



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Ciencias Naturales

Trabajo final para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas

**“EFECTO DE INOCULACIONES BACTERIANAS EN EL APORTE DE
NUTRIENTES Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN CULTIVOS
DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA”**

María Victoria Larrosa

Directora:

Dra. Tania Taurian

Co-directora:

Dra. María Soledad Anzuay

Río Cuarto – Córdoba

18 de diciembre 2019

**“EFECTO DE INOCULACIONES BACTERIANAS EN EL APORTE DE
NUTRIENTES Y PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN CULTIVOS
DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA”**

María Victoria Larrosa

Directora: Dra. Tania Taurian

Co-directora: Dra. María Soledad Anzuay

El presente trabajo final de la carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas, fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Miembros del tribunal evaluador:

Dr. Federico Morla

Dra. Claudia Travaglia

Dra. María Soledad Anzuay

Río Cuarto, 18 de Diciembre de 2019

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por formarme profesionalmente.

A la Dra. Tania Taurian por acompañarme en todo este proceso de tesis, guiándome y formándome como futura bióloga.

A la Dra. Soledad Anzuay por su apoyo, paciencia, y consejos. Por todo el tiempo dedicado y por guiarme en todo momento, siempre con la mejor predisposición.

A todo el grupo de laboratorio, gracias por abrirme las puertas y brindarme su ayuda en todo momento, por sus conocimientos y por trabajar siempre con alegría.

A mi madre y a mi padre, a quienes amo incondicionalmente, que estuvieron y están siempre, amándome, bancándome en cada paso y dándome la oportunidad de estudiar y llegar hasta acá.

A Nico, Tincho, Belu y Pablo, sin ustedes esto no hubiera sido posible. Por estar siempre apoyándome y dando ánimos para seguir, ayudándome con consejos o simplemente estando, los amo.

A mi familia, tíos, tías, primas, primos y abuelas por su cariño y apoyo en todo momento.

A mis hermanas del alma Cande, Giani y Agos, por estar siempre, por cada momento compartido, cada aprendizaje, por cuidarme y por ser mucho más que simplemente mis amigas de la universidad. Gracias por todos los excelentes e inolvidables momentos compartidos. Me dan la vida

A todas y a cada unas de las personas que me regaló la universidad y la ciudad Río Cuarto, por todas las charlas, juntadas y consejos, por estar siempre y hacer la vida más linda.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCION	8
CULTIVOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA	8
IMPORTANCIA DE MACRONUTRIENTES EN CULTIVOS VEGETALES Y SU DISPONIBILIDAD EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS DE CÓRDOBA	13
BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS	17
BIOINOCULANTES	19
Objetivo general:	20
<i>Objetivos específicos:</i>	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Cepas bacterianas utilizadas	22
1.1. Bacterias nativas asociadas a plantas de maní	22
1.2 Cepas de referencia	22
2. Medios de cultivos y conservación de las bacterias	23
3. Ensayos de coexistencia bacteriana	24
4. Ensayos de inoculación bacteriana en plantas de maní y maíz en ensayos de microcosmo	25
4.1 Material vegetal	25
4.2 Desinfección y germinación de semillas	26
4.3. Tratamientos bacterianos utilizados en las inoculaciones	28
4.4. Preparación del inoculante	28
4.5. Determinación del efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento de plantas de maní y maíz	29
5. Efecto de la inoculación bacteriana en el aporte de P y crecimiento de plantas de maní y maíz en diferentes estadios fenológicos	30
5.1. Desinfección y germinación de semillas	30
5.2. Preparación del inoculante	30
5.3. Determinación del efecto de inoculaciones simples con cepas nativas en el crecimiento de plantas de maní y maíz	31

