

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Agronomía y Veterinaria

Trabajo Final presentado para optar el Grado de Ingeniero Agrónomo



Creer... Crear... Crecer...

“Evaluación del efecto de la inoculación en trigo con *Azospirillum brasilense* a campo bajo distintas dosis de fertilización”

Alumno: Alfredo Castañeira

D.N.I: 29.707.298

Director: Dra Carmen Olmedo

Río Cuarto - Córdoba

Diciembre del 2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

**Titulo del trabajo final: “Evaluación del efecto de la inoculación en trigo con *Azospirillum
brasiliense a campo* bajo distintas dosis de fertilización ”**

Autor: Alfredo Castañeira

DNI: 29.707.298

Directora: Dra. Carmen Olmedo

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del jurado evaluador:

Doctora Kraus Teresa

Dra Olmedo Carmen

Dra Thuar Alicia

Fecha de presentación: -----/-----/-----

Aprobado por secretaria académica: -----/-----/-----

Secretario académico

Resumen

Argentina, ha tenido un aumento en la producción de soja en los últimos años, algunas de las causas que podrían explicar este proceso es: la expansión de la frontera agrícola, el aumento de las hectáreas sembrada con soja, de la mano con la utilización de tecnologías como la siembra directa. En nuestro país, el trigo posee un rol muy importante en la intensificación y aumento de la superficie destinada a cultivos de soja. La rotación trigo-soja se ha adaptado adecuadamente, siendo el trigo quien aporta la materia orgánica para mantener la sustentabilidad del sistema suelo-planta. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación en trigo con *Azospirillum brasiliense* bajo distintas dosis de fertilización. El ensayo se realizó en el campo de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en localidad de “Las Higueras”, a 5 km. al noreste de la ciudad de Río Cuarto, el perfil descrito corresponde a un Hapludol Típico. Los tratamientos se inocularon con *Azospirillum brasiliense*, bajo distintas dosis de fertilización nitrogenada. El ensayo se llevó a cabo utilizando labranza convencional, con una mano de doble acción e implantada con una sembradora de grano fino de tres puntos. El mismo se desarrolló con un diseño experimental prospectivo en bloques al azar, en donde cada tratamiento tuvo 4 repeticiones. Se realizaron mediciones de longitud radical, biomasa aérea y radical y rendimiento. Con respecto a los parámetros evaluados se encontraron incrementos significativos en la longitud radical, así como también en la biomasa aérea y radical en los tratamientos inoculados en estadios iniciales. A los 50 días solo se observan diferencias significativas entre lo inoculado y el testigo. No hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a los diferentes niveles de fertilización. La mayor densidad radical se expresó en el tratamiento inoculado y con media dosis de fertilización, al igual que la biomasa radical, sin embargo, la biomasa aérea se mantuvo constante entre los tratamientos inoculados sin marcar diferencia según los niveles de fertilización que tuvieron a la siembra. En cuanto, a los componentes del rendimiento todos los tratamientos inoculados muestran valores absolutos mayores al testigo pero sin diferencias estadísticas, así mismo los tratamientos con mayor dosis de fertilización no mostraron diferencias con los de media fertilización. Los mayores valores en granos por metro cuadrados se observaron en los tratamientos inoculados con dosis completa y sin fertilización (sin diferencias estadísticas), el mayor peso obtenido en el recuento de mil granos fue en el tratamiento de media fertilización inoculado y el máximo rendimiento numérico del cultivo (kg/ha) se obtuvo en el tratamiento inoculado con dosis máxima de fertilizante, sin embargo no existieron diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Abstract

Argentina in the last few years, have had an important increase in soybean production, some of the causes of this phenomenon soybean crops and the frequent use of could be: agricultural frontier expansion, increase new technology as well as direct seeding. On the other hand, in our country, wheat has a very important role in strengthening and increasing the area devoted to soybean cultivars. The wheat-soybean rotation has been aligned properly, with the wheat that provides organic matter to maintain the sustainability of the soil-plant system. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* wheat under different fertilizer rates. The trial was conducted in the field of Rio Cuarto State University, "Las Higueras", 5 km. northeast of the city of Rio Cuarto, the profile described corresponds to a typical Hapludoles. The treatments were inoculated with *Azospirillum brasiliense*, under different nitrogen rates. The test was conducted using conventional tillage, with a double action hand and implanted with three points fine grain drill. This experiment was developed with a prospective and randomized blocks experimental design, where each treatment was replicated 4 times. Measurements were made of root length, and root biomass and yield. With regard to the evaluated parameters were found significant increases in root length, as well as aerial and root biomass in treatments inoculated at early stages. At 50 days are not significant differences between inoculated and the witness, and were no statistically significant differences with different levels of fertilization. The greatest root density was expressed in the inoculation and treatment with half dose of fertilizer, as root biomass, however, the biomass remained constant between treatments inoculated unmarked difference according to level of fertilization at planting were. In yield components of all inoculated treatments, absolute values are higher than the control but without significant differences. However, treatments with increased fertilizer rates did not differ than those with medium fertilization rate. The highest values in grains per square meter were observed in treatments inoculated with full dose and without fertilization (no statistical difference), the highest weight in a thousand grains were seen in half fertilization and inoculated treatment and maximum performance was obtained in the high dose fertilization and inoculated treatment, however, this data was not statistically different.

Índice Temático

Introducción.....	1
Biología de <i>Azospirillum</i>	2
<i>Azospirillum</i> como PGPR.....	3
Mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i>	4
1) Fijación biológica de nitrógeno.	
2) Producción de fitohormonas:	
a) Auxinas.	
i) Rol Fisiológico de las Auxinas.	
b) Giberelinas.	
i) Rol Fisiológico de las GAs.	
c) Citocininas.	
i) Rol Fisiológico de las Citocininas	
d) Etileno.	
i) Rol Fisiológico del Etileno	
e) Ácido Abscísico.	
i) Rol Fisiológico del ABA.	
f) Actividad Nitrato Reductasa.	
g) Solubilización de Fosfatos Producción de sideróforos.	
• Antecedentes.....	12
• Objetivo.....	15
Objetivo general	
Objetivos específicos	

- Hipótesis.....15
- Materiales y Métodos.....16
- Resultados y discusión.....18
- Grafico 1
- Grafico 2
- Grafico 3
- Grafico 4
- Grafico 5
- Componentes del rendimiento.....22
- Grafico 6
- Grafico 7
- Grafico 8
- Conclusión.....27
- Bibliografía... ..28

Introducción

En el siglo pasado el aumento de la población del globo agudizó notablemente el problema de la distribución de alimentos, lo que ha tenido un impacto indudable sobre la agricultura. La tendencia mundial fue inclinarse hacia el uso de fertilizantes minerales, sobre todo nitrogenados, potásicos, fosfatados y, en menor proporción, con elementos como azufre, hierro y boro, como medio para aumentar la productividad de los cultivos (Montaner, 2005). Esta tendencia comenzó a evidenciarse primero en los países dominantes pero, especialmente en la década del 70 durante la llamada revolución verde, se hizo extensiva a los países en vías de desarrollo. En la actualidad, tanto en estos últimos como en las naciones desarrolladas, la práctica de la fertilización mineral es de uso corriente. Por supuesto que el exceso en la utilización de los fertilizantes minerales es cuestionable por su impacto contaminante sobre el aire, agua y suelo. En el caso específico del sustrato edáfico, entre otros efectos estos compuestos provocan alteraciones sobre el pH y potencial osmótico, lo que resulta perjudicial para la actividad de las especies microbianas predominantes. En la búsqueda de variantes para el uso de fertilizantes minerales, la investigación científica se ha orientado hacia el estudio de sistemas alternativos con capacidad de aumentar la producción, pero con menores problemas de contaminación y costos de producción más reducidos. La identificación y posible manipulación de las asociaciones entre bacterias fijadoras de N atmosférico (diazotróficas) y plantas ha sido investigada durante muchos años (Olmedo, 2003). En la naturaleza se destacan como más exitosas las asociaciones de leguminosas con bacterias *simbiontes* de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y de gramíneas con bacterias de *vida libre* como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp., que proliferan en la rizósfera de dichas plantas (Döbereiner y Pedroza, 1987).

La utilización de fertilizantes biológicos es una práctica que ha despertado interés en los últimos años. Se trata de la incorporación al cultivo por diversas vías, siendo la más común la inoculación de la semilla con microorganismos favorables que generalmente existen en el suelo, incrementando su concentración en una zona cercana a la raíz y de fácil acceso para el cultivo, por lo general de la rizósfera. Los efectos del uso de los tratamientos biológicos pueden ser tanto directos, favoreciendo la nutrición de las plantas y su disponibilidad de agua, como indirectos (promoviendo un mejor desarrollo y sanidad). En la práctica, la inoculación es una metodología razonable de adoptar, con la finalidad de proveer al cultivo aportes de la fijación biológica del nitrógeno y otros estimuladores biológicos del crecimiento. Se conoce gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan nitrógeno, pero sólo 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*, que ha sido objeto de estudio desde la década del 70 (Olmedo, 2003).

El notable incremento de la superficie agrícola 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). Como resultado de su uso y manejo irracional, se ha llegado a una degradación parcial y en ciertos casos total, con las consecuencias que esto acarrea.

Biología de *Azospirillum sp.*

Azospirillum sp. es uno de los microorganismos con características de promoción del crecimiento vegetal disponible en tratamientos de inoculación y que ha sido intensamente estudiado en las últimas décadas. Son bacterias aerobias cuando crecen con N combinados y poseen principalmente un tipo respiratorio de metabolismo con O₂ como aceptor terminal de electrones. La fijación de nitrógeno la realiza en condiciones de micro aerofilia debido al daño que el oxígeno le causa a la nitrogenasa (Dobereiner y Pedrosa, 1987). Es un bastón curvo de 0,8 a 1,0 micrones de diámetro y 2 a 4 de largo. Una característica típica es su gran movimiento y la presencia en el interior de las células de gránulos de polibetahidroxibutirato (PHB) y que puede llegar a representar hasta el 50 -70% del peso seco de las células bajo condiciones de fijación de N₂, en cambio cultivadas en sales de amonio solo alcanzan el 1% (Monzón de Asconegui, 2003). La gran movilidad de *Azospirillum* favorece su acercamiento a la superficie radicular y la distancia que puede recorrer se considera de unos pocos micrones hasta unos pocos centímetros (Monzón de Asconegui, 2003). Aparentemente el movimiento de *Azospirillum* es un primer paso esencial para que la bacteria sea reconocida por la planta y se considera como un proceso no específico donde se involucra la quimiotaxis bacterial; a su vez ésta estaría afectada por el balance de sustancias atractivas y repelentes de la raíz (Monzón de Asconegui, 2003). Los sitios de adhesión de las células de *Azospirillum* son particularmente la zona de elongación de las raíces, los pelos radiculares y los lugares de emergencia de las raíces laterales (Monzón de Asconegui, 2003). Algunas especies de *Azospirillum* colonizan sólo la superficie radicular pero otras avanzan hacia el interior del tejido radicular (Monzón de Asconegui, 2003) multiplicándose en el cortex y aún, llegar a la zona vascular. Trabajando con raíces esterilizadas e inoculadas de maíz, (Monzón de Asconegui, 2003) demostró por primera vez la presencia de *Azospirillum* en los vasos

xilemáticos y actividad de nitrogenasa en los plantines de maíz medida por el método de reducción de acetileno etileno.

También influye en la colonización el tipo de planta; experiencias en trigo y mijo demostraron que una misma cepa tenía modos de acción distinta mientras en el primer vegetal la mayor parte de la población se distribuía en el interior de la raíz, en la segunda planta se concentraba en las raíces (Monzón de Asconegui, 2003)

Azospirillum como PGPR

Cuando hablamos de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) nos referimos a todas aquellas bacterias que habitan el entorno de las raíces y que ejercen efectos positivos a través de diferentes mecanismos.

Fue reconocido por su capacidad de fijar nitrógeno libremente pero en la actualidad se reconocen otros mecanismos de promoción vegetal más importantes. Entre estos se destaca la producción y liberación de hormonas promotoras del crecimiento radical como auxinas, giberelinas, citoquininas; de enzimas pectinolíticas distorsionando la funcionalidad de células de las raíces y el aumento en la producción de exudados, promoviendo el crecimiento de otros organismos rizosféricos. También se ha descrito la liberación de "moléculas señal", afectando el metabolismo de las células vegetales y desencadenando eventos que resultan en alteraciones, promoción y crecimiento de raíces y de la parte aérea de la plantas.

Los microorganismos PGPR de la rizosfera son capaces de promover el crecimiento de un cultivo. Además algunos de estos microorganismos pueden transformar el nitrógeno atmosférico en amonio (fijación biológica del nitrógeno) una especie químicamente aprovechable por la plantas. (Okón y Labandera-Gonzalez, 1994).

Las bacterias del género *Azospirillum* son organismos que pueden vivir en asociación en la rizosfera de plantas, pudiendo estar presentes tanto dentro como fuera de las raíces. La contribución de la fijación atmosférica de nitrógeno por *Azospirillum* localizado en el sistema radicular de plantas tiene menor significado agronómico de lo que se esperaba inicialmente, uno de los efectos de estas bacterias está en la promoción del crecimiento radicular de las plantas, por la producción de sustancias promotoras del crecimiento. (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

Como mecanismos PGPR estos microorganismos, además de otras propiedades son solubilizadores de fosfatos inorgánicos, por lo que desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. Este factor viene despertando la atención para la utilización de estos microorganismos como inoculante comercial o el manejo de sus

poblaciones como forma de promover una mejor utilización del fósforo existente en el suelo o el adicionado como fertilizante. (Silva Filho & Vidor 2001).

Mecanismos de acción de *Azospirillum*

En cuanto a lo nombrado anteriormente sobre la acción promotora en el desarrollo de las plantas que produce *Azospirillum* es debido a 4 beneficios: 1) fijación de nitrógeno, 2) efectos hormonales, 3) acción de las nitrato reductasas asimiladoras en la bacteria, y 4) producción antimicrobiana y anti fúngica.

1) Fijación Biológica del Nitrógeno

La fijación del nitrógeno fue el primer mecanismo considerado como responsable del mejor desarrollo de los vegetales inoculados en base a los compuestos nitrogenados en los tallos y granos y a la actividad de la nitrogenasa medida por la reducción del acetileno a etileno en las plantas inoculadas (Cassán, *et al.* 2007). Los informes obtenidos sostenían que del 5 al 18% del nitrógeno de la planta provenía de la fijación (Monzón de Asconegui, 2003). Por otra parte las plantas inoculadas crecieron normalmente con solo una parte del nitrógeno del fertilizante que se necesitaba para el desarrollo óptimo (Cassán, *et al.* 2007).

2) Producción de Fitohormonas

Se ha demostrado que la inoculación con esta bacteria o la aplicación de sustancias fitohormonales puras inducen a la formación de pelos radiculares y raíces laterales (Albanesi, 2003; Glick 1995). Uno de los eventos iniciales más conocidos y mejor descritos en la colonización de raíces por *Azospirillum* sp. es el impacto sobre el crecimiento y desarrollo radical (Cassán, *et al.* 2007, Kapulnik *et al.* 1985); estos cambios ha sido atribuidos a los efectos de *Azospirillum* sp. que mejora la absorción de la planta en NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄H₂⁻, K⁺, Rb⁺² y Fe⁺³. El incremento en la absorción de minerales por las plantas se debe directamente a un aumento en volumen del sistema radical, especialmente de la zona de pelos funcionalmente activa, y no a aumentos específicos en el mecanismo de absorción de iones (Cassán, *et al.* 2007). Mediante este mecanismo se podría incluso explicar la acumulación de N en la planta, sin que exista FBN. Sin embargo, los experimentos realizados en general no demuestran si estos efectos son causales *per se*, o más bien el resultado de otros mecanismos tales como cambios en el balance hormonal de las raíces.

Existen tres tipos de sustancias promotoras de desarrollo vegetal que podrían ser detectadas en el sobrenadante de cultivos de *Azospirillum*: auxinas (la más importante desde el punto cuantitativo), citoquininas y giberelinas (Dobelaere *et al.* 1999), además del etileno y ácido abscísico.

a) Auxinas

La producción de auxinas afecta la morfología y morfogénesis radicular (Cassán, *et al.* 2007; Patten y Glik, 1996) algunos cambios morfológicos observados en la raíz de maíz, trigo y sorgo están caracterizados por la presencia de bifurcaciones de los extremos de los pelos radiculares (Cassán, *et al.* 2007) aunque esta propiedad no es privativa de *Azospirillum*. Auxinas es el nombre genérico que denomina a un grupo de compuestos, naturales o sintéticos, que se caracterizan por su capacidad de inducir la elongación de las células del tallo en la región subapical en plantas vasculares. La producción bacteriana de AIA (Acido Indol Acetico) se ha estudiado extensamente desde dos puntos de vista: i) por el efecto fisiológico que ocasiona en plantas al modificar el balance de fitohormonas y producir estimulación del crecimiento (Cassán, *et al.* 2007) y, ii) por el efecto sobre la interacción planta-microorganismo (Costacurta y Vanderleyden 1995). Desde este último punto de vista los miembros del género *Azospirillum* proporcionan un excelente sistema para investigar el papel desempeñado por las hormonas en la asociación bacteria cereal.

Se ha propuesto que *Azospirillum* tiene más de una vía de síntesis de AIA dependiente de triptofano (Costacurta y Vanderleyden 1995). En cultivos puros de *Azospirillum* sp., además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, ácido indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados (Cassán, *et al.* 2007). Actualmente se conoce que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías metabólicas. En tanto que las vías del ácido indol pirúvico y la de indol acetamida son dependientes del triptofano, la tercera es una vía independiente de este aminoácido, desconociéndose el precursor (Cassán, *et al.* 2007).

Resultados recientes permiten sugerir que la indol piruvato decarboxilasa es una enzima común tanto a la vía del indol pirúvico como a la vía no dependiente de triptofano (Cassán, *et al.* 2007). En medio líquido, la producción de AIA por parte de *Azospirillum brasilense* se incrementa rápidamente a partir del inicio de la fase estacionaria, lo que sugiere que la producción de este compuesto en el microorganismo respondería a la cinética de un metabolito secundario.

i) Rol Fisiológico de las Auxinas

Las auxinas pueden ser sintetizadas en el suelo por microorganismos de *vida libre* y luego absorbidas por la raíz ó producidas *in situ* por microorganismos endofíticos con acción directa sobre el tejido del hospedador. La respuesta de la planta al AIA exógeno puede variar de benéfica a perjudicial, dependiendo de la concentración incorporada. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del contenido endógeno de la hormona por la actividad microbiana, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del

hospedador y modificar parcialmente el metabolismo celular con la consecuente promoción del crecimiento. Un aumento excesivo del contenido de auxinas, pondrá en marcha un mecanismo homeostático para reducir la concentración endógena de la hormona. La interacción comienza en la rizósfera, donde son producidos la mayoría de los sustratos necesarios para el crecimiento microbiano y síntesis de AIA como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas nucleótidos y otros metabolitos con actividad biológica como las auxinas (Rovira, 1970). La presencia de AIA y compuestos derivados en los exudados vegetales induce en el microorganismo un incremento en la expresión del gen *ipdC* con el consecuente aumento de la síntesis de AIA. Siempre que las cantidades de precursores (como el triptofano) sean suficientes (Van de Broek *et al.* 1999). El resultado se traducirá en un incremento del contenido endógeno de la hormona que dará inicio a la respuesta celular luego de su interacción con sus receptores en la membrana los que desencadenarán una cascada de señalización que tendrá como sitio primario de actividad la pared celular (Hagen, 1987) y el núcleo (Cleland, 1987) dando lugar a la modificación del patrón de crecimiento y desarrollo tisular que determina la respuesta de la formación de nódulos y modificación del crecimiento de la raíz.

b) Giberelinas

Sobre las 126 Giberelinas (Gas) conocidas en la actualidad (Crozier, *et al* 2000), 13 son específicas de hongos, 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas. A pesar de la amplia distribución entre reinos y de la cantidad de formas conocidas cabe destacar que sólo algunas pocas tienen actividad biológica *per se* (Cassán, *et al.* 2007). La evidencia científica determina que la producción de AIA y GAs incrementa rápidamente al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento en el medio de cultivo bacteriano, jugando un rol importante en la estimulación del crecimiento de las plantas inoculadas. (Omay *et al* 1993). Ensayos de inoculación con *Azospirillum* sp. demostraron que incrementó el crecimiento y la producción de cultivos de cereales y al menos, parte de este efecto, podría atribuirse a la producción de fitohormonas por la bacteria y dentro de ellas, específicamente a las giberelinas (Okon *et al.* 1994). Parece lógico pensar que el estímulo en el crecimiento de plantas superiores puede ser benéfico para la bacteria desde el punto de vista de la disponibilidad de nutrientes a nivel rizosférico (Rademacher 1994)

i) Rol fisiológico de las giberelinas

La giberellina también tiene efectos semejantes a las auxinas promoviendo el aumento de los pelos radicales (Picoli y Bottíni, 1994). Dentro de los cambios metabólicos que genera *Azospirillum* en su asociación con los vegetales, se sugirió que podría activar la hidrólisis de

fitohormonas (compuesto orgánico que influyen los procesos fisiológicos de las plantas a muy bajas concentraciones) y flavonoides conjugados permitiendo la liberación de compuestos en su forma activa (Fulchieri, *et al.* 1993; Cassán, *et al.* 2007). Recientemente Cassán, *et al.* (2003) han informado que esta bacteria no solo produce giberelinas sino también puede hidrolizar y metabolizar los precursores de giberelinas a formas activas. Las giberelinas (GAs) constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (diterpenos ácidos tetracíclicos), algunos de los cuales poseen actividad hormonal y regulan diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación (Davies 1995). El uso de métodos fisicoquímicos de alta sensibilidad ha revelado que las giberelinas son un amplio grupo de productos naturales, constituido al menos por 126 compuestos producidos tanto por plantas, hongos y bacterias (Cassán, *et al.* 2007) y que son esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de todas las plantas superiores (Mander, 1991).

Al igual que para las auxinas, la producción bacteriana de GAs se ha estudiado desde dos puntos de vista: i) como la capacidad bacteriana de producir ó metabolizar formas activas de GAs *in vitro*, es decir en medio químicamente definido (Piccoli y Bottini 1994a, 1994b y 1996, Piccoli *et al.* 1996 y 1998) y, en función de la modificación del balance hormonal y estimulación del crecimiento de plantas por la inoculación con este microorganismo, es decir *in vivo* (Fulchieri *et al.* 1993, Lucangeli y Bottini 1996, Cassán, *et al.* 2001).

Ensayos de inoculación con *Azospirillum sp.* demostraron que incrementó el crecimiento y la producción de cultivos de cereales y al menos, parte de este efecto, podría atribuirse a la producción de fitohormonas por la bacteria y dentro de ellas, específicamente a las giberelinas (Okon *et al.* 1994). Parece lógico pensar que el estímulo en el crecimiento de plantas superiores puede ser benéfico para la bacteria desde el punto de vista de la disponibilidad de nutrientes a nivel rizosférico (Rademacher, 1994).

c) Citocininas

Son un grupo de compuestos naturales que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Químicamente son purinas, en su mayoría derivadas de la adenina, sustituidas en el N⁶ que incluyen sus respectivos ribótidos, ribósidos y glucósidos. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos entre los que se encuentran el retardo de la senescencia, la acumulación de la clorofila, la neo formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos vegetales, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la iniciación del brote y la expansión de las hojas. Por definición las citocininas, son compuestos que inducen la citocinesis, es decir, la formación del fragmoplasto que dará origen a la nueva pared entre dos células cuyos núcleos

acaban de dividirse. En presencia de concentraciones óptimas de auxinas inducen la división celular en cultivos de vegetales. El primer regulador con actividad citocinica fue descubierto por Miller et al. (1955) y se denominó cinetina (Kin) la cual es una forma no natural. En 1963, Letham identificó una forma natural que denominó zeatina (Z) por ser descubierta en maíz y desde entonces más de 40 citocininas y sus metabolitos han sido clasificados. Las formas con mayor actividad biológica son la Zeatina (Z), isopentenil-adenina (IPA), cinetina (Kin) y benziladenina (BAP), siendo las dos últimas sintéticas.

i) Rol Fisiológico de las Citocininas

Muchos microorganismos de la rizósfera, entre los que se detallan bacterias y hongos son capaces de sintetizar citocininas en cultivos químicamente definidos Barea et al. (1976) encontraron que al menos el 90 % de las bacterias aisladas de la rizósfera de cultivos de interés agronómico, fueron capaces de producir compuestos tipo citocininas. Como resultado de la íntima relación entre estos organismos y la superficie de la raíz, el aporte exógeno de esta hormona puede tener un profundo efecto sobre el crecimiento de la planta. Al igual que lo reportado para las auxinas la producción microbiana de esta hormona, podría suplementar el contenido endógeno de la planta y en ciertos casos promover el crecimiento vegetal o resultar fototóxica. En la actualidad sabemos que las plantas responden a la adición exógena de citocininas, lo cual representa un punto de gran interés debido a que no se conoce la significación ecológica de la síntesis microbiana en los tejidos vegetales. A pesar de que la producción microbiana de citocininas en plantas superiores comenzó con modelos de microorganismos fitopatógenos, en la actualidad los investigadores se han volcado a la comprensión de este proceso en grupos de bacterias promotoras del crecimiento. El modelo más estudiado ha sido el de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se ha investigado tanto la producción de la hormona en el micro simbionte como en la planta. En este sentido, Cassán, *et al.* 2007 vieron que el efecto de la adición exógena de K promovía la iniciación del nódulo e incrementaba el contenido de *leg* hemoglobina en porotos. En otros ensayos Yahalom et al. (1990), probaron que tanto la adición exógena de BAP con la co-inoculación con *Rhizobium* y *Azospirillum* spp. incrementaba el número de nódulos formados en *Medicago polymorpha*

d) Etileno

Junto con auxinas, giberelinas y citocininas, el etileno es una hormona muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Burg *et al.* 1966). Debido a su composición gaseosa por mucho tiempo no acepto como una fitohormona, sin embargo diferentes trabajos

demonstraron que su síntesis y acción sobre la planta era crítica para determinados procesos fisiológicos. A pesar de que existen numerosas publicaciones relacionadas a la síntesis de esta hormona en plantas superiores (Glick, 1999) muy pocos trabajos han sido publicados sobre la biosíntesis microbiana (Arshad y Frankenberger 1993). El etileno es una molécula muy simple y simétrica, compuesta por 2 átomos de C (unidos en doble ligadura) y 4 átomos de H. Soluble en agua en aproximadamente 140 ppm. 25° C y 760 mm Hg (15 veces más que el oxígeno). Es muy activo y puede ejercer sus efectos fisiológicos a concentraciones muy bajas en el tejido vegetal (0,1 ppm).

i) Rol Fisiológico del Etileno

Existe muy poca información disponible que relacione la producción de etileno en bacterias y la promoción del crecimiento vegetal. Trabajos de Primrose and Dilworth (1976) determinaron la capacidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de vida libre *Azotobacter* y *Bacillus* de producir etileno en medio de cultivo químicamente definido. Esto indujo a Strzelczyk *et al.* (1994) a probar la capacidad de *Azospirillum* de producir este compuesto in vitro sobre diferentes fuentes carbonadas. Sus resultados determinaron que la bacteria podía sintetizar etileno y que la producción dependía de la presencia de metionina en el medio de cultivo. Diversos trabajos han presentado evidencia de que esta hormona tiene un rol decisivo en el establecimiento de las relaciones simbióticas en leguminosas tal como la formación de nódulos y la fijación biológica de nitrógeno. En la interacción con *Rhizobium*, la aplicación exógena de etileno ha mostrado un efecto negativo sobre la formación y funcionalidad de los nódulos. En tal sentido, Grobbelar, N, *et al.* (1971) demostraron que la nodulación se reducía en un 90 % en esplantos de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) tratados en forma exógena con 0,4 ppm de etileno. En contrapartida, Ribaudó *et al.* (2006), evaluaron la respuesta de crecimiento de plántulas de arroz inoculadas con bacterias de vida libre del género *Azospirillum* y correlacionaron el aumento en el número y longitud de raíces adventicias con la biosíntesis bacteriana de auxinas y el aumento de los niveles de etileno por parte de las plantas inoculadas.

e) Ácido Abscísico

Es una hormona vegetal involucrada en diferentes procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta. Está relacionada con la capacidad de las plantas superiores para adaptarse a condiciones de estrés a través de distintos procesos fisiológicos y moleculares que incluyen alteraciones en la expresión de genes relacionados con distintos tipos de estrés y cierre de estomas. Desde el punto de vista fisiológico, el ABA favorece la economía del agua dentro de la planta por su efecto regulador sobre la apertura y cierre de estomas a nivel

de las hojas (Davies 1991); además participa en la dormición de yemas y semillas, en la acumulación de proteínas de reserva en semillas (soja), en la inhibición del crecimiento y germinación inducido por auxinas y GAs, en la inhibición del crecimiento foliar en situaciones de estrés y en la regulación de la síntesis proteica en respuestas de aclimatación a diferentes tipo de estrés; sin embargo, todas estas funciones están relacionadas a un objetivo común, la defensa del sistema vegetal en condiciones ambientales desfavorables.

i) Rol Fisiológico del ABA

Es muy escasa la información documentada sobre la identificación de ABA en cultivos químicamente definidos de rizobacterias promotoras del crecimiento y su correlación con el estado fisiológico de la planta. La mayor parte de los ensayos han sido realizados en sistemas de cultivos e inoculaciones de hongos y bacterias fitopatogénicas ó en asociaciones simbióticas por bacterias nodulantes. En tal sentido, Cassán, *et al.* 2007 probaron que la aplicación exógena de ABA a plantas disminuye la cantidad de nódulos establecidos en plantas de *Trifolium repense* y *Lotus japonicum* inoculadas.

f) Actividad Nitrato Reductasa

En cuanto a la acción de las nitrato reductasa de *Azospirillum* se especula que la NR (nitrato reductasa) de *Azospirillum* contribuiría con las NR de las raíces en la reducción de NO₃ absorbido y es lo que se ha observado en experiencias que mostraron una interacción positiva entre las nitrato reductasas y la inoculación con esta bacteria.

Este mecanismo podría ser alternativo o complementario a la FBN para explicar la acumulación de N en plantas inoculadas con *Azospirillum*. En experiencias con el cv. BH1146 de trigo, la inoculación con una cepa salvaje de *A. brasilense* provocó un aumento de la actividad NR de hojas, comparada con la actividad observada en los tratamientos inoculados con su mutante isogénico (Monzón de Asconegui, 2003). Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la acumulación e incremento de N en plantas inoculadas. Algunos investigadores (Bothe *et al.* 1992), postulan al nitrito (producto de la respiración bacteriana del nitrato), como el responsable del incremento en la formación de raíces laterales de trigo.

g) Solubilización de fosfatos y Producción de sideroforos

Los microorganismos solubilizadores de fosfatos inorgánicos desempeñan un importante papel en el suplemento de fósforo para las plantas. Este factor viene despertando la atención para la utilización de esos microorganismos como inoculante comercial o el manejo de sus poblaciones como forma de promover una mejor utilización del fósforo existente en el suelo o el adicionado como fertilizante. (Silva Filho & Vidor 2001)

La solubilización de fósforo mineral y orgánico se produce por la capacidad que presenta la rizobacteria de producir ácidos orgánicos y fosfatasa, respectivamente. Además produce estimulación del crecimiento vegetal por la presencia de citoquininas, giberelinas y ácido indolacético, así como protección fitosanitaria a los cultivos debido a la producción de antibióticos, resistencia sistémica inducida y presencia de sideróforos en la cepa. (Informe Rizobacter). Se considera sideroforo a toda sustancia de bajo peso molecular, producida por microorganismos con alta afinidad por el catión hierro (Fe^{+3}), y que tiene la particularidad de actuar como transportador de ese elemento en condiciones de baja disponibilidad en el suelo (Neilands y Leong 1986). De esta forma complejan casi todo el hierro disponible en la rizosfera dificultando la proliferación de patógenos (Cassán, *et al.* 2007). Las bacteriocinas (producción de antibióticos) son sustancias de naturaleza proteica y que actúan como bactericidas, son sintetizadas por algunas cepas bacterianas, actúan sobre otra cepa de la misma especie o especies relacionadas, manteniendo un equilibrio entre las poblaciones diferentes en un mismo ambiente. Su mecanismo de acción es muy diverso y puede involucrar bloqueos metabólicos, cambios de permeabilidad en la membrana celular, daño o degradación de DNA, etc. Cassán, F. *et al.* 2007 testaron la capacidad de producir bacteriocinas en sesenta cepas seleccionadas de *Azospirillum* spp. Y determinaron que veintisiete de ellas (45%) eran capaces de producir moléculas de este tipo e inhibir el crecimiento de cepas marcadoras. En algunas de las estirpes testeadas, pudo diferenciarse el efecto inhibitorio adicional de la producción de sideróforos, lo que llevó a los autores a pensar que el antagonismo entre *Azospirillum* spp. y el resto de la población rizosférica dependería de la producción de ambos compuestos.

Antecedentes

Jaime *et al.* (1999) concluyeron que la inoculación con diferentes cepas de fijadores libres de nitrógeno se lograba incrementos en el cultivo de maíz, en especial con *Azospirillum*. Y Creus *et al.* (1996) encontraron que la presencia de *Azospirillum sp 245* mejora el estado hídrico de plántulas de trigo.

Lucangelli y Bottini (1996) demostraron que la presencia de la bacteria *A. lipoferum sp 33* o *A. brasilense cd* incrementó positivamente el largo del primer entrenudo tanto en maíz (*Zea mays*) como en arroz (*Oriza sativa*). También en maíz Bellone *et al.* (1999) registraron mejoras en el peso seco del sistema radical y en los parámetros de la parte aérea.

La inoculación con *Azospirillum brasilense* a raíces de caña de azúcar incrementó el peso seco de las mismas y la producción de Jasmonatos. (Bellone y Bellone, 2001) Ruiz *et al.* (1996) sostienen que la inoculación con *Azospirillum* puede modificar parámetros del crecimiento vegetal asociados o no con el rendimiento del cultivo y en un ensayo realizado en la misma zona en 1999, con inoculante mixto conteniendo *Azotobacteriaceas*, *Saccharomyces spp* y *Endogone spp* marcó diferencias favorables a partir de los 100 días y el mayor desarrollo radicular mostró su efecto en lo que hace a estado general de la planta y a las perspectivas futuras de rendimiento. (Olmedo, *et al.* 2003)

Olmedo, *et al.* 2003 realizaron en algodón la co-inoculación con *Azospirillum* y *Saccharomyces* manifestando un mayor incremento en altura y número de pimpollos por plantas.

El *Azospirillum brasilense Az 39* promovió en forma significativa el crecimiento de plántulas de tomate. (Olmedo, *et al.* 2003).

La inoculación deliberada de las microalgas *Chlorella spp.* con PGPR de origen terrestre no ha sido reportada con anterioridad, tal vez debido al origen diferente de estos dos microorganismos. Al inmovilizar de manera conjunta *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense Cd* en esferas de alginato, se obtuvo como resultado un aumento significativo en varios parámetros de crecimiento de la micro alga, como el peso fresco y seco, el número total de células, el tamaño de las colonias de micro algas dentro de la esfera, el número de organismos por colonia y la concentración de pigmentos. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales (Olmedo, *et al.* 2003)

En promedio en 15 sitios de experimentación, hubo respuestas al tratamiento de semillas con Nitragin Girasol con *Azospirillum* con dosis de 10 ml/kg, independiente de la fertilización.

En 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 (Dobbelacre *et al.*, 2001). Cura J. *et al.* (2001), demostraron que la asociación entre *Azospirillum* y arroz promueven el crecimiento de esta planta. Reportes indican que hay aumentos en el peso fresco, contenido de materia seca y de carbohidratos solubles tanto en trigo, maíz y arroz inoculados con *Azospirillum spp.*

La inoculación con *Azospirillum brasilense* a raíces de caña de azúcar incrementó el peso seco de las mismas y la producción de Jasmonatos (Bellone, C. *et al.* 2001) (Okón y Lavandera-Gonzalez, 1994). Ha señalado que se producen cambios en la actividad de varias enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno, hidratos de carbono y lípidos como respuesta a la inoculación con *Azospirillum*.

Hace varios años se ha demostrado la potencialidad de la asociación entre *Azospirillum* y los cultivos para aumentar la producción (Okon, 1985). Se han encontrado efectos favorables sobre el crecimiento de mijo (Tien *et al.*, 1979).

Olmedo *et al.*, (2002) observaron que los tratamientos con bacterias PGPR del genero *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 (escala Zadocks emergencia de inflorescencia) de un cultivo de trigo a campo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Okon (1998), cuando inoculó semilla de trigo con *Azospirillum* y encontró un marcado efecto en la proliferación de pelos radicales, lo que proporcionó un mejor anclaje y un volumen de suelo explorado por parte del sistema radical.

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%. (Olmedo, *et al.* 2002).

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

En experiencias realizadas por la Universidad Nacional de Rio Cuarto, 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 radical (Fulchieri *et*

al. 1994) en trabajos realizados con sorgo y trigo inoculados con *Azospirillum* se estimuló la elongación de raíces laterales y adventicias (Cassán, *et al.* 2007).

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

Azospirillum también es utilizada como co- inoculante, es decir una doble inoculación con otros microorganismos. Esta bacteria se puede asociar con una amplia variedad de bacterias que degradan azúcares o polisacáridos, estos co-cultivos son considerados una asociación metabólica donde la bacteria que produce degradación o fermentación del azúcar, libera sustancias que pueden ser usadas por *Azospirillum*, este es un ejemplo de uno de los mecanismos de cómo puede actuar un co-inoculante (Olmedo, 2003).

La inoculación dual de leguminosas con *Azospirillum* mas rizobios, ha dado mejores resultados en ciertos parámetros que cuando se los compara en tratamientos de inoculación simple. *Azospirillum* ayuda a los rizobios porque estimula la nodulación, la actividad de nódulo y posiblemente el metabolismo de la planta (Olmedo, 2003).

Esto se explica ya que las fitohormonas que produce *Azospirillum* en su metabolismo incrementa la diferenciación de células epidérmicas en los pelos de las raíces de leguminosas aumentando potencialmente el número de sitios para la infección por los rizobios, y por lo tanto mayor posibilidad de nodulación (Olmedo, 2003).

Los resultados obtenidos por Rodríguez Cáceres *et al.* (1996) mostraron que 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.

Con la finalidad de generar información local sobre el uso de inoculantes en base de *Azospirillum Sp.* se desarrolló una experiencia cuyo objetivo fue evaluar el efecto del inoculante a base de *Azospirillum sp.* y su interacción con diferentes dosis de fertilizantes nitrogenados, sobre el rendimiento del cultivo de trigo.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo a secano, bajo diferentes dosis de fertilizante nitrogenados.

Objetivo específico

Medir y analizar la promoción del crecimiento de *Azospirillum* en el cultivo de trigo a campo a través de: longitud radical, biomasa aérea y radical, y rendimiento.

Hipótesis

La inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de trigo a campo, favorece el crecimiento y desarrollo del cultivo.

Materiales y métodos

En el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto se realizó un ensayo en el cultivo de trigo utilizando un inoculante de la marca comercial Nitrap conteniendo *Azospirillum sp.* Con una concentración de 1×10^8 ufc/ml con una dosis de 10 ml x 1 kg de semilla. La fecha de siembra fue el 27 de julio del 2005, con la variedad de trigo Klein Chajá de ciclo corto. El suelo es un hapludol típico característico de la zona. La fertilización nitrogenada fue calculada de acuerdo al análisis físico – químico del suelo empleándose 77 grs. de urea para parcelas con dosis completa y 38.5 grs para los tratamientos con media dosis. Fertilización completa se refiere a una aplicación de fertilizante requerida para alcanzar el máximo rendimiento en el lote y media fertilización a la mitad de esa dosis. El ensayo se llevó a cabo bajo labranza convencional, con una mano de doble acción e implantada con una sembradora de grano fino de tres puntos. El ensayo se desarrolló con un diseño experimental prospectivo en bloques al azar, en donde corresponde a cada tratamiento 4 repeticiones.

Tratamientos

- **1:** Será el testigo sin fertilizar
- **2:** Inoculado con *Azospirillum* sin fertilizar
- **3:** Testigo con fertilización completa
- **4:** Inoculado con *Azospirillum* y dosis completa de fertilización nitrogenada
- **5:** Testigo con media fertilización
- **6:** Inoculado con *Azospirillum* con media fertilización

Se realizarán mediciones en tres estadios fenológicos: macollaje, encañazon y espigazon.

En macollaje se medirá peso seco de biomasa aérea y radical, y longitud radical por el método de inserción de líneas (Newman, 1966) que se explicará más adelante.

En el segundo estadio, se medirá solamente peso seco de biomasa aérea y radical; y por último en encañazon se estimará el rendimiento a través de sus componentes, (densidad de plantas por unidad de superficie logradas, espigas por planta, granos por espiga, peso de los 1000 granos).

Con respecto al inoculante se realizará un recuento de bacterias en el inoculante y en la semilla. Para el inoculante se realizarán diluciones seriadas de 1 ml. de inoculante con 9 ml.

de buffer para luego sembrar 0.1 ml. de cada dilución en medios NFB. Por otro lado para la semilla se colocaron 10 ml. en un kg. de semillas, se mezclan y se toman 10 semillas inoculadas y se colocan con 9 ml de buffer, realizándose las diluciones para luego sembrarlas.

La medición de la longitud total de raíces se realizó por el método de la intersección de líneas. Para ello se requirió de un área rectangular, dentro de la cual se construyó una cuadrícula. La raíz, luego de que se le removió el suelo adherido a ella, se colocó sobre la grilla, y se procedió a contar el número de intersecciones entre las líneas de ésta los pelos radicales. A partir del número de intersecciones se puede estimar la longitud de la raíz a partir de la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\pi \cdot N \cdot A}{2H}$$

Donde: R = longitud de la raíz

N = numero de intersecciones entre los pelos radicales y las líneas de la cuadrícula

A = área del rectángulo (centímetros cuadrados)

H = longitud total de las líneas de la cuadrícula (centímetros)

El tamaño de la muestra utilizada en la determinación son 5 plantas por repetición correspondiente a cada tratamiento, es decir un total de 20 plantas. Las mismas fueron llevadas al laboratorio donde se dividieron parte aérea y raíz, para ser secadas en estufa, a temperatura constante (60 °C) durante 48 hs, luego se determinó el peso seco de las mismas, a través de una balanza de precisión.

Resultados y Discusión

A los 30 días de emergencia no se detectaron diferencias significativas, al 5 % con relación a la densidad media radical, entre los diferentes grados de fertilización nitrogenada, pero si se encontró una diferencia entre tratamientos (testigo e inoculado), siendo estas diferencias significativas mayor al 5 %. Observando el grafico 1 podemos decir que hay incrementos en la densidad radical en magnitudes que van del 45- 31% para las parcela inoculadas, y que solo la mayor diferencia se observa en aquel tratamiento con la mitad de la dosis de nitrógeno (45%). Esto se debe a que mucha de la actividad biológica de las fitohormonas producidas por los microorganismos tienen influencia directa sobre procesos claves del desarrollo vegetal, tales como germinación, crecimiento temprano de plántulas, colonización rizosferica y el establecimiento bacteriano en los tejidos.

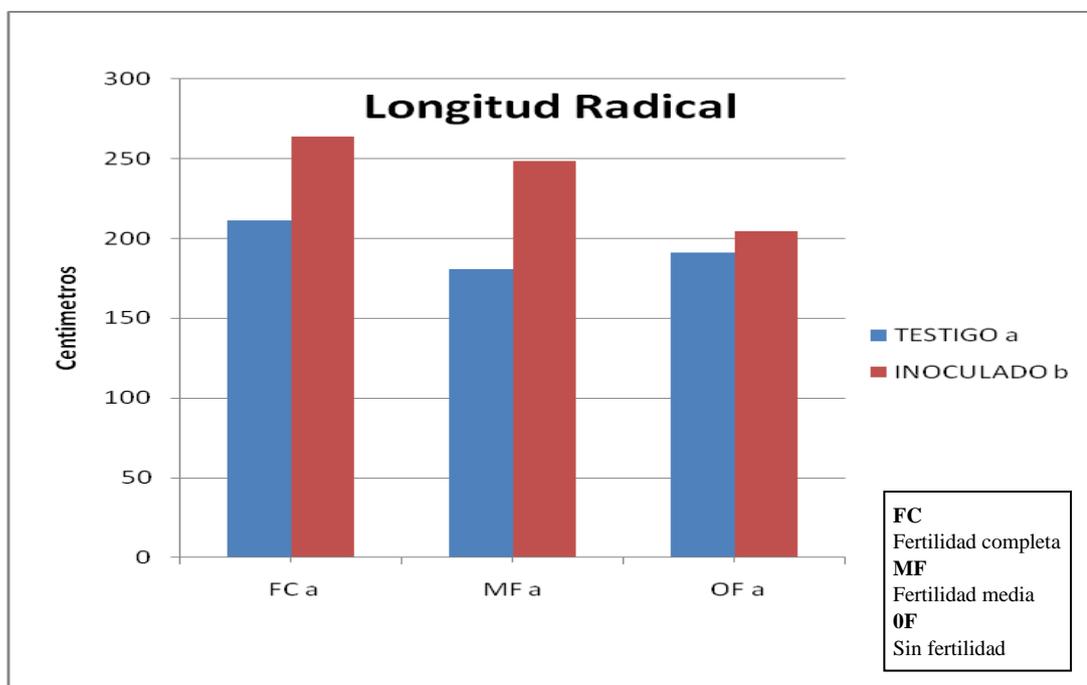


Grafico 1: Longitud radical expresada en cm. (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

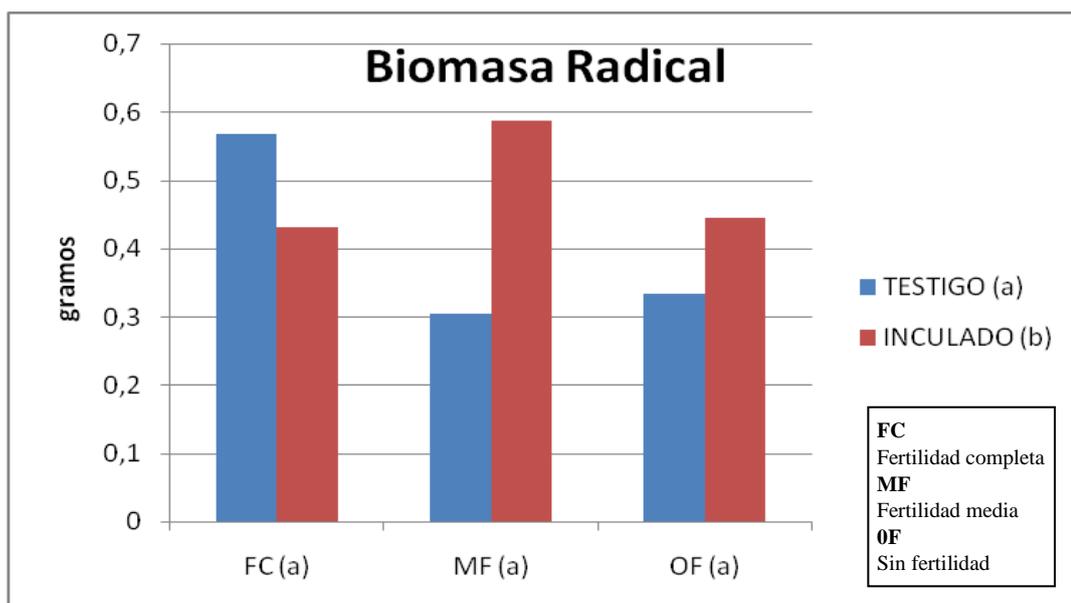


Grafico 2: Peso medio de la biomasa radical (gramos). (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

A diferencia del parámetro anterior aquí se encontraron diferencias significativas mayor al 5 % dentro y entre tratamientos, es decir entre tratamientos el inoculado marco diferencias en las parcelas que tenían la mitad de la dosis y en la que no tenían también, mientras que el testigo superó al inoculado en las parcelas con fertilización completa pero sin diferencias estadísticas. Por lo tanto se puede decir que esta diferencia entre tratamientos, es debida a la capacidad de colonizar tejidos internos de las gramíneas ocupando nichos ambientales protegidos y por la capacidad de aumentar significativamente el crecimiento radical y aéreo de plantas inoculadas, tanto por el suministro de diferentes compuestos promotores del crecimiento vegetal especialmente hormonas, vitaminas, etc., como por la competencia rizosférica con microorganismos fitopatógenicos. Influenciando directamente sobre los procesos claves del desarrollo vegetal.

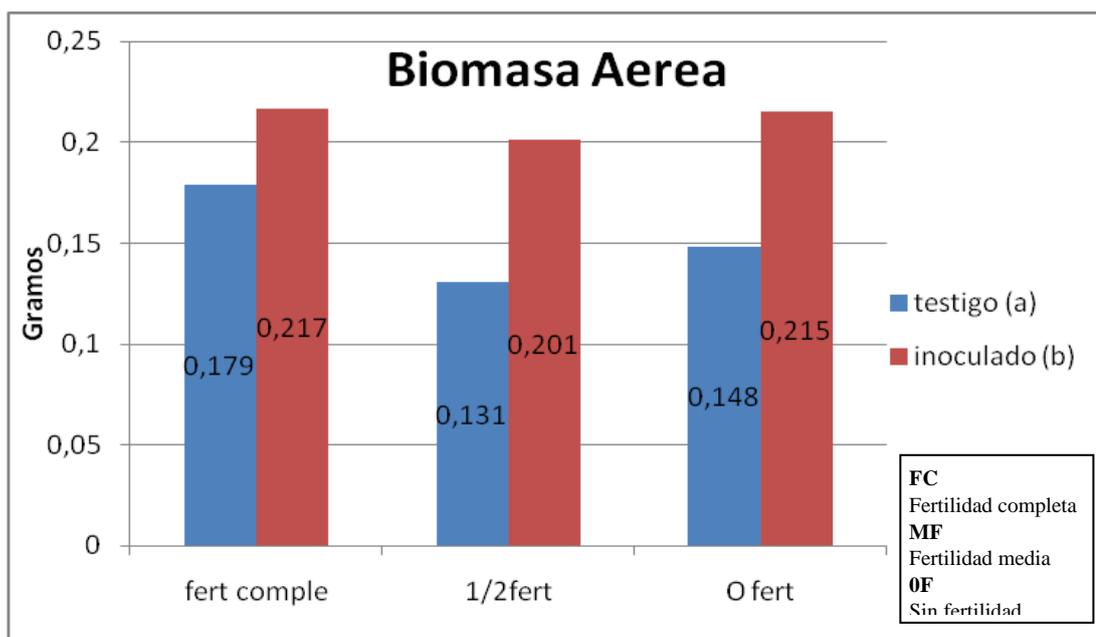


Grafico 3: Peso medio biomasa aérea (gramos). (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

En cuanto a los resultados que podemos inferir de este grafico, es claro que el efecto del aumento del volumen radical se ve reflejado en la producción de biomasa aérea, debido a una mayor eficiencia en la intercepción de nutrientes y agua, causado por el efecto del inoculante sobre el cultivo, aunque solo hay diferencias significativas mayor al 5% entre tratamientos (testigo e inoculado), y no entre los tratamientos de fertilización (cero fertilización, media fertilización y fertilización completa). Pero también, estas diferencias puede deberse al grado de fertilidad y disponibilidad de agua ya que el resultado de la presencia de la bacteria depende de estos dos factores según Rodrigues – Caseres (1996).

El segundo muestreo se realizó en la etapa de encañazon, y solo se midió biomasa aérea y radical.

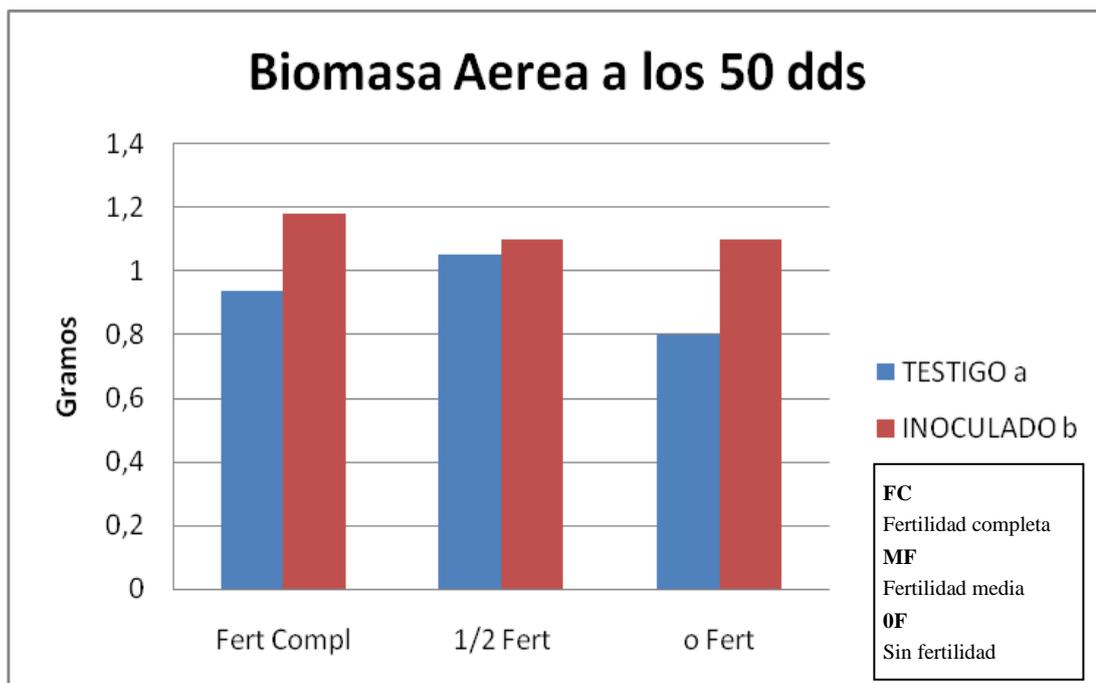


Grafico 4: Biomasa radical medida a los 50 días después de la siembra (dds). (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

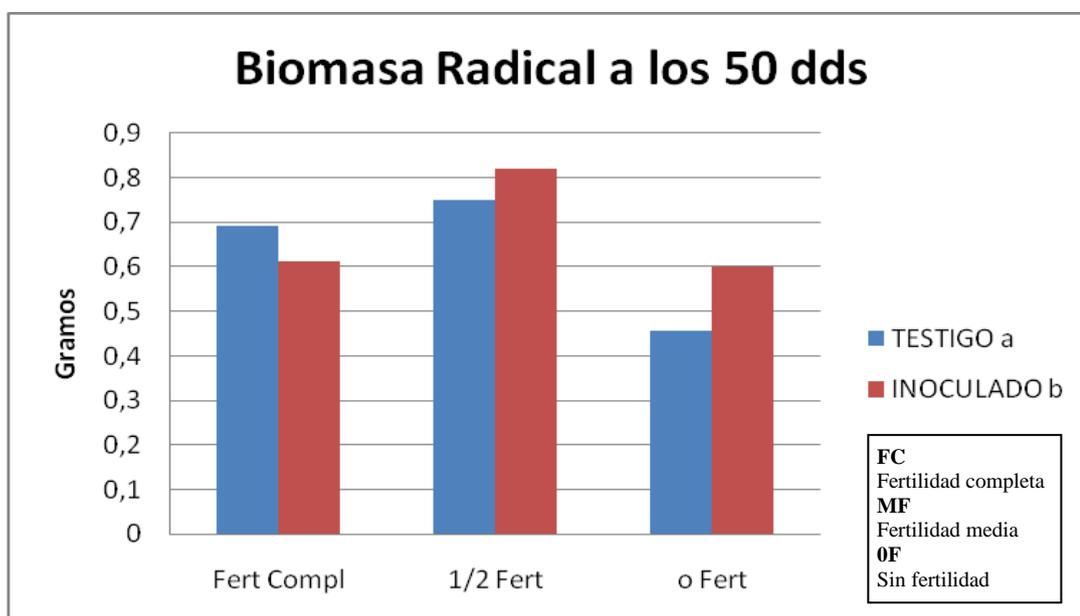


Grafico 5: Biomasa aérea medida a los 50 días después de la siembra (dds). (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

En cuanto al segundo muestreo también hay diferencias significativas entre tratamientos para los dos parámetros expresados en los gráficos 4 y 5. No es tan marcada la diferencia entre tratamientos como en el muestreo anterior, debido a que se podría decir que tampoco es la misma cantidad de nitrógeno disponible, agua y condiciones eco fisiológicas en las que se realizó el muestreo anterior, en consecuencia mejores condiciones de humedad y nutrientes en estadios tempranos nos garantizarían un mayor sinergismo entre la promoción radical y la producción de biomasa aérea para lograr mejores resultados. El hecho de que existan diferencias entre tratamientos es una prueba de que la bacteria actuó y que la promoción vegetal es independiente del nivel de fertilización. Estos resultados refuerzan lo expresado por la bibliografía, acerca de la promoción global del crecimiento vegetal inducido por rizobacterias, permitiendo un mejor aprovechamiento de los recursos del ambiente y provistos por prácticas de nutrición de los cultivos (Bashan y Holguin, 1997).

Componentes del rendimiento:

Los rendimientos alcanzables por los cultivos dependen de la selección de factores que lo determinan (genotipo, fecha de siembra, tipo de suelo) y del resultado del manejo de los elementos limitantes (disponibilidad de agua y nutrientes) y reductores (enfermedades y plagas) de la producción. La acción de estos factores sobre el crecimiento y producción de los cultivos no es independiente y se definen abundantes interacciones que explican la brecha entre los rendimientos logrados y los esperables al reducirse limitaciones en el rendimiento.

Numerosas evidencias han demostrado que de los dos componentes que forman el rendimiento, el número de granos producidos es, el que mejor explica las variaciones en el rendimiento final más que cualquier cambio en el peso de los granos.

A continuación realizaremos un análisis de estos componentes explicando lo sucedido en cada uno de ellos:

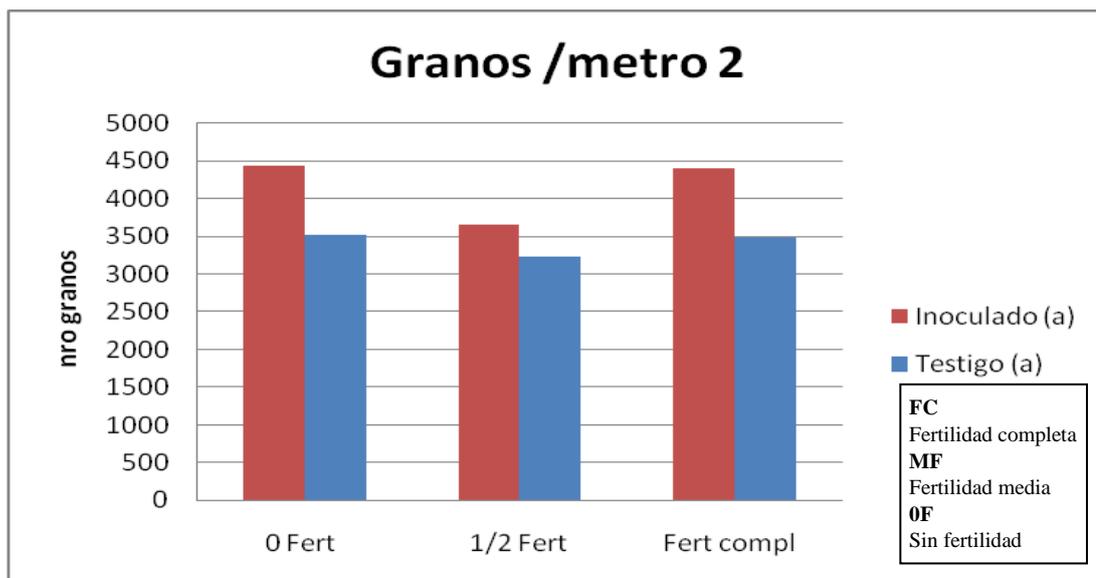


Grafico 6: Numero de granos por metro² (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

Las variaciones en la cantidad de granos por metro² radica en el hecho de que el crecimiento de los granos en post floración, sólo en casos muy poco frecuentes experimentan alguna limitación por fuente (ya sea luz, agua, carbohidratos, etc.). Dicho de otra manera los granos entre si durante su crecimiento difícilmente generan competencia por carbohidratos. Este componente está ligado directamente a las condiciones ambientales y a los recursos disponibles del cultivo, es decir la tasa de llenado, por la que atraviesa la planta, se va a modificar por altas temperaturas o cualquier estrés hídrico o nutricional que experimente el cultivo en ese momento y no podrá ser revertido, ya que el cultivo está llegando a su madurez fisiológica (Satorre *et al.*, 2004).

Al analizar estos componentes podemos aseverar que el tratamiento (inoculado) superó al testigo. Cuando nos referimos a rendimiento estamos hablando de cantidad de granos por m² y el peso de los mil granos. Como los tratamientos no mostraron diferencias significativas (mayores al 5%) para el peso de los mil granos, nos detenemos en analizar el otro componente del rendimiento anteriormente nombrado (cantidad de granos por m²), y que más peso tiene sobre el rendimiento final.

Estudiando la ecofisiología del cultivo, vemos que una vez establecido el stand de plantas, el inicio de macollaje dará comienzo a un periodo donde se generaran nuevos vástagos que alcanzaran el máximo de producción durante el periodo de espigazón, luego del cual comenzara la mortandad de los mismos hasta establecerse el número final de vástagos fértiles en floración (numero de espigas m²) (Satorre *et al.*, 2004). El número de granos es el resultante de número de espigas por m², que depende del macollaje y la supervivencia de los

macollos; y flores fértiles, que cuajaran en un grano, por espiga y que a su vez depende de la supervivencia y generación de primordios florales. Entonces luego de hacer esta reseña atribuimos a que la interacción de la bacteria con la planta en los primeros estadios del cultivo mejoro las condiciones para que el tratamiento inoculado fije más cantidad de granos por superficie que el testigo, y consecuentemente mayor rendimiento.

Lo que observamos fue que la temperatura no fue la optima para esta etapa ontogénica (espigazon), es decir altas temperaturas aceleran la velocidad de crecimiento por lo que el cultivo no fija la mayor cantidad de sitios fértiles, y como este componente del rendimiento se define en antesis es muy importantes las condiciones sobre las que se desarrolla el cultivo en esta etapa. Por lo tanto, para un trigo de ciclo corto (que se supone que macolla menos) sembrado unos días fuera de fecha por falta de humedad, lo que implica que sus etapas fisiológicas se desarrollen a una tasa más acelerada; son las causas por las que no pudo expresar su máximo potencial.

Entonces debemos encontrar una explicación de por qué hay diferencias, y es a través de este análisis que me resulta factible decir que el efecto de la inoculación se observa en la generación de espigas por metro cuadrado y en los granos por espigas, que a su vez es una consecuencia directa de la interacción con la bacteria y las mejores condiciones que el cultivo aprovecha en la implantación, y por otro lado estos componentes son los que variaron más en los tratamientos. Así mismo atribuyo que no hay diferencias significativas para los tratamientos con respecto al rendimiento, debido a las condiciones hídricas en las que se desarrollo el cultivo, y a que se fertilizó a la siembra ya que luego podría no tenerse humedad, por la razón misma que la zona de Río Cuarto presenta un clima monzónico con estación invernal seca, por lo que esta práctica cultural solo ejerce un efecto arrancador en el cultivo mejorando las condiciones de implantación y no como promotor de las condiciones en el periodo crítico de rendimiento del cultivo. A pesar de que las dosis de fertilizantes estaban calculadas para un máximo rendimiento el testigo no supero al inoculado, y me inclino a que este aumento de rendimiento por parte del tratamiento se debe a la acción promotora de la bacteria más que a la fertilización.

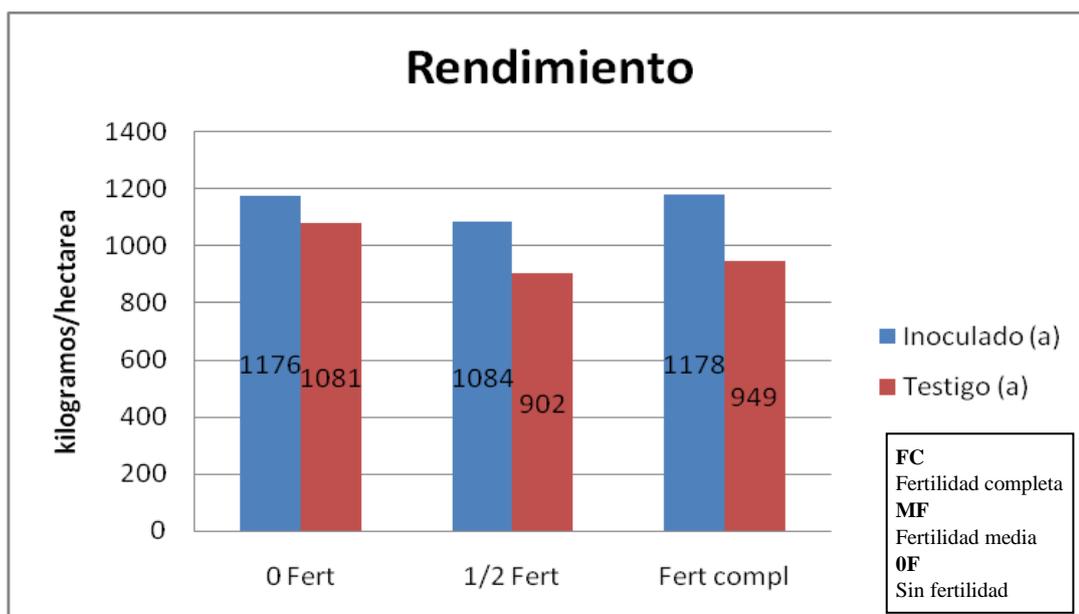


Grafico 7: Rendimiento en kg/ha. (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

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

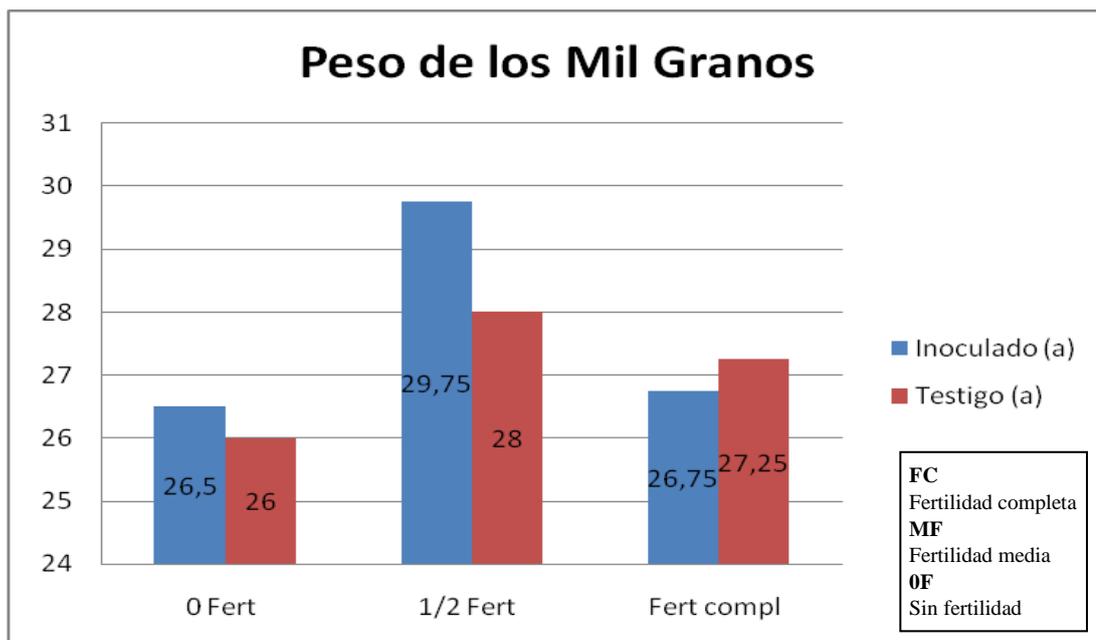


Grafico 8: Peso de los mil granos. (Letras diferentes indican diferencias significativas mayores al 5%) $p \geq 5\%$

Este componente del rendimiento es muy dependiente de las condiciones ambientales de el periodo en el cual se lleva a cabo por lo que hacer un análisis de un solo año no sería valido porque puede haber estado influenciado por cualquier estrés y distorsionar los datos, sin embargo para este año particular no tuvimos diferencias significativas.

Conclusión

Para los parámetros evaluados en todos los estadios se comprobó que hay interacción positiva entre el cultivo y la bacteria, es decir la inoculación con *Azospirillum brasiliense* favoreció el crecimiento y desarrollo del cultivo, sobre todo en la implantación, del mismo, mejorando su capacidad de competir contra malezas y enfermedades, como consecuencia directa de la capacidad de esta bacteria de estimular las plantas.

La inoculación con *Azospirillum brasiliense* mas media dosis de fertilización produce los mismos resultados que la dosis completa de fertilización nitrogenada.

Se comprobó que la bacteria actuó en un amplio rango de condiciones ambientales.

El aumento de rendimiento se explicó por un aumento en el número de granos fijados.

Si bien todas las respuestas encontradas bajo las condiciones en que se realizó el ensayo resultaron positivas sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de trigo, se debería continuar con la investigación para explicar con más exactitud los resultados obtenidos.

Bibliografía

- ARSHAD, M., AND FRANKENBERGER, JR. (1993). Microbial production of plant growth regulators. In: *Soil Microbial Ecology*. Meetin, B. (editor). pp. 307-347. Marcel Dekker, New York.
- BALDANI, V., BALDANI, J., AND DÖBEREIRNER, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum spp.* *Brasil. Biol. Fertil. Soils* 4:37-40
- BALDANI, V.; BALDANI, J. AND DÖBEREIRNER J. (1987). Inoculation of field-grown wheat with *Azospirillum spp.* *Brazil. Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
- BAREA, J., NAVARRO, M. AND MONTOYA, E. (1976). Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *Journal Appl. Bacteriol* 40: 129-134.
- BARRIOS, A. POTENZA AND LÓPEZ, M.V. 1986. Utilización del *Azospirillum* (diazotrofo rizosférico) en el triticultivo. In: Actas del Primer Congreso Nacional de AIANBA. Pergamino, Argentina, 6-10 de Octubre.
- BASHAN Y., S.K HARRISON AND R.E. WHITMOYER 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plant inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbial.* 56:769-775.
- BASHAN, Y.; H, LEVANONY. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology; *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.*36:591-608.
- BELLONE C. H.; S. CARRIZO DE BELLONE .; M.A JAIME ; A.M MANLLA; M.A MONZÓN DE ASCONEGUI; 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.
- BELLONE C.H.; S. CARRIZO DE BELLONE. 2001. *Azospirillum brasilense* induce la producción de caña de azúcar. III Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelo – Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales.
- BERINGER, J.E. 1984. The Significance of Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant Production. *Plant Sci.* 2:269-286.

- BOTHE, H., KÖRSGEN, H., LEHMAHER, T. AND HUNDESHAGEN, B. (1992). Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis* 13: 167-179
- BURG, S. P. AND BURG, E. A. (1966). The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55:262-9
- CANTERO A. Y C. CHOLAKY 1997. Evaluación de tierras. Apunte de uso y Manejo de Suelos.
- CASSÁN F.; PICCOLI P; BOTTINI R. (2003) Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. through GAs production. An alternative model to increase crop yield. En: Microbiología Agrícola. Ed. Albanesi, A. pp: 143-158. UNSE.
- CASSÁN F; PAZ R; MAIALE S; MASCIARELLI O; VIDAL A; LUNA V.; RUÍZ O (2005). Producción de cadaverina por *Azospirillum brasilense* Az39. Un nuevo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Biocell. En prensa.
- CASSÁN, F., BOTTINI, R. AND PICCOLI, P. (2001). In vivo gibberellin A₉ metabolism by *Azospirillum* sp in *dy dwarf* rice mutants seedlings. *Proc. Plant Growth Regul.* 28:124-129
- CASSAN, F., PERRIG, D., MASCIARELLI, O., LUNA, V. 2007. PRODUCCION DE FITOHORMONAS POR *Azospirillum* sp.: aspectos fisiológicos de la promoción del crecimiento vegetal y su potencialidad tecnológica para la formulación de inoculantes en nuestro país. En: Thuar, A., Cassán, F., Olmedo, C. (comp). De la Biología del Suelo a la Agricultura. Ediciones UNRC, Río Cuarto, Córdoba Argentina.
- CASSAN, F., PICCOLI, P., BOTTINI, R. 2003. En: Albanesi, A. (comp) Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Argentina. Ediciones UNSE, Santiago del Estero.
- CATTANEO S.H., C.M CREUS; H. BARIFFI; R.J SUELDO; C.A BARASSI. 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.
- CATTELAN, A.; HARTEL, P. AND FUHRMANN, J. (1999). Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of American Journal* 63:1670–1680.
- CLELAND, R. (1987). Auxin and cell elongation. In: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. P Davies (Ed). Martinus. Nijhoff Dordrecht pp: 132-148.

- COSTACURTA, A. AND VANDERLEYDEN, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol* 21:1-18.
- CREUS, C., SUELDO, R. AND BARASSI, C. (1996). Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Can. J. Bot.* 76:238-244.
- CROZIER, A. P., ARRUDA, J. M., JASMIM, A. M. MONTEIRO, AND G. SANDBERG. (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2833-2837
- CROZIER, A., MALCOM, J. AND GRAEBE, J. (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Chapter 17: 850-864. Academic Press. Cambridge, Londres.
- CURA, J.A; C.M RIBAUDO; A.M GAETANO; H.O GHIGLIONE. 2001 Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo de arroz durante las primeras etapas de su desarrollo.
- DAVIES W. AND JONES, H. (1991). Abscísic acid, physiology and biochemistry. Rios Scientific Publishers, Oxford
- DAVIES, P. (1995). En: *Plant Hormones. Gibberellins: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Kluwer Acad. Press
- DOBBELACRE, S. A. CROONENBERGHS, A. THYS, D. PTACEK, J. VANDERYDEN, P. DUTTO, C. LABANDERA-GONZALEZ, J. CABALLERO-MELLADO, J.F AGUIRRE, Y. KAPULNIK, S. BRENER, S. BURDMAN, D. KADOURT, S. SARIG. Y. OKÓN,(2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Ausust. J. Plant Physiol.* 28:871-879 NN hojas de acuerdo en lo que perjudica al lo son símbolos a cosas conoce como el culo Woomer la ley móvil. Buenas al grado de obligar la unión
- DOBBELAERE, S., CROONENBORGHES, A., THYS, A., VANDE BROEK, A., AND VANDERLEYDEN, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil.* 212: 155–164.
- DÖBEREINER J. (1995). *Azospirillum* spp. En: Como Isolar e Identificar bacterias diazotróficas de plantas nao leguminosas. pp 19-25. (Eds) Motta, A. and Oliveira, M.; Embrapa-SP. Brasilia-DF.

- DÖBEREINER, J. AND PEDROZA, F. (1987). En: Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous. Crop plants Springer Verlag, Berlin en: Brock Springer Series in Contemporary Biology, editorial Science Tech Madison Win. USA.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. AND NERY, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22: 1464-1473.
- El gran libro de la Siembra Directa, desarrollo agrícola y difusión del sistema. Capitulo 1.
- El gran libro de la Siembra Directa, El Suelo: Características y manejo. Capitulo 3.
- Elemento útil en la agricultura. Colegio de postgraduados. Montecillo, Mexico.
- En: www.agro.uba.ar/siav/investigamos/nitrogeno_arroz. Consultado: 25/12/2005
- FERRERA-CERRATO, R. (1995). Efecto de la Rizosfera. Pp. 36-52. En agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable Ferrera- Cerrato R., y J. Perez Moreno (eds) Colegio de Post Graduados Montecillo Estado de México.
Fijación de Nitrógeno, UNAM, Ap. P. 565-A, Cuernavaca, Mor., México.
- FULCHIERI, M., LUCANGELI, C. AND BOTTINI R. (1993). Inoculation with *A. lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedlings roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 1305-1309.
- GLICK B R 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can.J. Microbiol. 41:109-117 Iglesias M, Fogar M, Cracogna M. 2000. Utilización de inoculante mixto en trigo - Ensayo a campo. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. UNNE (CD.ROM). Sección Ciencias Agrarias. N°002. [http //www.unne.edu.ar. /ciencia técnica](http://www.unne.edu.ar./ciencia_tecnica).
- GLICK, B., PATTEN, C., HOLGUIN, G. AND PENROSE, D. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press London, England
- GROBBELAR, N., CLARKE, B. AND HOUGH, M. (1971). The modulation and nitrogen fixation of isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil (Spec. Vol.)* pp. 215-223
- HAGEN, G. (1987). The control of gene expression by auxins. In: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, P Davies, Martinus Nijhoff Dordrecht (Eds). pp. 149-163.
- HEDDEN, P. A PH (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed genes. *Trends in Plant Science.* 5: 523-530.

- HEDDEN, P. A PH (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed genes. *Trends in Plant Science*. 5: 523-530.
- INTA Parana inoculación en trigo con azospirillum Estación Experimental Agropecuaria Paraná del INTA. www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/trigo/evaluacion_manejo/inoc_azos.htm - Consultado: 28/11/2005
- JAIME M; MARTÍN G O (H); FERNÁNDEZ R R; NASIF A Y MARTÍNEZ PULIDO L. (1999). Incremento de productividad en maíz, mediante inoculación con microorganismos fijadores libres de nitrógeno. II Reunión Científico Técnica-Biología del Suelo- Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Catamarca – Facultad de Ciencias Agrarias. Pag. 197-199.
- KAPULNIK, Y., Y. OKON, AND Y. HENIS. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum inoculation*. *Can. J. Microbiol.* 31:881-887.
- KATZNELSON, H. AND BOSE, B. (1959). Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 5: 79-85.
- LUCANGELLI C. Y R. BOTTINI 1996. Actas de la XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Pag. 466-467.
- MANDER, L. (1991). Recent progress in the chemistry and biology of gibberellins. *Sci. Progress Oxford*. 75: 33-50.
- MILLER, C., SKOOG, F., VON SALTZA, M. AND STRONG, F. (1955). Kinetin. a cell division factor for the desoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392.
- MONTANER J. Bayer Crop Science 2005 importancia del trigo en argentina en www.bayercropscience.com.ar. Consultado: 20/12/2005
- MONZON de ASCONEGUI, M. 2003. *Azospirillum* y su interacción con las plantas. En: Albanesi, A. (comp) Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Argentina. Ediciones UNSE, Santiago del Estero.
- NEILANDS, J. AND LEONG, S. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review Plant Physiology* 37: 187-208.
- OKON, Y. (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.* 3: 223-228.

- OKON, Y. AND LABANDERA-GONZÁLEZ, C. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- OKÓN, Y.; 1998- Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. En Nitrogen Fixation: Hundred Years After, ed. by Bothe, H., de Bruijn, FJ, and Newton, WE, Stuttgart, pp. 741–746 In nitrogen fixation hundred years after 741-746.
- OLMEDO C.; A. THUAR; E. RIBERI. 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. Libro resúmenes pag. 37.
- OLMEDO, C.2003 Aspectos Biotecnológicos de las interacciones microorganismo planta. En: Albanesi, A. (comp) Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Argentina. Ediciones UNSE, Santiago del Estero.
- OMAI, S. H., SCHMIDT, W. A., MARTIN, P. AND BANGERTH, F. (1993). Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under in vitro conditions. *Can. J. Microbiol.* 39:187-192.
- PARRET, A.; WYNS, L.; DE MOT, R. AND LORIS, R. (2004). Overexpression, purification and crystallization of bacteriocin LlpA from *Pseudomonas* sp. BW11M. *Acta Cryst.* 60:1922-1924.
- PATTEN C. AND GLICK B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Perez M (eds) 1995. Agro microbiología. Elemento útil en la agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- PEROTTI E.B.R. Y A. PIDELLO. 1999. II Reunión Científico Técnica d obra e Biología del suelo Fijación Biológica del Nitrógeno. F.C.A. Universidad Nacional de Catamarca.
- PERRIG DIEGO S. 2006. Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Azospirillum brasiliense* AZ39, la cepa mas utilizada en la formulación de inoculantes en Argentina
- PICCOLI, P. AND BOTTINI, R. (1994). Effect of C/N ratio, N content, pH and inoculation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Symbiosis* 21: 263-264
- PICCOLI, P. AND BOTTINI, R. (1996). Gibberellins production in *A. lipoferum* cultures y enhanced by light. *Biocell* 20: 185-190.

- PICCOLI, P., LUCANGELI, C., SCHNEIDER, G. AND BOTTINI, R. (1998). Hydrolysis of 17¹⁷ - Gibberellin A and 17, 17- A Esther by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul.* 23: 179-182.
- PICCOLI, P., MASCIARELLI, O. AND BOTTINI, R. (1996). Metabolism of 17, 17 A A, and A by *Azospirillum lipoferum* in chemically defined culture medium. *Symbiosis* 21: 263-274.
- PRIMROSE, S. B. AND DILWORTH, M. J. (1976). Ethylene production by bacteria. *J Gen Microbiol* 93:177-81
- RADEMACHER, W. (1994). Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regulators.* 15: 303-314.
- Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasiliense*. Martín Díaz-Zorita, Rafael M. Baliña, María V. Fernández-Canigia, Alejandro Peticari, Díaz-Zorita.
- Rizobacter “Desarrollo de la aplicación de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo en los principales cultivos del norte de Buenos Aires, Trigo” Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, On-line disponible www.rizobacter.com.ar conectado el 17/11/02.
- RODRÍGUEZ CACERES E.D.; C. DI CIOCCO; 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.
- RODRÍGUEZ, M., M.N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. Pp. 105-126. In: R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez. M. (eds). *Agro microbiología*.
- ROVIRA, A. (1970). Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. K Baker, W Synder (editors). University of California Press, Berkeley. pp. 170-186
- RUIZ R.A.; A.P SÁNCHEZ SERRA.; J.E GARCIA. Y E. H SATORRE 1996. Actas de la XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Pág. 310-311.
- SATORRE, H. R. L. BLENCH ARNOLD, G.A. SLAFER, E. DE LA FUENTE, D. MIRALLES, M. OTEGUI, R. SAVIN. 2004. Producción de Granos bases funcionales para su manejo.

- SCHWYN B; NEILANDS, J. (1987). Universal assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47-56,
- SILVA FILHO G. N. & VIDOR C. 2001 "Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio" *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508.
- STRZELCZYK E., KAMPER, M., AND LI, C. (1994). Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.
- TIBURCIO, A.; KAUR-SAWHNEY, R.; INGERSOLL, R. AND GALSTON, A. (1985). Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiology* 78: 323-326
- TIEN, T.; GASKIN, M. AND HUBBELL, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- VANDE BROEK, A., LAMBRECHT, M. AND VANDERLEYDEN, J. (1999). Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*. 144:2599-2606
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
- YAHALOM, E., OKON, Y. AND DOVRAT, A. (1990). Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the roots morphology and nodule formation in *Medicago polymorpha*. *Can. J. Microbiol.* 36: 10-1