



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

**“Trabajo Final presentado para optar al Grado de
Ingeniero Agrónomo”**

**“Evaluación de la respuesta de un cultivo de trigo fertilizado e
inoculado con *Azospirillum brasilense*”**

**Alumno: Federico Rubén Serafino
DNI: 28.857.996**

Director: Dra. Carmen Olmedo

**Río Cuarto – Córdoba
Septiembre/2012**

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

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Evaluación de la respuesta de un cultivo de trigo Inoculado con *Azospirillum brasilense* según diferentes niveles de fertilización

Autor: Federico Rubén Serafino
DNI: 28857996

Directora: Carmen Olmedo

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

Ing Agr Dra. Marinelli Adriana

Ing Agr MSc. Kearney Marcelo

Dra. Olmedo Carmen

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

El autor de este Trabajo Final desea agradecer la desinteresada colaboración de las muchas personas que ayudaron a la realización del trabajo. Especialmente, se quiere destacar el aporte realizado por las siguientes personas:

A la Dra. Carmen Olmedo de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por dirigir este trabajo y el tiempo dedicado al mismo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, especialmente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

Finalmente, a mis familiares, compañeros y amigos que ayudaron desinteresadamente a la realización de este trabajo.

Resumen:

La República Argentina posee aproximadamente 35.000.000 has de tierras cultivables, de las cuales alrededor del 20 % se dedica al cultivo de trigo. La producción de este cereal se concentra en el Sur de la Región Pampeana y en el Norte de la Pampa Ondulada, siendo los suelos de esta última de texturas gruesas, con contenidos de materia orgánica medio a bajos por lo que las reservas de agua edáfica son normalmente limitantes para la obtención de cultivos de alta producción. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación en trigo con *Azospirillum brasilense* y fertilizado con nitrógeno a campo. El ensayo se llevo a cabo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Ruta nacional 36 – Km. 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina), cuya ubicación geográfica es de 33° 07' S, 64° 14' W y a 421 msnm. La fecha de siembra fue el 22 de junio del 2008, con la variedad de trigo Relmo Torcaza de ciclo largo, el ensayo se llevo a cabo bajo labranza convencional, con una mano de doble acción e implantado con una sembradora de grano fino de tres puntos. El suelo es un hapludol típico característico de la zona. Se utilizó un diseño experimental de parcelas completamente al azar con 5 tratamientos (1. *Testigo no tratado*, 2. *Azospirillum brasilense (LMA)*; 3. *Fertilización con urea en macollaje*, 4. *Fertilización química + Azospirillum brasilense (IC)*, 5. *Azospirillum brasilense (IC)*) y 5 repeticiones, las mismas tuvieron un tamaño de 6 m por 1.40 m lo que hace un total de 8.40 m², 7 surcos a 20 cm. Se realizaron mediciones de longitud radical, biomasa aérea, biomasa radical (Z1,5 escala Zadoks) y rendimiento. Con respecto a las variables evaluadas se encontraron incrementos significativos en longitud radical, biomasa radical en los tratamientos 2 *Azospirillum brasilense (LMA)*, 4 *Fertilización química + Azospirillum brasilense (IC)* y 5 *Azospirillum brasilense (IC)* donde los resultados fueron superiores a los tratamientos 1 *Testigo no tratado* y 3 *Fertilización con urea en macollaje*. Con respecto a la biomasa aérea se observaron diferencias significativas siendo el tratamiento 5 *Azospirillum brasilense (IC)* el que arrojó el mayor resultado en cuanto a peso de biomasa aérea. En cuanto al rendimiento analizando los resultados obtenidos se puede concluir que todos los tratamientos realizados superaron al testigo de manera significativa, y comparando los tratamientos 2. *Azospirillum brasilense (LMA)*; 3. *Fertilización con urea en macollaje*; 4. *Fertilización química + Azospirillum brasilense (IC)* y 5. *Azospirillum brasilense (IC)* no hubo diferencia significativa entre los mismos.

Summary

The Republic of Argentina has about 35 million has of arable land, of which about 20% is dedicated to the cultivation of wheat. Wheat production is concentrated in the south of the Pampas and in the north of the Undulating Pampa. The Undulating Pampa is characterized by having thick texture soils with a medium or low concentration of organic matter. As a consequence, the water concentrated in these soils is frequently not enough for high-crop production. The present work aims at evaluating the effect of wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* and fertilized with nitrogen in soil. The test was conducted at the experimental field at the National University of Río Cuarto (national route 36 - Km. 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina). The university is located at 33 ° 07' S, 64o 14' W and 421 m.a.s.l. The sowing date was June 22, 2008, with the variety of wheat Relmo Torcaza of long cycle. The test was carried out under conventional tillage, with a double action hand and implanted with a three-point seeder used for thin grain. The ground was a typical hapludol. An experimental design of parcels, which were chosen randomly with five different treatments 1 not Treated Testing, 2.*Azospirillum brasilense* (LMA); 3 Urea tillering nitrogen fertilization, 4. chemical fertilization *Azospirillum brasilense* (IC), 5.*Azospirillum brasilense* (IC), was used and 5 repetitions which had a size of 6 m and 1.40 m which makes a total of 8.40 m², 7 rows of 20 cm. There were measurements of root length, aboveground biomass, radical biomass (Z1, 5 Zadoks scale) and performance. Regarding the evaluated variables, significant increases in radical length, radical biomass in treatments 2 *Azospirillum brasilense* (LMA), 4 Chemical fertilization + *Azospirillum brasilense* (IC) and 5 *Azospirillum brasilense* (IC) were found. The results were higher than treatments 1 Not treated Testing and 3 Urea tillering nitrogen fertilization. In relation to aerial biomass, important differences were observed. Treatment 5 *Azospirillum brasilense* (IC) was the one which proved higher results in relation to aerial biomass. As far as the performance is concerned and analyzing the results obtained, it can be said that all the treatments carried out were superior that the testigo. Furthermore, there was not an important difference between treatments 2.*Azospirillum brasilense* (LMA); 3. Urea tillering nitrogen fertilization; 4. Chemical Fertilization + *Azospirillum brasilense* (IC) and 5.*Azospirillum brasilense* (IC).

ÍNDICE TEMÁTICO

<i>Introducción</i> -----	1-2
<i>El cultivo de Trigo</i> -----	3-4
<i>Producción Mundial</i> -----	5
<i>Comercio Mundial</i> -----	5
<i>Fertilización Nitrogenada</i> -----	6
<i>Distribución geográfica del genero Azospirillum</i> -----	7
<i>Biología de Azospirillum sp</i> -----	7-8
<i>Mecanismos de acción de Azospirillum sp</i> -----	8-9
<i>Antecedentes</i> -----	10-12
<i>Hipótesis</i> -----	13
<i>Objetivos</i> -----	13
<i>Objetivos generales</i>	
<i>Objetivos específicos</i>	
<i>Materiales y Métodos</i> -----	14-16
<i>Resultado y Discusión</i> -----	17-22
<i>Conclusión</i> -----	23
<i>Bibliografía</i> -----	24-28
<i>Anexo I: Producción Mundial de Trigo</i> -----	29
<i>Anexo II: Principales Países Productores de Trigo</i> -----	29
<i>Anexo III: Producción de Trigo por Provincias</i> -----	30
<i>Anexo IV: Tablas y ecuaciones</i> -----	31-34
<i>Anexo V: Análisis Estadístico</i> -----	35-44

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1. Longitud total de la Raíz</i> -----	17
<i>Fig. 2. Peso seco de la Raíz</i> -----	18
<i>Fig. 3. Biomasa aérea</i> -----	19
<i>Fig. 4. Numero de granos/m² cosechados</i> -----	20
<i>Fig. 5. Peso de los granos en 0,25 m²</i> -----	21
<i>Fig. 6. Rendimiento en kg/ha de los diferentes tratamientos</i> -----	22

INTRODUCCIÓN

En el siglo pasado el aumento de la población 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 vía 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 zonas 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). Dentro de las bacterias asociativas

mas estudiadas se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum sp* 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 mas 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).

El Cultivo de Trigo

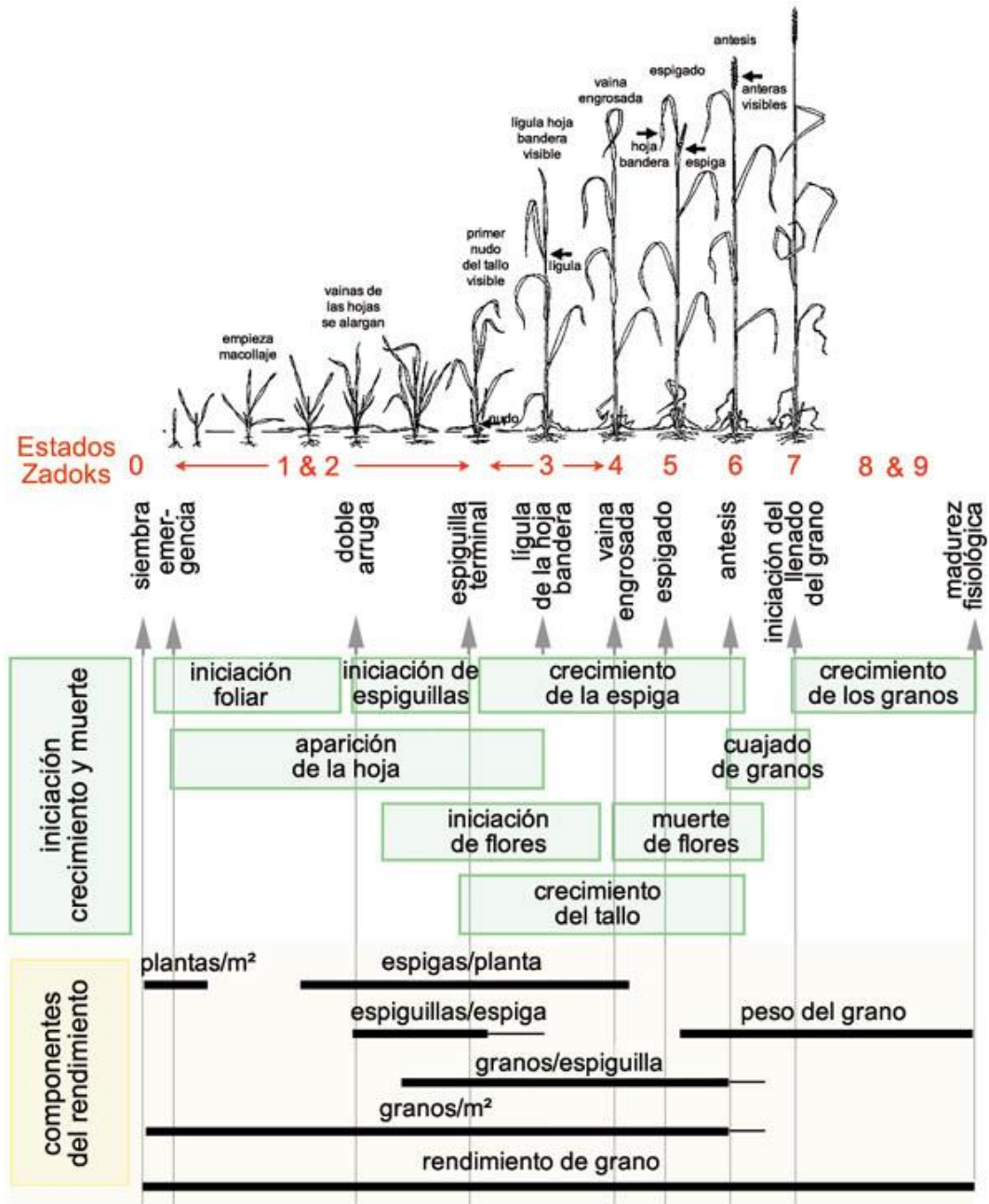
La producción de este cereal se concentra en el Sur de la Región Pampeana y en el Norte de la Pampa Ondulada, siendo los suelos de esta última de texturas gruesas, con contenidos de materia orgánica medio a bajos por lo que las reservas de agua edáfica son normalmente limitantes para la obtención de cultivos de alta producción (Díaz Zorita *et al.*, 1998). Por lo tanto, 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). La acumulación de biomasa es variable a lo largo del ciclo del cultivo observándose un período de máximo crecimiento durante encañazón (Miralles y Slafer, 2001). En el caso del trigo el rendimiento en grano es función del producto del número de espigas por unidad de área (ha o m²), el número de granos por espiga y el peso de los granos. La definición de estos componentes del rendimiento es secuencial siguiendo el desarrollo del cultivo y la demanda de nitrógeno varía a lo largo del mismo (Miguez, 2004).