6. Aplicación de inoculantes biológicos y fertilizantes sobre el rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo	31
6.1. Sitio de estudio	31
6.2. Tratamientos	34
6.3. Preparación del inoculante	35
6.4. Determinación del efecto de la inoculación bacteriana en plantas de maíz.....	35
7. Análisis estadístico.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
1. Estudios de coexistencia bacteriana.....	37
2. Análisis del efecto de la inoculación bacteriana (simple y mixta) en el crecimiento y contenido de P de plantas de maní y maíz en ensayos en microcosmo	38
2.1. Efecto las inoculaciones bacterianas en plantas de maní:.....	38
3. Efecto de la inoculación bacteriana en el aporte de P en plantas de maní y maíz en diferentes estadios fenológicos.....	46
3.1. Efecto de la inoculación con BSP sobre los parámetros de crecimiento y contenido de P en plantas de maní durante los primeros estadios de crecimiento vegetal.....	46
3.2 Efecto de la inoculación con BSP sobre los parámetros de crecimiento y contenido de P en plantas de maíz.....	51
4. Efecto de la aplicación de inoculantes biológicos y fertilizantes sobre el rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo.....	55
4.1. Campaña 2017/2018: Rendimientos de maíz inoculado con <i>Serratia</i> sp. S119 en los campos experimentales de La Aguada y Río Cuarto.	56
4.2 Campaña 2018/2019: Análisis de las plantas de maíz inoculadas con <i>Serratia</i> sp. S119 en el campo experimental de La Aguada	62
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

Resumen

El presente trabajo evalúa el efecto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en la promoción del crecimiento y adquisición de P de plantas de maní y maíz en ensayos a microcosmo y a campo. Inicialmente, se evaluó el efecto de inoculaciones simples y mixtas con dos cepas nativas, *Enterobacter* sp. J49 y *Serratia* sp. S119 y cepas de referencia fijadoras de N₂. Las bacterias se inocularon en raíces de plantas de maní y maíz y se analizaron diferentes parámetros de crecimiento, así como el contenido de P₇ de las mismas para determinar la efectividad de las cepas. Las cepas nativas, en inoculaciones simples, mostraron promover significativamente el crecimiento de las plantas respecto a las plantas control. Por otro lado, se analizó el efecto promotor de las BSP nativas en diferentes estadios de crecimiento de plantas de maní y maíz. Fue posible observar que el efecto benéfico de las inoculaciones se produce más tempranamente en plantas de maní que en plantas de maíz. Las inoculaciones bacterianas incrementaron también el contenido de P en tejido aéreo y radical de las plantas. A partir de estos dos ensayos se observó que *Enterobacter* sp. J49 presentó resultados más alentadores en plantas de maní y *Serratia* sp. S119 en plantas de maíz. Considerando lo observado en los ensayos anteriores, se evaluó el efecto de la aplicación del inoculante biológico en base a *Serratia* sp. S119 en combinación con fertilizantes fosforados en la adquisición de P y rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo. El mismo se realizó a lo largo de 2 campañas, 2017/18 y 2018/19 y en dos campos de la provincia de Córdoba. Se pudo observar que la cepa nativa incrementó significativamente el rendimiento de este cultivo incluso en condiciones de sequía.

Es posible concluir que los inoculantes biológicos a base de cepas nativas, utilizados en este trabajo, incrementan la adquisición de P y el crecimiento de plantas de maní y maíz.

INTRODUCCION

CULTIVOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA EN LA PROVINCIA DE CÓRDOBA

Los cultivos de maní y maíz

La planta de maní (*Arachis hypogaea* L.) es una leguminosa que pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae (Figura 1). Es originaria de Sudamérica, específicamente del noroeste de Argentina y del sur de Bolivia (Krapovickas, 2009; Ferguson *et al.*, 2004). Es una planta herbácea anual que alcanza una altura de 20 a 60 cm y, según la variedad, el desarrollo de las ramas laterales puede ser erecto, semierecto o rastrero. Es una planta geocárpica, y por lo tanto la infrutescencia se introduce en el suelo después de la floración y luego el fruto (vainas) madura dentro de la tierra (Moss y Ramanatha Rao, 1995).

A



B



Figura 1. Cultivo (A) y planta (B) de *Arachis hypogaea* L. (maní)

El suelo ideal para el crecimiento de maní es aquél bien drenado, liviano, de textura franco arenosa, libre de sales, con alto contenido de calcio, así como de fósforo y potasio lo que le permite un buen desarrollo del sistema radicular produciendo vainas de buen tamaño. Para el crecimiento óptimo de este cultivo se requiere un pH entre 6-6.5, temperaturas superiores a 20°C y precipitaciones entre 600-1200 mm anuales (Pedelini, 2012). La temperatura y la precipitación son los limitantes climáticos en cuanto a crecimiento, producción y extensión del cultivo en el mundo (Fiant *et al.*, 2013). La duración del ciclo vegetativo varía según el cultivar y las temperaturas ambientales (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2006; Zapata *et al.*, 2012).

El cultivo de esta oleaginosa es de gran importancia económica en la Argentina. Nuestro país es el noveno productor mundial y, debido al bajo consumo interno, exporta alrededor del 95% de su producción; lo que lo convierte en el principal exportador mundial (Bolsa de Comercio de Rosario, 2018). La producción nacional de maní en la campaña 2017/2018 fue de 842.600 Tns. de maní en caja y 536.400 Tns. de maní en grano; disminuyendo, el rendimiento en caja, en un 42% respecto a la campaña 2016/2017 (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2018). El "Fenómeno La Niña" se manifestó con gran escasez de lluvia en el área productiva de Argentina a partir de octubre de 2017 y se acentuó durante el verano de 2018; evidenciando la peor sequía de los últimos 50 años (Agrovoz, 2018).

La provincia de Córdoba concentra, aproximadamente, el 90% de la producción nacional de maní (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2018) (Figura 2). En esta área productora, este cultivo, involucra una infraestructura importante y alrededor de 12000 puestos de trabajos directos e indirectos (Camara Argentina de Maní, 2018)

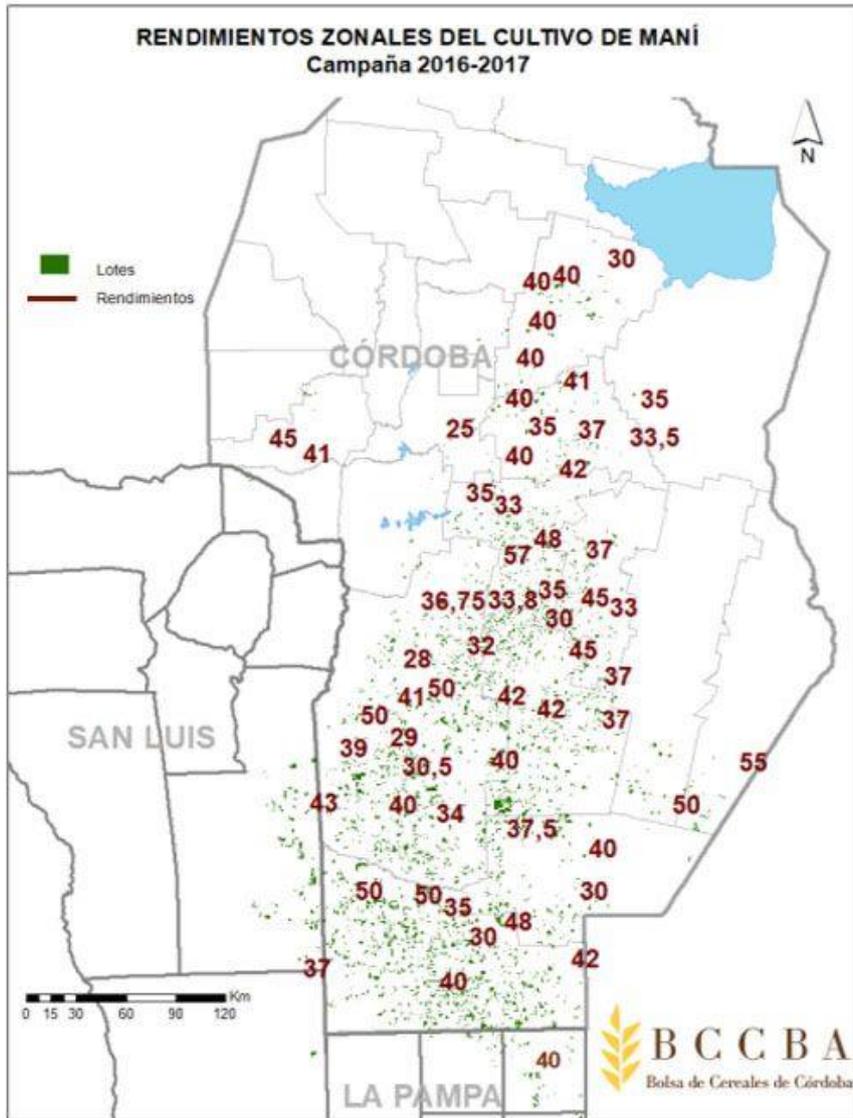


Figura 2. Rendimientos zonales del cultivo de maní. Fuente: Bolsa de Cereales de Córdoba, 2018.

En Córdoba, el cultivo de maní se concentra en la región centro-sur. Sin embargo, en los últimos años este cultivo ha ido desplazándose hacia el sur provincial debido, principalmente, al deterioro de los suelos como consecuencia de prácticas agrícolas tales como el monocultivo, laboreo intensivo, empleo excesivo de agroquímicos y a la gran incidencia de enfermedades que afectan a este cultivo (Doran y Zeiss, 2000; Tilman *et al.*, 2001; INTA, 2014). La rotación de cultivos es una herramienta agrícola sustentable desarrollada para combatir la incidencia de enfermedades y disminuir el agotamiento de nutrientes que provoca el monocultivo (Leoni Velazco, 2013).

En la zona agrícola argentina, el maíz (*Zea mays* L.) es el principal cultivo utilizado en rotación con maní. La planta de maíz es una monocotiledónea que pertenece al orden de los Cyperales, familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género (Figura 3). Esta es una planta anual que alcanza una altura de 60 cm a 2 m. Si bien la producción de granos es la principal razón de este cultivo, todas las partes de la planta son utilizadas para diversos fines, ya sea como alimento humano, animal, o fermentado para varios productos industriales (Paliwal, 2001). El ciclo de cultivo es de 150 a 140 días y las condiciones óptimas de la planta de maíz son una temperatura de germinación entre 21 y 26°C, debiendo estar siempre por encima de los 10°C, un pH ligeramente ácido (entre 6-7), suelos algo

arenosos y 25 mm de agua por semana en época de crecimiento, y 40 mm para la formación de la mazorca (MAGRAMA, 2013).

A



B



Figura 3. Cultivo (A) y planta (B) de *Zea mays* L. (maíz)

El cultivo de maíz es uno de los más importantes a nivel mundial y Argentina se encuentra entre los principales productores y exportadores con una producción aproximada, en la campaña 2017/2018, de 11,1 millones de toneladas; mientras que, en la campaña 2018/19, alcanzó una producción récord de 22,9 millones de toneladas (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2019). La provincia de Córdoba, desde la campaña 2013/2014 hasta la actualidad, se consolidó a nivel nacional como la principal provincia productora de maíz; concentrando, aproximadamente, el 35% de la producción (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2019) (Figura 4).

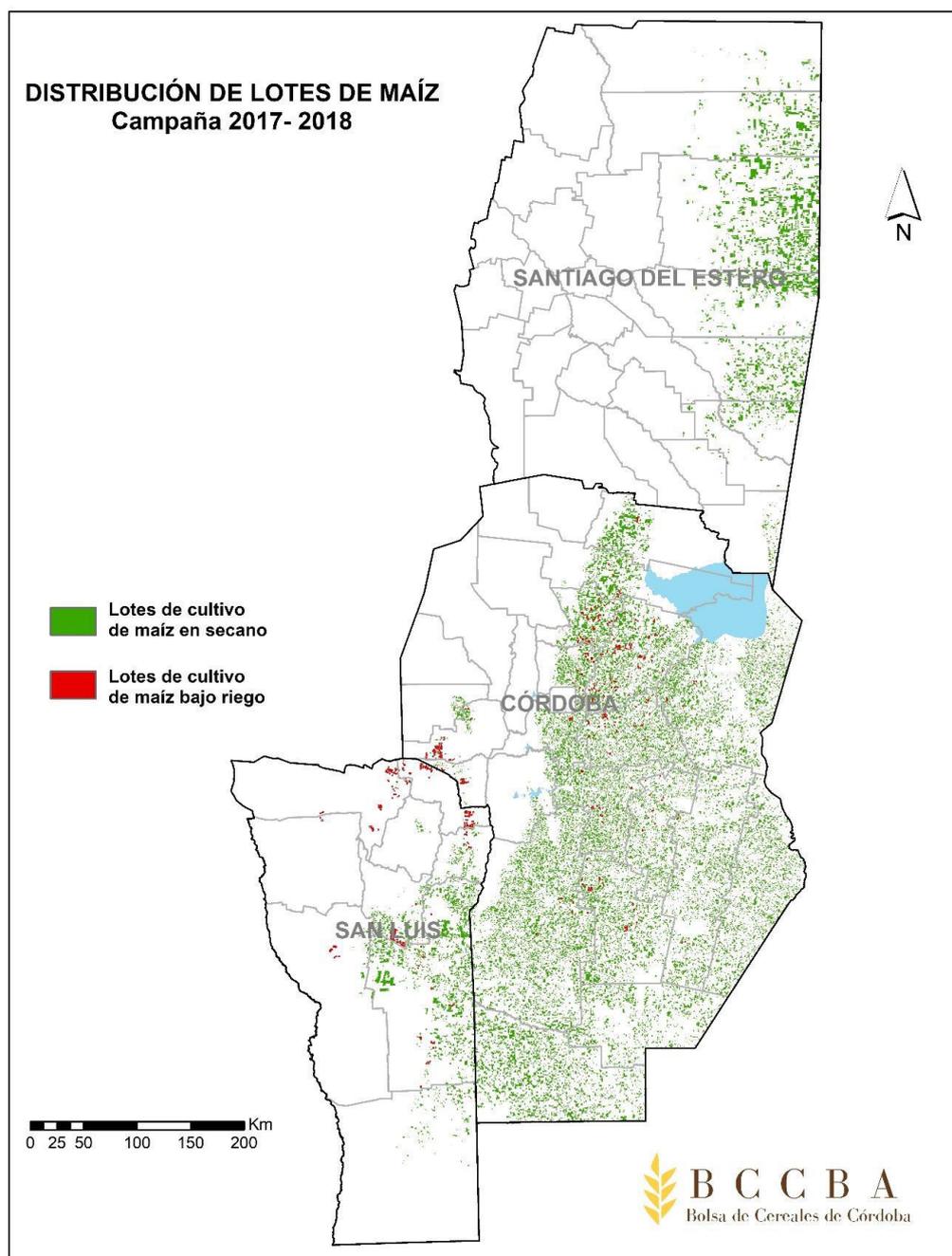


Figura 4. Mapa de zona centro de cultivo de maíz. Fuente: Departamento de Información Agroeconómica - Bolsa de Cereales de Córdoba, 2019.

IMPORTANCIA DE MACRONUTRIENTES EN CULTIVOS VEGETALES Y SU DISPONIBILIDAD EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS DE CÓRDOBA

El suelo agrícola es el recurso más importante de la economía Argentina. Sin embargo, la falta de una fertilización balanceada, los bajos niveles de

reposición de nutrientes del suelo, sumados a la pérdida de materia orgánica, han conducido a una disminución considerable de la fertilidad de los suelos y, por lo tanto, de la sustentabilidad física, ecológica y económica de las explotaciones agrícolas (Puig, 2004). Uno de los factores que genera pérdidas durante la producción en los cultivos de maní y maíz es la falta de fertilidad de los suelos agrícolas (García-Lara y Bergvinson, 2007). Con respecto al contenido de minerales del suelo, se ha determinado déficit de los macronutrientes nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). En suelos asociados a la producción de maní en Córdoba se ha determinado un bajo contenido de N (9-14 ppm) y P (5-15 ppm) (Sainz Rosas *et al.*, 2012; Anzuay *et al.*, 2015, 2017). Estos macronutrientes son requeridos para el crecimiento de las plantas ya que son componentes estructurales de moléculas esenciales y son requeridos en las células vegetales para múltiples procesos tales como la de división celular, crecimiento y desarrollo de raíces, entre otros (Sindhu *et al.*, 2014). Así, estos elementos son críticos para la producción agropecuaria (Rubio, 2002). Si bien el N es uno de los elementos más abundantes, predominantemente como N₂, las plantas solo pueden absorber formas reducidas de este elemento. Por otra parte, si bien la concentración de P en el suelo es alta, debido a su baja solubilidad y fijación en el suelo, un porcentaje mínimo se encuentra disponible para las plantas y a menudo limita el crecimiento de las mismas (Gulati *et al.*, 2008).

Los bajos niveles de P disponible para las plantas provoca la aplicación excesiva de fertilizantes fosforados en los suelos con el objetivo de suplir la alta demanda de este nutriente. Se conoce que aproximadamente del 90% de estos fertilizantes precipitan a formas insolubles de P; de esta manera no pueden ser utilizados por las plantas y se favorece su acumulación. Generalmente precipitan en forma de fosfato tricálcico (Ca_3PO_4) en suelos alcalinos, y fosfato de hierro (FePO_4) o de aluminio (AlPO_4) en suelos ácidos (Achal *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2010).

En la provincia de Córdoba, la mayor parte de los suelos destinados a la agricultura son de tipo calcáreo y el P presente en los mismos se encuentra predominantemente bajo la forma de fosfatos de calcio. Los valores detectados de P asimilable para las plantas en los suelos maniseros de Córdoba son inferiores a los niveles críticos para maní y maíz; ya que, para maní el contenido óptimo sugerido es de 10 ppm y para maíz dichos valores se encuentran entre 12-15 ppm (Gudelj *et al.*, 2016; Espósito, comunicación oral, 2019). Debido a los requerimientos de P de estos cultivos, se considera conveniente mantener en el suelo los niveles mínimos de este nutriente en 20 ppm.

El P existe en la naturaleza en una variedad de formas orgánicas e inorgánicas, principalmente en formas insolubles o muy poco solubles (Figura 5).

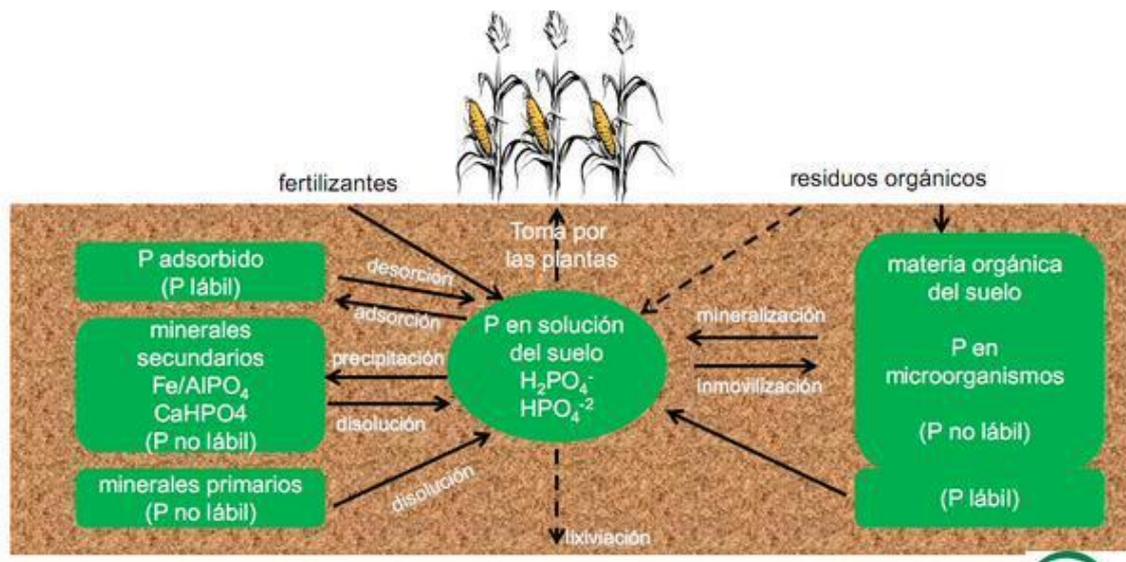


Figura 5. