizantes. EEA INTA Pergamino.

GERRETSEN F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. **Plant and Soil.** 1:51-81.

GIBSON. A and P. NUTMAN 1960. **Ann Bot. London**, 24: 420-433.

GLIK, 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.
- HELLRIEGEL, H. y H WILFARTH 1886. NITRAGIN 2002. **Guía de Inoculación Nitragin Argentina.** Página <http://www.nitragin.com.ar/guiainoc.asp#Introducción>.
- HORNBY, D., 1990. Root disease, pp. 233-528. In: Lynch J.M. (ed). **The rhizosphere.** Wiley, chichester, u.k.
- KAPULNIK, Y., 1991. Plant **growth-promoting rhizobacteria**, pp.717-729. In: y waisel, a. Eshel and u. Kafkafi (eds). *Plants roots, the hidden half.* marcel dekker, New York.
- KATZNELSON, H. and B. BOSE. 1959. Metabolic activity and phosphate- dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere soil. **Can. J. Microbiol.** 5:79-85.
- KLOEPPER, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. **Soil Microbial Ecology** (Ed) F,B. Metting Jr 255-274.
- KLOEPPER, J.W., R. LIFSHITZ and R.M. ZABLOTOWICZ. 1989. Free-living bacterial inoculate for enhancing crop productivity. **Trends Biotechnol.** 7: 39-43.
- KUCEY, R.M.N., H.H. JANZEN and M.E. LEGGET 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorous. **Adv. Agron.** 42: 199-228.
- LIPPMAN, B., V. LEINHOS and H. BERGMANN. 1995. Influence of auxin producing rhizobacterias 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.
- LYNCH, J.M. (ed), (1990^a) **The rhizosphere.** Wiley, chichester u.k.
- LYNCH, J.M. (1990^b) Introduction: 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. (1990^c). Beneficial interactions between microorganisms and roots. **Biotech. Adv.** 8:335-346.

- MIRALLES D. Y G. SLAFER 2001. Desarrollo, crecimiento y determinación de los componentes del rendimiento. Trigo: Cuaderno de actualización Técnica N° 63. CREA. pp. **10-17. Marzo de 2001.**
- MOHAMMAD, M.J., W.L. PAN and A.C. KENNEDY. 1998 Seasonal mycorrhizal colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under dryland conditions. **Mycorrhiza**. 8 (3): 139-144.
- NAHAS, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 12 (6): 567-572.
- NEILANDS, J.B. and S.A, LEONG. 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
- NOBBE, F. y L, HILTNER 1890. Citado en NITRAGIN 2002. **Guía de Inoculación Nitragin Argentina**. <http://www.nitragin.com.ar/guia inoc.asp#Introducción>
- OLMEDO C., A THUAR., E. RIBERIE y G. AVANZINI 2002. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en un cultivo de trigo a campo. **XXI Congreso Argentino de la Ciencia de Suelo**. pp. 37.
- OKON Y. 1998 In: **Nitrogen fixation hundred years after**. pp 741-746.
- OKON Y. and Y. HADAR. 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. **CRC Critical Rev. In Biotechnol**. 6:61-85.
- OKON Y. and C. LABANDERA-GONZÁLEZ 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* Vol 26 (12): 1591-1601.
- PATE, J.S. 1973. **Soil Biol. y Bioch.** 5: 109-119.
- RACCA, R. 2003. Fijación biológica de nitrógeno. En : **II Simposio de Fertilidad y Fertilización en Siembra Directa. XI Congreso Nacional de AAPRESID**. Tomo 2. pp 197-208.
- RICHARDSON, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil Biota. Management in sustainable Farming Systems*. Ed. C.E. Pankhurst. pp.50-62.

- RODRÌGUEZ CACERES E.D., C. DI CIOCCO. y J.C. PACHECO BASURCO. 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.
- SAGPyA. 2004. Estimaciones agrícolas cereales trigo. En: "http://www.sagpya.gov.ar" Consultado: 01-12-2005.
- SAGPyA. 2006. Estimaciones agrícolas- cereales – trigo. En: "http://www.sagpya.gov.ar" Consultado: 28-03-2008.
- SCHREINER, RP., K.L MIHARA., H. Mc DANIEL and G.J. BETHLENFALVAY. 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. **Plant and Soil**. 188 (2): 199-209.
- SEILER R A., R. FABRICIUS., V. R. ROTONDO y M.G. VINOCUR 1995. Agroclimatología de Río Cuarto – 1974/1993. Volumen I. Cátedra de agrometeorología. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Imprenta y publicaciones UNRC. **Agosto 1995**.
- STEENHOUDT, O. and J. VANDERLEYDEN. 2000. Azospirillum, a free-living ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 487-506.
- THUAR, A. 2005. **Desarrollo de la Aplicación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en un Cultivo de Maíz**. Informe final ensayo Rizobacter Argentina Universidad Nacional Río Cuarto. Campaña 2004-2005.
- TIEN T.M., M.H. GASKINS D and .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., P.A.H. KABER and C.M.J. PIETERSEN. 1998. Systematic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Ann. Rev., Phytopathol**, 3:453-483.
- VENTIMIGLIA L., H. CARTA y S. RILLO 2000. Inoculación con *Azospirillum*. Cuadernillo Clásico. **Revista Agromercado** N° 44: Trigo, Pp. 60-62.
- VERRI, M., C. CASTILLO., G. ESPOSITO., R. BALBOA y A. THUAR. 2004. **Respuesta del Cultivo de Trigo (*Triticum aestivum L.*) a la Inoculación con *Azospirillum brasilense*., Fertilizado con Diferentes Dosis de Nitrógeno**. Producción de Cereales. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC.

VOISARD, C., C. KEEL., D. HAAS and G. DEFAGO. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO J.** 8: 351-358.

ZADOKS J. C., T.T. CHANG and C.F. KONZAK 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. **Weed Res** 14: 415-421.

Anexo

Longitud de raíz:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO Longitud de raíz	24	0.00	10.62	0.97	0.8414

Rendimiento:

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO Rendimiento	24	0.00	205.30	0.93	0.2213