La densidad de espigas se define realizando una siembra precisa, apuntando a lograrla con la cantidad de semilla apropiada. Durante el período vegetativo se generan los macollos que tienen el potencial de desarrollar espigas con granos. El monitoreo de la densidad de macollos es crítica para estimar las necesidades de fertilización suplementaria. La elongación de los tallos marca el fin del macollaje y el comienzo del período reproductivo. La espiga embrionaria que se ha formado en la base del tallo comienza a emerger y en ese período se forma el máximo número posible de granos. Enseguida de este estadio, cuando el 1er. nudo se hace visible, el daño por tráfico o pisoteo es irreversible. Un momento importante es cuando emerge la hoja bandera. En ese momento se observa una alta producción de carbohidratos para el llenado de los granos. Debe protegerse de enfermedades e insectos y asegurarse un largo período vegetativo para desarrollar un alto potencial de producción.

El número de granos por ha, se define alrededor de antesis y el peso al finalizar el período de llenado. La supervivencia de los primordios florales tendrá una gran incidencia en el número de granos/m² logrados. El número de flores que se polinizan determina el número de granos por espiga. El peso de los granos de la espiga puede expresarse como el producto entre la duración en días de su período de crecimiento y su tasa de crecimiento (el aumento de materia seca de espiga por m² y por día). El período en que las espigas ganan el 95% del peso que alcanzarán una semana después de antesis (período de crecimiento de las espigas), comienza durante la encañazón. Normalmente no hay gran relación entre el rendimiento y el peso de los granos, ya que esta característica está más bien determinada por la genética de la variedad. En cambio, hay una gran correlación entre el rendimiento y el número de granos/m², es decir el producto de la densidad de espiga por m² y el número de granos por

espiga. El objetivo según la zona debería establecerse alrededor de obtener una densidad de espigas entre 500 y 600 por m², con 25 a 35 granos por espiga (Melgar,2005).

Componentes del rendimiento y fases de desarrollo:



(Rawson y Subedi 1996)

Producción mundial:

A nivel mundial, el mejoramiento de las técnicas de cultivo y la selección genética nos conduce a un incremento considerable de sus rendimientos, pasando de menos de 10 quintales / ha en 1900 a más de 25 en 1990. El rendimiento del trigo en los países de América del Sur se mantiene estable con 20 quintales / ha, y África y el Cercano Oriente con 10 quintales, Egipto y Arabia Saudita alcanzan en terrenos irrigados de 35 a 40 quintales. En Europa, los rendimientos más altos son obtenidos en cultivos intensivos. El rendimiento medio ha pasado de 30 a 60 quintales / ha durante los últimos 30 años, logrando un crecimiento medio de 1 quintal/ha/año.

El aumento del rendimiento y de las superficies cultivadas nos conducen de esta forma a un gran incremento de la producción, la cual alcanzaba 275 millones de toneladas en 1965 y 628 millones de toneladas en 2005. El trigo es igualmente el primer cereal desde el punto de vista comercial (45% de los intercambios totales en 1998).

Anualmente se producen 100 kg de trigo por cada habitante en el mundo. Casi toda su producción se destina a la alimentación humana. La producción mundial de trigo desde 1996 hasta 2005 (ver anexo 1)

Principales países productores:

El trigo puede crecer en diversidad de latitudes, climas y suelos, aunque se desarrolla mejor en zonas templadas. Debido a esto, es posible encontrar cosechas de trigo en todos los continentes. (ver anexo 2)

Producción de Trigo por provincia: (ver anexo 3)

Comercio mundial:

Después de la caída del precio mundial del trigo producida en el año 2001 y su rápida recuperación, el precio ha tenido una tendencia a estabilizarse en los años posteriores oscilando entre los 140 y 150 dólares estadounidenses por tonelada.

En 2002 las exportaciones de trigo ascendieron a 121,3 millones de toneladas siendo los principales países exportadores Estados Unidos (20%), Australia (12,1%), Francia (11,3%) y Canadá (10,1%), seguidos por Argentina, Rusia y Ucrania.

Por otra parte, 32 países importaron en el 2002 más de 1 millón de toneladas representando un 80% del total. Los mayores importadores de trigo fueron Italia (6,5%), Brasil (5,5%), España (5,3%), Argelia (5%), Japón (4,9%), seguidos por Egipto, Indonesia, Irán, Corea del Sur, Holanda, Bélgica, Marruecos, entre otros (FAO 2006).

Fertilización nitrogenada:

El nitrógeno es considerado el nutriente más importante para la producción vegetal por las cantidades requeridas por los cultivos y por la frecuencia con que se observan deficiencias en suelos agrícolas. La mayor fuente de nitrógeno es la atmósfera, y las plantas no pueden absorber directamente el nitrógeno del aire, por lo que éste debe ser fijado por microorganismos de vida libre o simbióticos (García, 1994).

La fertilización busca neutralizar posibles deficiencias nutricionales del cultivo para no limitar la expresión de su potencial genético, pero el rendimiento final es el resultado de la interacción de muchos factores lo que determina que siempre exista un cierto grado de incertidumbre respecto del resultado. Es necesario notar, que para maximizar la eficiencia del fertilizante nitrogenado debe sincronizarse la disponibilidad del N aplicado con la demanda del cultivo. Esta sincronización implica distintos momentos de aplicación, desde aquellos más tempranos, cuando el horizonte de tiempo es más largo e incierto, por ende las decisiones sobre dosis son más riesgosas, hasta los momentos finales de definición de la calidad del grano, cuando se tiene bastante certeza del potencial de rinde del cultivo, del precio del grano, y por lo tanto las decisiones de fertilización son más seguras y mejores. El N debe estar disponible para el cultivo a fines de macollaje, principio de encañazón que es el momento en que la absorción es más activa. Debemos tomar en cuenta que si utilizamos urea como fuente de N, ésta necesita hidrolizarse y transformarse microbiológicamente en nitratos para poder ser absorbida por el cultivo (Miguez, 2004).

El exceso de N produce plantas que pueden ser susceptibles de vuelco y de enfermedades que disminuirán el rendimiento y aumentarán el costo de fertilización y cosecha. Por el contrario, una deficiente disponibilidad de N reducirá el margen en relación a un cultivo bien fertilizado. La dosis y el momento de la fertilización nitrogenada son las mejores herramientas disponibles para producir un alto rinde por hectárea. El N afecta los tres componentes mencionados del rendimiento. Espigas por hectáreas, granos por espiga y peso de grano, así como un importante componente de la calidad como es el porcentaje de proteína. El patrón de absorción de N es la base para desarrollar un eficiente y sensible programa de fertilización. Durante los primeros estadios la absorción de N es muy baja y aumenta sensiblemente al finalizar el macollaje (Melgar, 2005).

Los PGPRs, (*Plant Growth Promoting Rhizobacterias*), literalmente *Rizobacterias Promotoras de Crecimiento de las Plantas* (Piao *et al.*, 1992) no establecen simbiosis mutualística con las plantas, son microorganismos de vida libre, que si bien pueden beneficiarse de la actividad de la planta no dependen de éstas para llevar a cabo sus ciclos vitales (Pazos *et al.*, 2004). Entre las PGPR se incluye *Azospirillum sp*, el cual es

considerado un sistema modelo para el estudio de la asociación entre bacterias y plantas que no nodulan, corroborado en numerosos trabajos donde la inoculación con esta bacteria en algunas gramíneas de interés alimenticio provoca un incremento en la producción de granos (Pazos *et al.*, 2004).

Distribución geográfica del genero *Azospirillum sp.*:

El genero *Azospirillum sp* muestran una muy amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Aún cuando son mas abundantes en las regiones tropicales, también se las encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas. En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia la presencia de *Azospirillum sp* es menor al 10% en las muestras analizadas . El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum sp*. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aún cuando a pH menores de 5 se les encuentra en forma esporádico y no lográndose su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5. Las bacterias del género *Azospirillum sp* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una muy amplia variedad de plantas y de su rizósfera, incluyendo cereales como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena (Döbereiner, 1992).

Biología de *Azospirillum sp*

El género *Azospirillum sp* no presenta especificidad, ya que ha sido comprobada su asociación con distintas gramíneas y se ha demostrado que la inoculación de trigo y maíz con *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, lo que permite a ambos cereales incrementar la capacidad de tolerancia al estrés hídrico y/o osmótico (Creus, 2000).

El género *Azospirillum sp* pertenece a la subclase alfa de las proteo bacterias, siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Young, 1992). Características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral (Döbereiner, 1992).

Las células contienen cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes. No obstante, en este medio pueden hallarse colonias mutantes de *Azospirillum sp* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados (Bastarrachea *et al.*, 1987). Diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas son utilizadas rutinariamente para el reconocimiento de las especies de *Azospirillum sp*. Adicionalmente, la diferenciación de especies del género *Azospirillum sp* se logra evaluando la capacidad de usar diversos aminoácidos y su efecto sobre la fijación de nitrógeno, recomendándose el uso de la histidina para la caracterización y aislamiento selectivo de la especie *A. lipoferum*

(Hartmann *et al.*, 1988). En forma complementaria para la identificación fenotípica de las especies de *Azospirillum sp* pueden ser usadas diversas técnicas inmunológicas. El uso de la técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permite la identificación y numeración específica de cepas de *Azospirillum sp*, como fué demostrado con la cepa de *A.brasilense* permitiendo evaluar la capacidad de colonización de esta cepa en plantas inoculadas (Levanony *et al.*,1987). La identificación genotípica específica a nivel de género y especies de *Azospirillum sp* se logra en forma reproducible mediante el uso de sondas basadas en secuencias de los genes 23S rRNA (Kirchhof y Hartmann, 1992).

La existencia de cromosomas múltiples en *A. brasilense* ha sido corroborada, pero se reporta la existencia de un cromosoma extra de alrededor de 2500-kb (Marín-Didonet *et al.*, 2000). En las otras especies de *Azospirillum sp* también se encontró que el genoma está constituido por varios cromosomas, confirmándose la hipótesis sugerida previamente sobre la multiplicidad de cromosomas en el género *Azospirillum sp*. Así, dicho género se suma al reducido grupo de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens* , *Brucella spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Rhodobacter spheroides*, *Vibrio parahaemolyticus*) que presentan varios cromosomas en lugar de un solo cromosoma circular (Caballero-Mellado *et al.*, 1999). La presencia de plásmidos es común en *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo ésta una de las primeras características genómicas reportadas para el género *Azospirillum sp* . (Wood *et al.*, 1982).

Mecanismos de acción de *Azospirillum sp*

Los mecanismos de acción promotora propuestos para *Azospirillum sp*. entre otros son: fijación biológica de nitrógeno (Dobereiner, 1983) y producción de Fitohormonas (Bottini y Fulchieri, 1989). La fijación biológica del nitrógeno es un proceso de gran importancia pues permite una sustancial economía de fertilizantes nitrogenados en la agricultura. La contribución efectiva de estos microorganismos para el balance del nitrógeno de los vegetales, aun constituye un motivo de investigación, principalmente en cultivos de cereales. Según Olmedo *et al.*, (2001) *Azospirillum brasilense* en el cultivo de trigo podría reemplazar en un 50 % a la fertilización nitrogenada, este resultado demostró en un ensayo a campo, una importante interacción inoculante-fertilizante, posibilitando una nueva alternativa en cuanto al uso de los mismos con el beneficio de disminuir tanto el costo económico como ecológico de los agroecosistemas.

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum sp*. Las dos primeros en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* siendo éstas las mas ampliamente estudiadas. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense* , *A. halopraeferans* , *A. irakense* y *A. largomobile* siendo el nombre de esta especie corregido a

A. largimobile (Tarrand *et al.*, 1978). La asociación de *Azospirillum sp* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes. La primera consiste en una adsorción rápida, débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar. La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 hs después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum sp* (Michiels *et al.*, 1991).

Aparentemente, una bacteria del suelo deberá sobrevivir a las múltiples interacciones que se presentan con la compleja comunidad microbiana que habita el mismo microambiente, antes de que ocurra cualquier interacción con las raíces de la planta. En el inicio de una interacción con las raíces de la planta hospedante, el microorganismo específico deberá llegar a la superficie de las raíces, adherirse y multiplicarse para colonizarla. Si la bacteria tiene la capacidad de invadir los tejidos internos, se diseminará en el interior de la raíz e incluso en otros órganos de la planta. La adaptación de *Azospirillum sp* al futuro ambiente rizosférico probablemente se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. Posteriormente, la exudación de compuestos será a través de las raíces durante el desarrollo de la planta. Aun cuando las especies de *Azospirillum sp* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico y succínico y algunos aminoácidos (Hartmann *et al.*, 1988).

Tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H₂ y CO₂, proceso en el que participa la ribulosa-1,5- difosfato carboxilasa. *A. brasilense* puede metabolizar varios mono y disacáridos constituyentes de la pared celular de las raíces. No obstante, la colonización de la rizosfera y la superficie o el interior de las raíces será el resultado del enriquecimiento selectivo de los microorganismos mejor adaptados a estos ambientes (Tilak *et al.*, 1986).

ANTECEDENTES

La capacidad de *Azospirillum* para adherirse a las raíces, al menos a las de mijo, es significativamente mayor que la mostrada por otras bacterias de la comunidad rizosférica como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas*, e incluso que *E. Coli* (Umali-García *et al.*, 1980). Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* tiene la capacidad para adherirse a las raíces de gramíneas como el mijo, trigo, maíz, así como a las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón y tomate, e incluso a superficies inertes como polietileno y arena (Jain y Patriquin, 1984).

La inoculación de diversas plantas ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales. Sólo algunas células de *Azospirillum* llegan a adherirse a los pelos radicales (Kapulnik *et al.*, 1985).

La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz (Vande Broek *et al.*, 1993).

Creus *et al.* (1996) encontraron que la presencia de *Azospirillum sp* 245 mejora el estado hídrico de plántulas de trigo.

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).

Lucangeli y Bottini (1996) demostraron que la presencia de la bacteria *A. lipoferum sp* 33 o *A. brasilense cd* incremento 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.

Varios microorganismos del suelo, comunes en la rizosfera son capaces de producir cantidades de fitohormonas, las que tienen un pronunciado efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y la inoculación con *Azospirillum* es una práctica en biotecnología que tiene este objetivo (Perotti y Pidello, 1999).

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 (Dobbela *et al.*, 2001).

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

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 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 semillas de trigo con *Azospirillum brasilense* y encontró un marcado efecto en la proliferación de pelos radicales, lo que proporciono un mejor anclaje y un mayor volumen de suelo explorado por parte del sistema radical. Olmedo, *et al.* (2002) concluyeron que la inoculación de semillas 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 fosforo 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.

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 dual de leguminosas con *Azospirillum* más 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 nódulos 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 las leguminosas aumentando potencialmente el número de sitios para la infección por los rizobios, y por lo tanto mayor

posibilidad de nodulación (Olmedo, 2003). *Azospirillum* también es utilizado 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 polisacárido, 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 aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Azospirillum* en los cultivos ha demostrado efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Díaz Zorita y Peticari, 2004).

Si bien existen muchos trabajos en donde las ventajas resultan de la posibilidad del ahorro de fertilizantes (40 a 50%), es también muy abundante y consistente aquella bibliografía en la cual se observan efectos aditivos (en forma independiente del agregado de nutrientes) (Díaz Zorita et al. 2006).

Efectos como una más rápida implantación, mayor crecimiento radicular y acumulación de biomasa, tolerancia mejorada a patógenos, fijación biológica y solubilización de nutrientes son habitualmente reportados en estas experiencias (Ferraris et al., 2006; Ferraris, 2009), además de incrementos de rendimiento que suelen ubicarse entre el 5 y 10 % sobre los testigos no inoculados, como valores medios (Díaz Zorita y Fernández Canigia, 2008).

Con la finalidad de generar información local sobre el uso de inoculantes en base a *Azospirillum sp*, se desarrollo una experiencia cuyo objetivo fue evaluar la repuesta del cultivo de trigo inoculado con *Azospirillum brasilense* y fertilizado con Nitrógeno a campo.

HIPÓTESIS

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

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la respuesta del cultivo de trigo inoculado con *Azospirillum brasilense* y fertilizado con Nitrógeno a campo.

Objetivo específico:

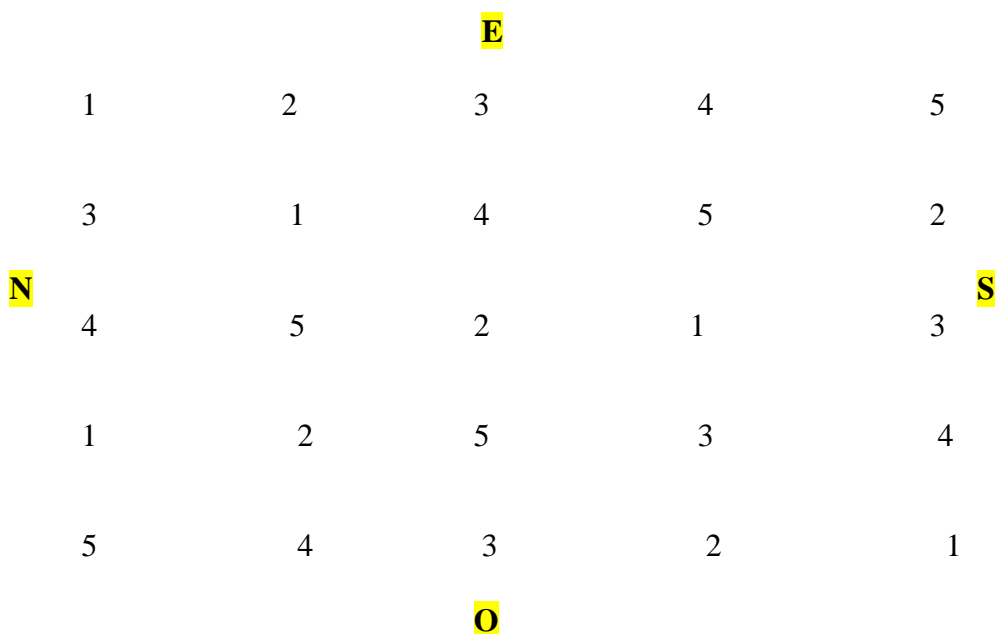
Analizar la interacción de la inoculación y fertilización y sus beneficios sobre el cultivo de trigo en:

- Etapas de emergencia y desarrollo
- Componentes del rendimiento

MATERIALES Y METODOS

El ensayo se llevo a cabo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, cuya ubicación geográfica es de 33° 07' S, 64° 14' W y a 421 msnm. La fecha de siembra fue el 22 de junio del 2008, con la variedad de trigo Relmo Torcaza de ciclo largo, el ensayo se llevo a cabo bajo labranza convencional, con una mano de doble acción e implantado con una sembradora de grano fino de tres puntos. El suelo es un hapludol típico característico de la zona. Se utilizo un diseño experimental de parcelas completamente al azar con 5 tratamientos y 5 repeticiones, las parcelas fueron de 6 m por 1.40 m lo que hace un total de 8.40 m², 7 surcos a 20 cm.

Diagrama de parcelas:



Los tratamientos que se realizaran fueron:

1. Testigo no tratado.
2. *Azospirillum brasilense*, cepa (LMA) aislada en el laboratorio de Microbiología Agrícola
3. Fertilizado con urea en macollaje.
4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)
5. *Azospirillum brasilense* (IC) inoculante comercial

A- Cuantificación de la promoción del crecimiento (determinado en etapa de emergencia, macollaje)

A₁- Medición de la longitud total de raíces (V5)

La determinación se realizó por el método de la intersección de líneas (Newman E, 1986). Para ello se utilizó un área rectangular, dentro de la cual se construyó una cuadrícula. Luego de remover el suelo adherido a la raíz, esta se colocó sobre la cuadrícula, y se procedió a contar el número de intersecciones entre las líneas de esta y los pelos radicales. La muestra a la cual se le realizó la determinación, fue de tres plantas por cada tratamiento y cinco repeticiones.

A partir del número de intersecciones se puede estimar la longitud de la raíz, mediante la siguiente ecuación:

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

donde

R : longitud total de la raíz.

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

A : área del rectángulo (26 cm x 20 cm).

H : cantidad de cuadrículas (130) por longitud de la cuadrícula (2).

π : 3,14.

A₂- Determinación de peso seco aéreo y de raíz (gr.)

Las tres plantas a las que se les efectuó la determinación de la longitud total de raíces, se las dividió en parte aérea y raíz para efectuar la determinación del peso seco de las mismas. Para ello se colocó en estufa durante 48 hs a 80° C (hasta peso constante).

A₃- Componentes del rendimiento

Finalizado el ciclo del cultivo, se cosechó 1 m² de cada una de las parcelas sembradas. Esta muestra representativa se llevó al laboratorio para realizar la determinación del rendimiento y del peso de 1000 granos.

B- Determinaciones posteriores a la cosecha

B₁- Evaluación del rendimiento del cultivo de trigo

Los granos obtenidos de cada uno de los tratamientos se pesaron, luego se calculó, a partir de ese valor, el rendimiento en kg/ha.

B₂- Peso de los 1000 granos de trigo

Se pesaron 200 semillas de trigo de cada uno de los tratamientos, y luego se estimó el peso de 1000 granos.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el Test LSD de comparaciones múltiples de las medidas con un nivel de significancia del 5%. Los valores de peso seco aéreo y de raíz se transformaron por la función $\log(x+1)$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos, se comparó la **longitud de la raíz**, (figura 1) y se observó la conformación de dos grupos. El primero conformado por los tratamientos 1 y 3, (1. Testigo no tratado; 3. Fertilización con urea en macollaje); y el segundo grupo, formado por los tratamientos 2, 4 y 5, (2. *Azospirillum brasilense* (LMA); 4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC) y 5. *Azospirillum brasilense* (IC)) no presentaron diferencias significativas dentro del grupo. Al realizar la comparación entre grupos se observa que existen diferencias significativas mayor al 5% (cuadro 3 Anexos), dichos resultados coinciden con los obtenidos por Okon (1998) cuando inoculó semillas de trigo con *Azospirillum brasilense* y encontró un marcado efecto en la proliferación de pelos radicales, lo que proporcionó un mejor anclaje y un mayor volumen de suelo explorado por parte del sistema radical permitiendo una mejor nutrición.

Longitud Total de la Raíz (cm)

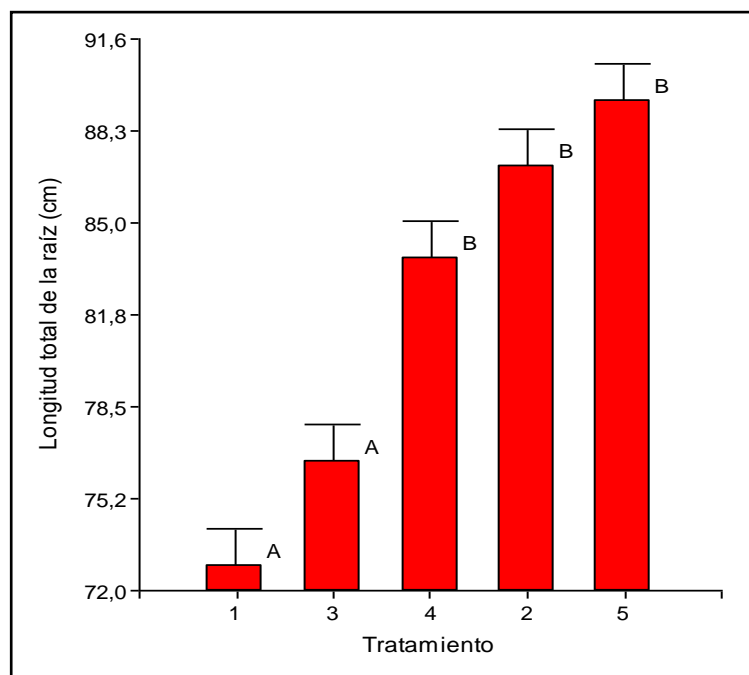


Figura 1: Longitud total de la raíz (cm) según tratamiento

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA);

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC)

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

Los resultados de **peso seco de la raíz**, (figura 2) permitieron ver la conformación de tres grupos, el primero formado por los tratamientos 1, y 3, el segundo, formado por el

tratamiento 4, y el tercero, formados por los tratamientos 2 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro del grupo. Al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas (cuadro 11 Anexos). Estos resultados difieren de los obtenidos por Olmedo, (2002) en que los tratamientos con bacterias PGPR del genero *Azospirillum*, más urea y fosfato presentaron mayor longitud radical y esas diferencias se mantuvieron en los parámetros peso seco del sistema radical y de biomasa aérea en estado V5 (escala Zadocks emergencia de inflorescencia) de un cultivo de trigo a campo, mientras que en este trabajo el mayor peso de raíces se encontró en los tratamientos que incluyeron solo *Azospirillum brasilense* y no en el tratamiento *Fertilización química (urea) + Azospirillum brasilense*

Peso seco de la raíz (gr)

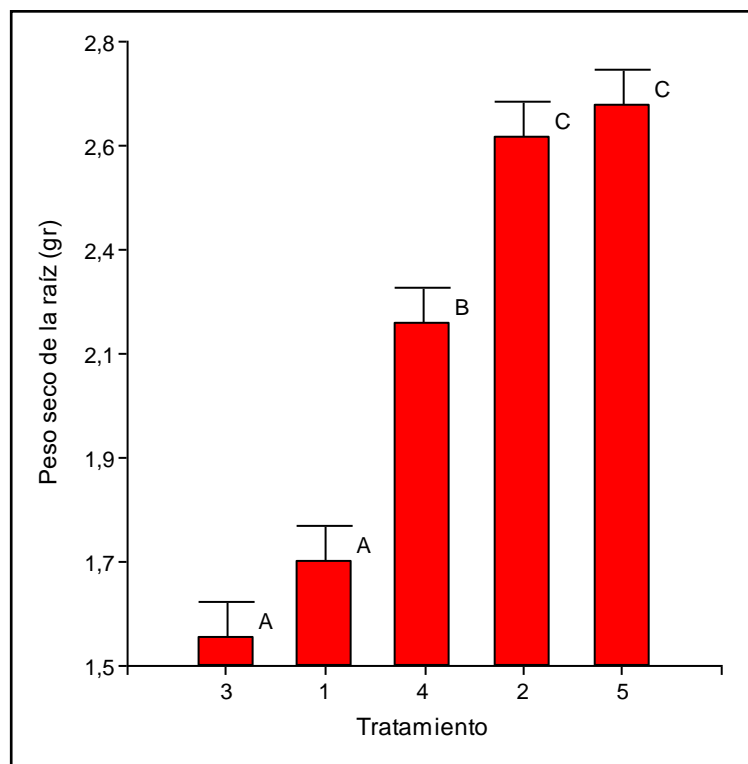


Figura 2: Peso seco de la raíz (gr)

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA)

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC).

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

Los resultados de **Biomasa aérea** se dividen en dos grupos. Uno, formado por los tratamientos 1, 2, 3 y 4, y el segundo, formado por el tratamiento 5, no presentaron diferencias significativas dentro del grupo. Al realizar la comparación entre grupos se

observaron diferencias significativas (cuadro 7 Anexos), encontrándose el mayor peso aéreo en el tratamiento con *Azospirillum brasilense* (inoculante comercial) aplicado en forma única sin el agregado de fertilizantes. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Díaz Zorita y Peticari, (2004) donde encontraron que la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Azospirillum* en los cultivos demostraban efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. En nuestro caso hubo tratamientos con *Azospirillum brasilense* que no experimentaron efectos positivos como el tratamiento 2 y 4 que fueron superados por el tratamiento 5.

Biomasa aérea (peso seco)

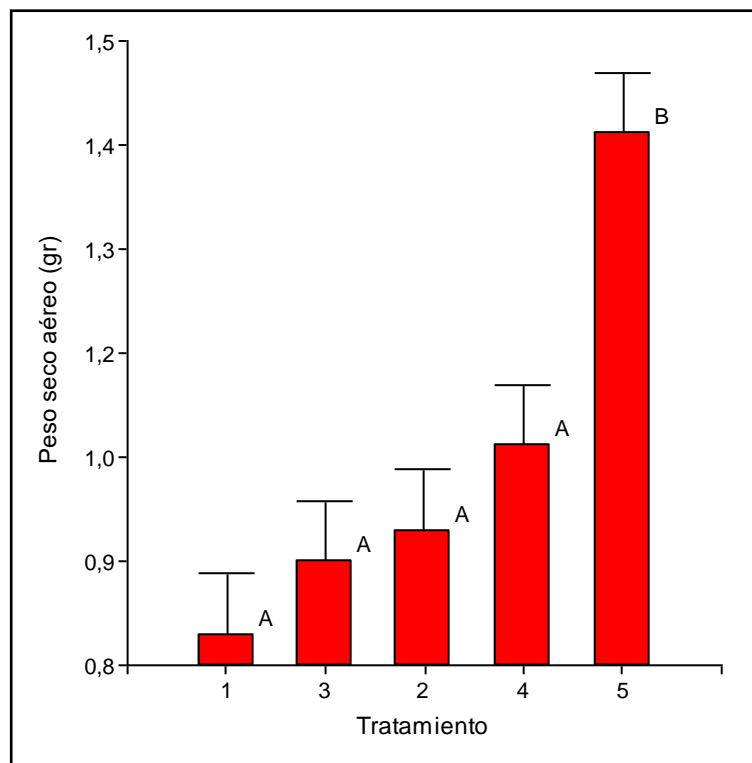


Figura 3: Biomasa aérea (peso seco)

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA)

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC).

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

Las variaciones en la cantidad de granos por m² radica en el hecho de que el crecimiento de los granos en post floración, solo en casos muy poco frecuentes experimentan alguna limitación por fuente, ya sea luz, agua, carbohidratos, etc. 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 esta llegando a su madurez fisiológica (Satorre *et al.*, 2004). Al analizar los resultados de la variable **numero de grano/m²**, (figura 4) se observó que los tratamientos 2, 3, 4, 5 mostraron diferencia significativa con el tratamiento 1 en el número de granos cosechados. Esto coincide con lo observado por García (1994) quien sostuvo que el nitrógeno es considerado el nutriente más importante para la producción vegetal según las cantidades requeridas por los cultivos y por la frecuencia con que se observan deficiencias en suelos agrícolas.

Numero de granos/m² cosechados

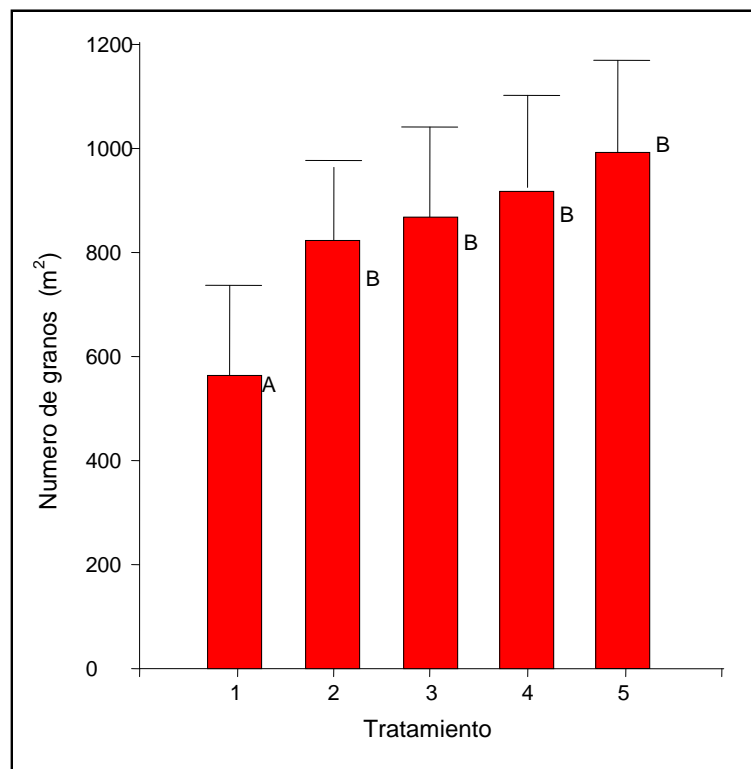


Figura 4: Numero de granos/m² cosechas

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA)

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC).

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

Los resultados obtenidos sobre el parámetro **peso de los granos**, (figura 5) posibilitó la conformación de dos grupos. Uno, conformado por el tratamiento 1 y el segundo grupo, formado por los tratamientos 2, 3, 4 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro del grupo. En la comparación entre grupos se observa que existen diferencias significativas mayor al 5% entre todos los tratamientos con respecto al testigo (cuadro 17 Anexos). Al igual que la variable anterior (numero de granos) se observa que el peso de los granos

depende principalmente de la inoculación con *Azospirillum brasilense*, y de la fertilización nitrogenada los cuales arrojaron los mayores valores.

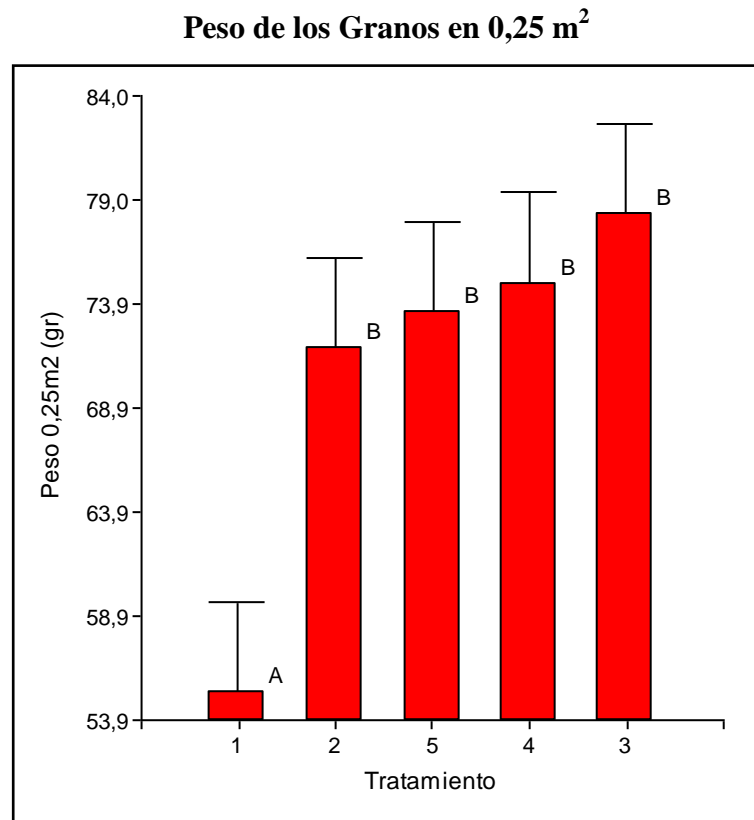


Figura 5: Peso de los granos en 0,25 m²

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA)

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC).

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

Por su parte 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). La materia seca de la biomasa aérea producida depende de la cantidad de recursos (agua, luz, nutrientes) disponibles y de la eficiencia con que el cultivo los captura y utiliza. En el caso del trigo, el rendimiento en grano es función del producto del número de espigas por unidad de área (ha o m²), el número de granos por espiga y el peso de los granos. La definición de estos componentes del rendimiento es secuencial siguiendo el desarrollo del cultivo y la demanda de nitrógeno varía a lo largo de la misma (Miguez, 2004).

Analizando los resultados obtenidos, (figura 6) se puede concluir que todos los tratamientos realizados superaron al testigo de manera significativa, y comparando los tratamientos 2,3,4,5 no hubo diferencia significativa entre ellos. (cuadro 18 Anexos).

Rendimiento en kg/ha de los diferentes tratamientos

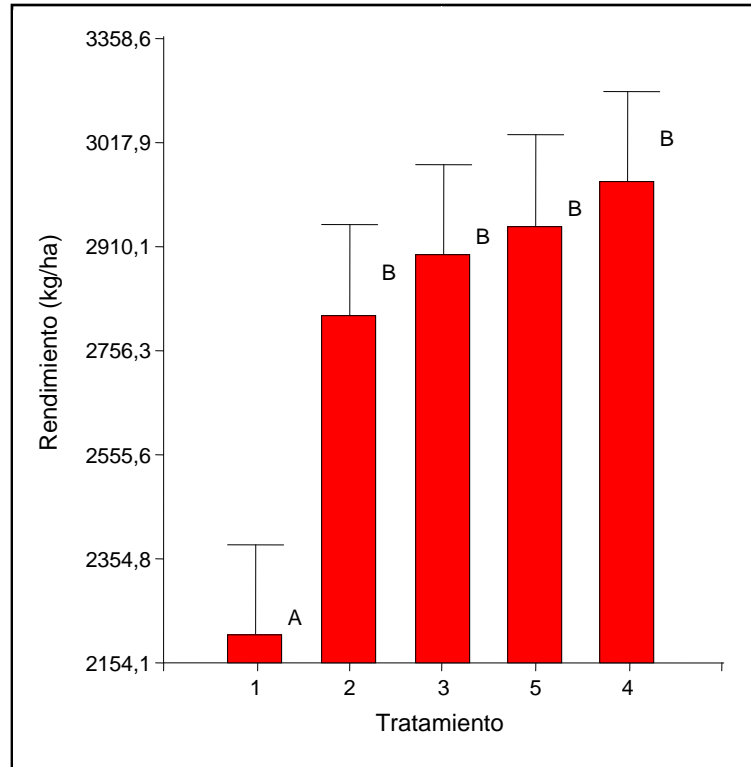


Figura 6: Rendimiento en kg/ha de los diferentes tratamientos

1. Testigo no tratado;

2. *Azospirillum brasilense* (LMA)

3. Fertilización con urea en macollaje;

4. Fertilización química (urea) + *Azospirillum brasilense* (IC)

5. *Azospirillum brasilense* (IC).

*Letras distintas indican diferencia significativa mayor a 5%

CONCLUSIÓN

Con los resultados analizados podemos concluir que en todos los estadios del cultivo existe interacción positiva entre el cultivo y la bacteria, es decir la inoculación con *Azospirillum brasiliense* favoreció el crecimiento y desarrollo del mismo, sobre todo en la implantación, ya que hubo un aumento en la longitud de las raíces, el peso seco de las mismas, logrando un crecimiento vigoroso que influyó sobre la biomasa aérea.

La inoculación con *Azospirillum brasiliense* determinó que el cultivo evidenciara un mejor desarrollo y esto se vio reflejado en un aumento en el número de granos/m², peso de los granos y en el rendimiento, ya que estos parámetros mostraron diferencia significativa con respecto al testigo.

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 mayor exactitud los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- BASTARRACHEA, F., M. ZAMUDIO, and R. RIVAS. 1987. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.* 34:24-29.
- BELLONE C. H.; S. CARRIZO DE BELLONE.; M.A JAIME ; A.M MANILLA; M.A MONZON 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.
- BERINGER, J.E. 1984. The Significance of Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant Production. *Plant Sci.* 2: 269-286.
- BOTTINI R. and M. FULCHIERI (1989) Identifications of gibberellins A₁, A₃, and iso A₃ in cultures of *Azospirillum spp.* *Plant Physiol.* 90: pp. 45-47.
- CABALLERO-MELLADO, J., L. LOPEZ-REYES, and R. BUSTILLOS-CRISALES. 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:283-288
- CANTERO A. Y C. CHOLAKY 1997. Evaluación de tierras. Apunte de la cátedra de Uso y Manejo de Suelos.
- CREUS C. M. 2000. *Cambios morfofisiológicos bajo estrés hídrico en plántulas de trigo y maíz inoculadas con Azospirillum spp.* Departamento de Introducción a las Ciencias Agrarias. EEA Balcarce. INTA. pp.83-86
- CREUS, C., SUELDO, R. AND BARASSI, C. (1996). Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Can. J. Bot.* 76:238-244
- 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.*
- DÍAZ ZORITA M., 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. Mar del Plata, Argentina.
- DÍAZ ZORITA, M; BALIÑA, RM; FERNANDEZ-CANIGIA, MV; PERTICARI, A. 2006. *Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con Azospirillum brasilense.* CONICET-FAUBA, INTA Cautelar. Argentina
- DÍAZ-ZORITA M. & MV FERNANDEZ-CANIGIA. 2008. Field performance of liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 1-9.

- 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
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar> consultado 10/11/2010
- DOBBELACE, S. A. CROONENBERGHS, A. THYS, D. PTACEK, J. VANDERYDEN, P. DUTTO, C. LABANDERA-GONZALES, J. CABALLERO-MELLADO, J.F. AGUIRRE, Y. OKON, (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Ausut. J. Plant Physiol.* 28: 871-879 NN
- DÖBEREINER J. 1983. B In *Azospirillum II Genetics Ed. Klimgmüller* pp. 9-23.
- DÖBEREINER, J. AND PEDROZA, F. (1987). En Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous. Crop plants Springer Verlag, Berlin
- DÖBEREINER J., 1992. *The genera Azospirillum and Herbaspirillum*, p. 2236-2253.
- ESPÓSITO G., J. GESUMARIA y C. CASTILLO 2001. *Fertilización del cultivo de trigo*. Material didáctico cátedra Producción Vegetal pp.1-7. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- FAO (Food and agriculture organization of the United Nations), 2006 Todas las estadísticas de producción mundial se basan en los datos oficiales de la FAO. [http://:Faostat.fao.org/site/567](http://Faostat.fao.org/site/567) Consultado 28/12/08.
- FERRARIS G. 2009. Microorganismos con efecto promotor de crecimiento (PGPM) en cultivos extensivos. Impacto sobre los rendimientos, la eficiencia de uso de los nutrientes y otros caracteres de interés agronómico. Resúmenes. pp8-9. En: *II Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos*. “Herramientas Microbiológicas para una Agricultura Sustentable” UNICEN, Azul (BA), 9 y 10 de Septiembre
- FERRERA-CERRATO, R. (1995). Efecto de la Rizósfera. Pp. 36-52. En **Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable** Ferrera-Cerrato R., y J. Pérez Moreno (eds) Colegio de Post Graduados Montecillo Estado de México.
- GARCÍA F. O. 1994. Dinámica del nitrógeno en ecosistemas agrícolas. *Curso de Actualización: Dinámica de nutrientes en suelos pampéanos*. Unidad integrada INTA, Balcarce, Argentina. N° 9 pp.1-3
- HARTMANN, A., H. FU, and R. H. BURRIS. 1988. Influence of amino acids on Nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ Microbiol.* 54:87-93.
- JAIN, D. K., and D. G. PATRIQUIN. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1208-1213.

- KAPULNIK, Y., Y. OKON, and Y. HENIS. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31:881-887
- KIRCHHOF, G., and A. HARTMANN. 1992. Development of gene-probes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. *Symbiosis* 13:27-35.
- LEVANONY, H., Y. BASHAN and Z. E. KAHANA. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:358-364.
- LUCANGELLI C. Y R. BOTTINI 1996. Actas de la *XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. Pág. 466-467.
- MARTIN-DIDONET, C. C. G., L. S. CHUBATSU, E. M. SOUZA, M. KLEINA, F. G.M. REGO, L. U. RIGO, M. G. YATES, and F. O. PEDROSA. 2000. Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J. Bacteriol.* 182:4113-4116.
- MIGUEZ, F Trabajo presentado en la *Jornada de Trigo Revista Agromercado*. Mayo 2004, consultado 28/12/08
- MELGAR, R (2005) <http://www.aaprotrigo.org> consultado: 28/12/08
- MICHIELS, K. W., C. L. CROES, and J. VANDERLEYDEN. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 137:2241-2246.
- 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.
- MONTANER J. Bayer Crop Science 2005 importancia del trigo en Argentina en www.bayercropscience.com.ar consultado 28/12/2008
- NEWMAN E. (1986) A. method of estimating the total length of root a sample. *The Journal of Applied Ecology, vol 3, No. 1*. pp.139-145
- OKÓN, Y.; 1998 Plant growth proting 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 2001. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en un cultivo de trigo a campo. Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. *XVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. (AACCS)* Puerto Madryn, Chubut, Argentina. Publicado en CD.

- 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 del suelo**. Libro resúmenes pág. 37.
- OLMEDO, C.2003 Aspectos Biotecnológicos de las interacciones microorganismos-planta. **En:** Albanesi, A. (comp) *Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Argentina*. Ediciones UNSE, Santiago del Estero.
- PAZOS M., HERNÁNDEZ D., y ACOSTA M. 2004. Estudio del efecto que ejerce la aplicación del biopreparado Azofert para gramíneas sobre las poblaciones de bacterias del género *Azospirillum*. <http://www.bioplantas.cu/bioinformatica/Proceedings/INCA%20XIII/ponencias/simposios/simp01/resumen4c/BF-P.4.pdf>. Consultado 10/12/07.
- PEROTTI, E.B.R y A. PIDELLO 1999. Inoculación con *Azospirillum* spp. – Ensayo a campo. Cátedra de Microbiología Agrícola. – Facultad de Ciencias Agrarias- UNNE. **II Reunión Científico Técnica de Biología del Suelo, Fijación Biológica del Nitrógeno**. pp.181-184.
- PIAO C., W. TANG y Y. CHIEN 1992. Study on the biological activity of Yield-Increasing Bacteria. **Chin. J. Microbiol.** 4: pp. 55-62.
- RAWSON, H.M. & SUBEDI, K.D., eds. 1996. *Sterility in wheat in subtropical Asia: extent, causes and solutions*. **ACIAR Proceedings** No 73 (Workshop held at Lumle Agricultural Research Centre, Nepal, 18-21 September 1995.) **Canberra, ACIAR**. 155 pp.
- RODRIGUEZ CÁCERES E. A., C. DI CIOCCO y J.C. PACHECO BASURCO 1996. Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la Provincia de La Pampa, Argentina. **Ciencia del Suelo**.14: pp. 110-112.
- TARRAND, J. J., N. R. KRIEG, and J. DÖBEREINER. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** 24:967-980.
- TILAK, K. V. B. R., K. SCHNEIDER, and H. G. SCHLEGEL. 1986. Autotrophic growth of nitrogen-fixing *Azospirillum* species and partial characterization of hydrogenase from strain CC. **Curr. Microbiol.** 13:291-297.
- UMALI-GARCIA, M., D. H. HUBBELL, M. H. GASKINS, and F. B. DAZZO. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Appl. Environ. Microbiol.** 39:219- 226.
- VANDE BROEK, A., J. MICHIELS, A. VAN GOOL, and J. VANDERLEYDEN. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 6:592-600.

WOOD, A. G., E. M. MENEZES, C. DYKSTRA, and D. E. DUGGAN. 1982. *Methods to demonstrate the megaplasmids (or minichromosomes) in Azospirillum*, p. 18-34

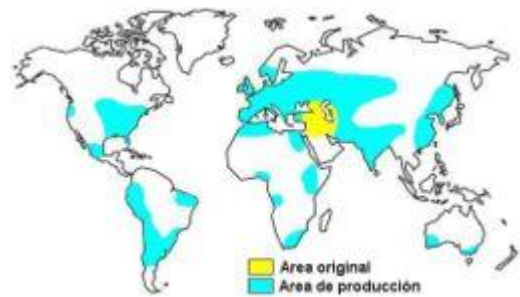
YOUNG, J. P. W. 1992. *Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms*, p. 43-86. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, N. Y.

Anexo I y II

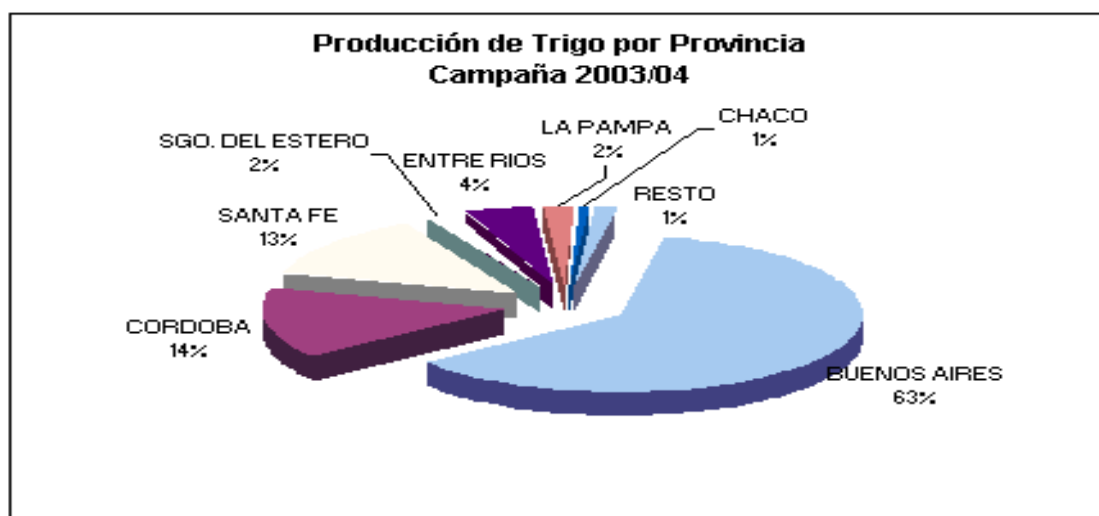
Producción Mundial de Trigo (millones de toneladas)									
1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
585,4	613,4	593,5	587,7	586,1	590,0	574,4	561,1	629,9	628,1

País	Producción (millones de toneladas)
 <u>China</u>	96,3
 <u>India</u>	72,0
 <u>Estados Unidos</u>	57,1
 <u>Rusia</u>	47,7
 <u>Francia</u>	36,9
 <u>Canadá</u>	25,5
 <u>Australia</u>	24,1
 <u>Alemania</u>	23,6
 <u>Pakistán</u>	21,6
 <u>Turquía</u>	21,0
 <u>Argentina</u>	13,5

Los principales países productores de trigo en el 2005 fueron:



Anexo III:



Anexo IV:

Tablas y Ecuaciones

A₁- Medición de la longitud total de raíces (V5)

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

donde

R : longitud total de la raíz.

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

A : área del rectángulo (26 cm x 20 cm).

H : cantidad de cuadrículas (130) por longitud de la cuadrícula (2).

π : 3,14.

Numero de intersecciones:

Realizado el 25/9

Parcela 1	Parcela 2'	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5
1.1 : 20-27-24	2.1 : 25-27-29	3.1 : 24-27-29	4.1 : 29-27-26	5.1 : 29-31-28
1.2 : 24-21-19	2.2 : 32-28-30	3.2 : 22-25-20	4.2 : 28-29-27	5.2 : 32-27-29
1.3 : 19-20-23	2.3 : 28-31-26	3.3 : 23-28-24	4.3 : 30-26-28	5.3 : 28-30-25
Parcela 3	Parcela 1	Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2
3.1 : 26-23-21	1.1 : 18-24-20	4.1 : 29-27-25	5.1 : 32-29-27	2.1 : 28-32-29
3.2 : 20-23-25	1.2 : 20-18-21	4.2 : 22-24-22	5.2 : 30-28-29	2.2 : 26-28-30
3.3 : 21-26-23	1.3 : 23-26-24	4.3 : 28-23-25	5.3 : 29-27-32	2.3 : 29-28-32
Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2	Parcela 1	Parcela 3
4.1 : 25-27-29	5.1 : 25-28-24	2.1 : 22-21-26	1.1 : 22-26-21	3.1 : 24-28-23
4.2 : 27-23-29	5.2 : 29-32-28	2.2 : 25-28-26	1.2 : 24-27-22	3.2 : 29-26-27
4.3 : 24-27-28	5.3 : 32-29-30	2.3 : 26-24-20	1.3 : 27-24-28	3.3 : 22-27-28
Parcela 1'	Parcela 2	Parcela 5	Parcela 3	Parcela 4
1.1 : 24-22-19	2.1 : 28-30-33	5.1 : 28-27-25	3.1 : 22-25-24	4.1 : 28-31-27
1.2 : 21-24-23	2.2 : 26-29-24	5.2 : 29-22-25	3.2 : 27-22-26	4.2 : 27-24-29
1.3 : 26-23-25	2.3 : 29-26-32	5.3 : 32-35-28	3.3 : 28-25-23	4.3 : 26-30-28
Parcela 5	Parcela 4	Parcela 3'	Parcela 2	Parcela 1
5.1 : 25-28-30	4.1 : 26-30-24	3.1 : 20-23-21	2.1 : 27-29-26	1.1 : 23-26-24
5.1 : 25-29-27	4.2 : 22-27-29	3.2 : 28-26-24	2.2 : 30-28-29	1.2 : 25-23-27
5.3 : 26-32-29	4.3 : 25-28-26	3.3 : 22-21-26	2.3 : 27-31-28	1.3 : 27-24-26

A₂- Determinación de peso seco aéreo y de raíz (gr.)

Realizado el 28/9

R: peso seco de la raíz (gr).

B: peso seco de la biomasa (gr).

Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5
1.1 : R: 1.2 B: 1.8	2.1 : R:1.1 B: 2.3	3.1 : R: 0.6 B: 1.5	4.1 : R: 0.9 B: 2.2	5.1 : R: 1.7 B: 3.3
1.2 : R: 0.9 B: 1.2	2.2 : R: 0.6 B: 1.9	3.2 : R: 0.8 B: 1.7	4.2 : R: 0.5 B: 1.8	5.2 : R: 2.0 B: 2.9
1.3 : R: 1.1 B: 1.4	2.3 : R: 0.9 B: 2.5	3.3 : R: 0.9 B: 1.1	4.3 : R: 0.8 B: 2.3	5.3 : R: 1.3 B: 2.7
Parcela 3	Parcela 1	Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2
3.1 : R: 0.9 B: 1.5	1.1 : R: 0.7 B: 1.3	4.1 : R: 1.3B: 2.2	5.1 : R: 1.2 B: 2.6	2.1 : R: 0.9 B: 2.8
3.2 : R: 1.2 B: 1.7	1.2 : R: 0.8 B: 1.9	4.2 : R: 1.0 B: 2.5	5.2 : R: 1.2 B: 2.4	2.2 : R: 1.0 B: 3.1
3.3 : R: 1.1 B: 1.4	1.3 : R: 1.0 B: 1.9	4.3 : R: 0.9B: 2.1	5.3 : R: 1.6 B: 2.9	2.3 : R: 1.2 B: 3.3
Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2	Parcela 1	Parcela 3
4.1 : R: 1.3 B: 1.7	5.1 : R: 1.1 B: 2.5	2.1 : R: 0.9 B: 2.5	1.1 : R: 0.6 B: 1.9	3.1 : R: 1.1 B: 1.6
4.2 : R: 0.9 B: 1.5	5.2 : R: 0.9 B: 1.9	2.2 : R: 0.8 B: 2.3	1.2 : R: 0.8 B: 2.0	3.2 : R: 0.9 B: 2.0
4.3 : R: 1.4 B: 2.5	5.3 : R: 1.2 B: 2.9	2.3 : R: 0.9 B: 2.6	1.3 : R: 0.9 B: 1.8	3.3 : R: 0.7 B: 1.8
Parcela 1	Parcela 2	Parcela 5	Parcela 3	Parcela 4
1.1 : R: 0.7 B: 1.6	2.1 : R: 0.9 B: 2.2	5.1 : R: 1.1 B: 2.3	3.1 : R: 0.8 B: 1.5	4.1 : R: 1.0 B: 2.6
1.3 : R: 0.9 B: 1.8	2.2 : R: 1.5 B: 2.7	5.2 : R: 1.6 B: 2.9	3.2 : R: 1.1 B: 2.1	4.2 : R: 1.3 B: 2.8
1.3 : R: 1.0 B: 1.7	2.3 : R: 0.9 B: 2.4	5.3 : R: 2.5 B: 3.0	3.3 : R: 1.2 B: 1.9	4.3 : R: 1.2 B: 2.0
Parcela 5	Parcela 4	Parcela 3	Parcela 2	Parcela 1
5.1 : R: 0.8 B: 2.4	4.1 : R: 0.9 B: 2.2	3.1 : R: 0.9 B: 1.0	2.1 : R: 0.8 B: 2.7	1.1 : R: 0.6 B: 1.8
5.2 : R: 1.5 B: 2.7	4.2 : R: 1.1 B: 2.0	3.2 : R: 1.0 B: 1.2	2.2 : R: 0.8 B: 2.5	1.2 : R: 0.9 B: 1.9
5.3 : R: 1.3 B: 2.5	4.3 : R: 1.4 B: 2.6	3.3 : R: 0.8 B: 1.0	2.3 : R: 1.3 B: 3.1	1.3 : R: 0.7 B: 1.4

A₃- Componentes del rendimiento:

	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Parcela 4	Parcela 5
Nº espiguillas	11	11	15	14	13
Nº espigas	102	125	162	133	135
Nº granos/espiga	23	24	28	28	29
Peso (gr) 0,25m ²	50,8	77,8	97,1	72,7	90,1
	Parcela 3	Parcela 1	Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2
Nº espiguillas	11	12	10	12	11
Nº espigas	98	126	109	129	136
Nº granos/espiga	23	25	24	27	21
Peso (gr) 0,25m ²	67,5	57,3	62,9	65,7	71,5
	Parcela 4	Parcela 5	Parcela 2	Parcela 1	Parcela 3
Nº espiguillas	12	11	10	11	14
Nº espigas	156	138	114	129	127
Nº granos/espiga	25	25	18	25	25
Peso (gr) 0,25m ²	89,1	63,3	63,3	59,2	79,2
	Parcela1	Parcela 2	Parcela 5	Parcela 3	Parcela 4
Nº espiguillas	10	12	14	11	13
Nº espigas	92	144	132	115	152
Nº granos/espiga	21	25	31	26	31
Peso (gr) 0,25m ²	45,2	77,1	69,5	59,3	77,3
	Parcela 5	Parcela 4	Parcela 3	Parcela 2	Parcela 1
Nº espiguillas	12	11	12	15	13
Nº espigas	136	145	146	143	131
Nº granos/espiga	26	22	26	36	27
Peso (gr) 0,25m ²	79,2	72,7	88,1	69,5	63,6

B- Determinaciones posteriores a la cosecha

B₁- Evaluación del rendimiento del cultivo de trigo

Parcela 1: (Testigo no tratado)

1,25 m² ————— 276,1 gr

10.000 m² ————— X: 2208800 gr = **2208,8 kg/ha**

Parcela 2: (*Azospirillum brasilense*)

1,25 m² ————— 359,2 gr

10.000 m² ————— X: 2873600 gr = **2873,6 kg/ha**

Parcela 3: (Fertilizado con urea en macollaje)

1,25 m² ————— 361,2 gr

10.000 m² ————— X: 2889600 gr = **2889,6 kg/ha**

Parcela 4: (Fertilización química + *Azospirillum brasilense*)

1,25 m² ————— 374,7 gr

10.000 m² ————— X: 2997600 gr = **2997,6 kg/ha**

Parcela 5: (*Azospirillum brasilense* (inoculante comercial))

1,25 m² ————— 367,8 gr

10.000 m² ————— X: 2942400 gr = **2942,4 kg/ha**

B₂- Peso de los 1000 granos de trigo

Parcela 1: Testigo no tratado: 19,61 gr

Parcela 2: *Azospirillum brasilense* (LMA): 23,33 gr

Parcela 3: Fertilizado con urea en macollaje: 23,86 gr

Parcela 4: Fertilización química + *Azospirillum brasilense* (IC): 21,11 gr

Parcela 5: *Azospirillum brasilense* (IC): 19,90 gr

Anexo V:

Análisis Estadístico:

En el estudio se analizó la acción de los distintos niveles del factor tratamiento sobre las variables longitud total de la raíz, peso seco aéreo, peso seco de la raíz, peso de granos en 0,25 m² y rendimiento. Además, se analizaron las componentes de esta última variable. La influencia del factor tratamiento fue analizada siguiendo un diseño completamente aleatorizado y las componentes del rendimiento se abordaron utilizando un análisis de coeficiente de sendero. Mediante estos análisis fue posible observar que el factor tratamiento influyó sobre todas las variables estudiadas. Además, se observó que el rendimiento está mayormente determinado por su relación con el carácter peso seco de granos en 0,25 m².

Estadística descriptiva

Cuadro 1. Estadística descriptiva para las variables longitud total de la raíz, peso seco aéreo, peso seco de la raíz, número de espiguillas, número de espigas, número de granos por espiga, peso de granos en 0,25 m², peso de 1000 granos y rendimiento.

Variable	Media	CV	Mín	Máx
LTRaíz (cm)	81,93	10,35	61,75	99,43
PSAéreo (gr)	1,04	31,38	0,50	2,50
PSRaíz (gr)	2,14	26,52	1,00	3,30
N° espiguillas	12,04	12,34	10,00	15,00
N° espigas	130,20	13,51	92,00	162,00
N° granos/espiga	25,64	14,41	18,00	36,00
Peso 0,25m ² (gr)	70,76	17,66	45,20	97,10
Peso de 1000 granos (gr)	21,63	18,61	13,50	30,85
Rendimiento (kg/ha)	2830,40	17,66	1808,00	3884,00

Ref.: LTRaíz: longitud total de la raíz; PSAéreo: peso seco aéreo; PSRaíz: peso seco de la raíz.

Estadística analítica

Un análisis de la varianza (ANOVA) se realizó para un diseño completamente aleatorizado para las variables longitud total de la raíz, peso seco aéreo, peso seco de la raíz, peso de granos en 0,25 m² y rendimiento. La ecuación del modelo estadístico general es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} + \gamma_{ijk}$$

donde y_{ijk} representa la respuesta observada en la unidad de muestro k dentro de la unidad experimental j a la que se aplicó el tratamiento i ($i=1\dots t$, $t=5$; $j=1\dots r$, $r=25$; $k=1\dots m$, $m=3$), μ representa la media general, α_i representa el efecto del nivel i del factor cuyo efecto se quiere conocer, ε_{ij} representa el error aleatorio asociado a las diferencias entre unidades experimentales (parcelas) con el mismo tratamiento, γ_{ijk} representa el error aleatorio asociado

a las diferencias entre unidades de muestreo pertenecientes a una misma unidad experimental.

Las hipótesis a probar son:

$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_i = 0$ (no hay efecto de tratamiento);

$H_a: \text{algún } \alpha_i \neq 0; \forall i$ (hay efecto de tratamiento).

Los datos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (2011).

Análisis de la varianza para la variable longitud total de la raíz.

El resultado del ANOVA permite observar que el p-valor (valor de probabilidad) del factor tratamiento es significativo ($p < 0,0001$, cuadro 2), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($0,05$). De esta manera, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \alpha_i = 0$) concluyendo que el factor tratamiento influye en la longitud total de la raíz.

Mediante un test de comparación de medias (DGC) para el factor en estudio, se comparó la longitud de la raíz obtenida de la aplicación de los distintos niveles del factor tratamiento. Es posible ver la conformación de dos grupos. El primer grupo, conformado por los tratamientos 1 y 3, y el segundo grupo, formado por los tratamientos 2, 4 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro de grupo. Por el contrario, al realizar la comparación entre grupos se observa que existen diferencias significativas (cuadro 3).

Cuadro 2: Análisis de la varianza para la variable longitud total de la raíz (LTRaíz).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LTRaíz	75	0,76	0,65	6,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	4059,92	24	169,16	6,69	<0,0001	
Tratamiento	2956,85	4	739,21	13,40	<0,0001	(Tratamiento>Rep)
Tratamiento>Rep	1103,07	20	55,15	2,18	0,0132	
Error	1263,56	50	25,27			
Total	5323,48	74				

Ref.: Rep.: Repetición; R²: Coeficiente de determinación; CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 3: Test de comparación de medias de la variable longitud total de la raíz para los distintos niveles del factor tratamiento.

Test: DGC Alfa=0,05 PCALT=5,6375

Error: 55,1534 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	
1	72,85	15	A
3	76,55	15	A
4	83,80	15	B
2	87,08	15	B
5	89,39	15	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ref.: Tratamientos: 1. Testigo no tratado; 2. Azospirillum brasilense; 3. Fertilización con urea en macollaje; 4. Fertilización química + Azospirillum brasilense y 5. Azospirillum brasilense (inoculante comercial).

Los supuestos tradicionales del ANOVA implican errores independientes, normalmente distribuidos y con varianzas homogéneas para todas las observaciones. A partir del valor de los residuos se puede verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas.

Normalidad

Para determinar si los datos cumplen con este supuesto, InfoStat permite realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. En este análisis, las hipótesis que se someten a prueba son:

H_0 : los residuos de la variable longitud total de la raíz tienen distribución normal.

H_1 : los residuos de la variable longitud total de la raíz no tienen distribución normal.

Test de Shapiro-Wilks para los residuos de la variable longitud total de la raíz.

Dado el valor p del test ($p=0,7137$), es posible concluir que no existen evidencias para rechazar el supuesto de distribución normal (cuadro 4).

Cuadro 4: Prueba de normalidad.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)	
RDUO LTRaíz	75	0,00	4,13	0,98	0,7137	

Homogeneidad de varianzas

La prueba de Levene permite verificar el cumplimiento de este supuesto. Esta prueba consiste en realizar un análisis de la varianza usando como variable dependiente el valor absoluto de los residuos. Este análisis se debe realizar con un modelo a una vía de clasificación.

Las hipótesis que se someten a prueba son:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_a^2$$

H_1 : al menos dos varianzas son distintas.

donde σ_i^2 es la varianza del tratamiento i , $i = 1, \dots, a$.

Prueba de Levene para los residuos absolutos de la variable longitud total de la raíz.

El p-valor del factor tratamiento de este ANOVA ($p=0,3187$) es mayor al valor de significación nominal de la prueba ($0,05$), por lo tanto no se rechaza la hipótesis de varianzas homogéneas (cuadro 5).

Cuadro 5: Test de homogeneidad de varianzas.

Test de Levene

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS LTRaíz	75	0,06	0,01	80,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,06	4	8,01	1,20	0,3187
Tratamiento	32,06	4	8,01	1,20	0,3187
Error	467,64	70	6,68		
Total	499,70	74			

Análisis de la varianza para la variable peso seco aéreo.

Dado el resultado del análisis de la varianza es posible ver que el valor p del factor tratamiento es significativo ($p<0,0011$, cuadro 6), es decir, menor al nivel de significación del test ($0,05$). Por esta razón, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \alpha_i = 0$) y se concluye que el factor tratamiento influye en el peso seco aéreo.

El test de comparación de medias (DGC) para el factor en estudio permitió comparar el peso seco que se obtuvo de la aplicación de los distintos niveles del factor tratamiento. Al igual que en la variable anterior, se observan dos grupos. El primero, formado por los tratamientos 1, 2, 3 y 4, y el segundo, formado por el tratamiento 5, no presentaron diferencias significativas dentro de grupo. Por el contrario, al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas (cuadro 7).

Cuadro 6: Análisis de la varianza para la variable peso seco aéreo (PSAéreo).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PSAéreo	75	0,59	0,39	24,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	4,67	24	0,19	2,99	0,0005	
Tratamiento	2,72	4	0,68	7,00	0,0011	(Tratamiento>Rep)
Tratamiento>Rep	1,95	20	0,10	1,50	0,1251	
Error	3,25	50	0,07			
Total	7,92	74				

Ref.: Rep.: Repetición; R²: Coeficiente de determinación; CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 7: Test de comparación de medias de la variable peso seco aéreo para los distintos niveles del factor tratamiento.

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2368

Error: 0,0973 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	
1	0,85	15	A
3	0,93	15	A
2	0,97	15	A
4	1,06	15	A
5	1,40	15	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ref.: Tratamientos: 1.Testigo no tratado; 2.Azospirillum brasilense; 3.Fertilización con urea en macollaje; 4.Fertilización química + Azospirillum brasilense y 5.Azospirillum brasilense (inoculante comercial).

Test de Shapiro-Wilks para los residuos de la variable peso seco aéreo.

Dado el valor p del test ($p=0,8090$), es posible concluir que no existen evidencias para rechazar el supuesto de distribución normal (cuadro 8).

Cuadro 8: Prueba de normalidad.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO PSAéreo	75	0,00	0,21	0,98	0,8090

Prueba de Levene para los residuos absolutos de la variable peso seco aéreo.

El p-valor del factor tratamiento del ANOVA ($p=0,0085$) es menor al nivel de significación nominal ($0,05$), por lo tanto se rechaza la hipótesis de varianzas homogéneas (cuadro 9).

Cuadro 9: Test de homogeneidad de varianzas.

Test de Levene

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS PSAéreo	75	0,17	0,13	75,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,22	4	0,06	3,71	0,0085
Tratamiento	0,22	4	0,06	3,71	0,0085
Error	1,05	70	0,01		
Total	1,27	74			

Análisis de la varianza para la variable peso seco de la raíz.

El resultado del ANOVA permite observar que el p-valor del factor tratamiento es significativo ($p < 0,0001$, cuadro 10), menor al nivel de significación ($0,05$). De esta forma, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \alpha_i = 0$) y se concluye que el factor tratamiento influye en el peso seco de la raíz. El test de comparación de medias (DGC) para el factor tratamiento permitió comparar el peso seco de la raíz obtenido de la aplicación de los distintos niveles de

dicho factor. Los resultados del test permitieron ver la conformación de tres grupos. El primero, formado por los tratamientos 1, y 3, el segundo, formado por el tratamiento 4, y el tercero, formados por los tratamientos 2 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro de grupo. Caso contrario, al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas (cuadro 11).

Cuadro 10: Análisis de la varianza para la variable peso seco de la raíz (PSRaíz).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PSRaíz	75	0,82	0,73	13,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	19,47	24	0,81	9,48	<0,0001	
Tratamiento	15,70	4	3,93	20,84	<0,0001	(Tratamiento>Rep)
Tratamiento>Rep	3,77	20	0,19	2,20	0,0124	
Error	4,28	50	0,09			
Total	23,75	74				

Ref.: Rep.: Repetición; R²: Coeficiente de determinación; CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 11: Test de comparación de medias de la variable peso seco de la raíz para los distintos niveles del factor tratamiento.

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,3295

Error: 0,1884 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	
3	1,53	15	A
1	1,69	15	A
4	2,20	15	B
2	2,59	15	C
5	2,66	15	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ref.: Tratamientos: 1.Testigo no tratado; 2.Azospirillum brasilense; 3.Fertilización con urea en macollaje; 4.Fertilización química + Azospirillum brasilense y 5.Azospirillum brasilense (inoculante comercial).

Test de Shapiro-Wilks para los residuos de la variable peso seco de la raíz.

El p-valor del test ($p=0,4491$), es menor al nivel de significación de la prueba ($0,05$) se concluye, por lo tanto, que no existen evidencias para rechazar el supuesto de distribución normal (cuadro 12).

Cuadro 12: Prueba de normalidad.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO PSRaíz	75	0,00	0,24	0,97	0,4491

Test de Levene para los residuos absolutos de la variable peso seco de la raíz.

El valor p del factor tratamiento ($p=0,1610$) es mayor al valor de significación nominal del test ($0,05$), por lo tanto no se rechaza la hipótesis de varianzas homogéneas (cuadro 13).

Cuadro 13: Test de homogeneidad de varianzas.

Test de Levene

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS PSRaíz	75	0,09	0,04	66,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,12	4	0,03	1,69	0,1610
Tratamiento	0,12	4	0,03	1,69	0,1610
Error	1,22	70	0,02		
Total	1,33	74			

Análisis de la varianza para la variable peso seco de granos en 0,25 m².

El resultado del ANOVA permite ver que el p-valor del factor tratamiento es significativo ($p<0,0154$, cuadro 14), es decir, menor al nivel de significación de la prueba ($0,05$). De esta manera, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \alpha_i = 0$) concluyendo que el factor tratamiento influye en el peso seco de granos en 0,25 m².

El test de comparación de medias (DGC) para el factor en estudio permitió comparar el peso seco de granos obtenido a partir de la aplicación de los distintos niveles del factor tratamiento. Los resultados del análisis permiten observar la formación de dos grupos. El primero, formado por el tratamiento 1, y el segundo, formado por los tratamientos 2, 3, 4 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro de grupo. Sin embargo, al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas (cuadro 15).

Cuadro 14: Análisis de la varianza para la variable peso seco de granos en 0,25 m² (Peso0,25m²).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso0,25m2	25	0,60	0,39	13,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2231,01	8	278,88	2,94	0,0317
Tratamiento	1619,60	4	404,90	4,27	0,0154
Rep	611,41	4	152,85	1,61	0,2200
Error	1518,53	16	94,91		
Total	3749,54	24			

Ref.: Rep.: Repetición; R²: Coeficiente de determinación; CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 15: Test de comparación de medias de la variable peso seco de granos en 0,25 m² para los distintos niveles del factor tratamiento.

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=13,6803

Error: 94,9080 gl: 16

Tratamiento	Medias	n	
1	55,22	5	A
2	71,84	5	B
5	73,56	5	B
4	74,94	5	B
3	78,24	5	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ref.: Tratamientos: 1.Testigo no tratado; 2.Azospirillum brasilense; 3.Fertilización con urea en macollaje; 4.Fertilización química + Azospirillum brasilense y 5.Azospirillum brasilense (inoculante comercial).

Test de Shapiro-Wilks para los residuos de la variable peso seco de granos en 0,25 m².

El valor p del test ($p=0,3273$) es menor al nivel de significación ($0,05$). De esta forma se concluye que no existen evidencias para rechazar el supuesto de distribución normal (cuadro 16).

Cuadro 16: Prueba de normalidad.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO Peso0,25m2	25	0,00	7,95	0,94	0,3273

Test de Levene para los residuos absolutos de la variable peso seco de granos en 0,25 m².

El p-valor del factor tratamiento ($p=0,6862$) es mayor al valor de significación nominal del test ($0,05$), por lo tanto no se rechaza la hipótesis de varianzas homogéneas (cuadro 17).

Cuadro 17: Test de homogeneidad de varianzas.

Test de Levene

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Peso0,25m2	25	0,10	0,00	59,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	37,65	4	9,41	0,57	0,6862
Tratamiento	37,65	4	9,41	0,57	0,6862
Error	329,23	20	16,46		
Total	366,88	24			

Análisis de la varianza para la variable rendimiento.

El resultado del análisis permite observar que el valor p del factor tratamiento es significativo ($p < 0,0154$, cuadro 18), menor al nivel de significación nominal del test ($0,05$). Por esta razón, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: \alpha_i = 0$) y se concluye que el factor tratamiento influye en el rendimiento.

El test de comparación de medias (DGC) para el factor tratamiento permitió comparar el rendimiento obtenido a partir de la aplicación de los distintos niveles del factor en estudio.

Se observa, a partir del resultado del análisis, la conformación de dos grupos. El primero, formado por el tratamiento 1, y el segundo, formado por los tratamientos 2, 3, 4 y 5, no presentaron diferencias significativas dentro de grupo. Por el contrario, al realizar la comparación entre grupos se observaron diferencias significativas (cuadro 19).

Cuadro 18: Análisis de la varianza para la variable rendimiento.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento	25	0,60	0,39	13,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3569619,20	8	446202,40	2,94	0,0317
Tratamiento	2591366,40	4	647841,60	4,27	0,0154
Rep	978252,80	4	244563,20	1,61	0,2200
Error	2429644,80	16	151852,80		
Total	5999264,00	24			

Ref.: Rep.: Repetición; R²: Coeficiente de determinación; CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 19: Test de comparación de medias de la variable rendimiento para los distintos niveles del factor tratamiento.

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=547,2125

Error: 151852,8000 gl: 16

Tratamiento	Medias	n	
1	2208,80	5	A
2	2873,60	5	B
5	2942,40	5	B
4	2997,60	5	B
3	2889,60	5	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ref.: Tratamientos: 1.Testigo no tratado; 2.Azospirillum brasilense; 3.Fertilización con urea en macollaje; 4.Fertilización química + Azospirillum brasilense y 5.Azospirillum brasilense (inoculante comercial).

Test de Shapiro-Wilks para los residuos de la variable rendimiento.

El p-valor del test ($p=0,3273$) es menor al nivel de significación de la prueba ($0,05$), por lo tanto se concluye que no existen evidencias para rechazar el supuesto de distribución normal (cuadro 20).

Cuadro 20: Prueba de normalidad.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO Rendimiento	25	0,00	318,17	0,94	0,3273

Test de Levene para los residuos absolutos de la variable rendimiento.

El p-valor del factor tratamiento ($p=0,6862$) es mayor al valor de significación nominal del test ($0,05$). De esta forma, no se rechaza la hipótesis de varianzas homogéneas (cuadro 21).

Cuadro 21: Test de homogeneidad de varianzas.

Test de Levene

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Rendimiento	25	0,10	0,00	59,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	60233,32	4	15058,33	0,57	0,6862
Tratamiento	60233,32	4	15058,33	0,57	0,6862
Error	526768,13	20	26338,41		
Total	587001,45	24			

Análisis de coeficiente de sendero (path analysis) para los componentes del rendimiento.

Se observa, a partir de los resultados del análisis, que las correlaciones entre número de espigas, peso seco de granos en 0,25 m², peso de 1000 granos y la variable dependiente rendimiento son significativas (r=0,43, p=0,0314; r=0,63, p=0,0008 y r=0,46, p=0,0205, respectivamente) y está en su mayor parte determinada (0,66) por la correlación entre peso seco de granos en 0,25 m² y rendimiento.

Cuadro 22: Análisis de coeficiente de sendero para los componentes del rendimiento.

Coefficientes de Sendero (Path Analysis)

Variable dependiente: Rendimiento; n=25

Efecto	Vía	Coefficientes	p-valor
N°espiguillas	Directa	-0,53	
N°espiguillas	N°espigas	-0,01	
N°espiguillas	N°granos/espiga	0,37	
N°espiguillas	Peso0,25m2	0,35	
N°espiguillas	Peso1000granos	0,04	
r total		0,22	0,3016
N°espigas	Directa	-0,02	
N°espigas	N°espiguillas	-0,31	
N°espigas	N°granos/espiga	0,22	
N°espigas	Peso0,25m2	0,51	
N°espigas	Peso1000granos	0,04	
r total		0,43	0,0314
N°granos/espiga	Directa	0,46	
N°granos/espiga	N°espiguillas	-0,43	
N°granos/espiga	N°espigas	-0,01	
N°granos/espiga	Peso0,25m2	0,22	
N°granos/espiga	Peso1000granos	-0,02	
r total		0,22	0,2989
Peso0,25m2	Directa	0,66	
Peso0,25m2	N°espiguillas	-0,28	
Peso0,25m2	N°espigas	-0,02	
Peso0,25m2	N°granos/espiga	0,15	
Peso0,25m2	Peso1000granos	0,12	
r total		0,63	0,0008
Peso1000granos	Directa	0,29	
Peso1000granos	N°espiguillas	-0,06	
Peso1000granos	N°espigas	-3,2E-03	
Peso1000granos	N°granos/espiga	-0,03	
Peso1000granos	Peso0,25m2	0,27	
r total		0,46	0,0205

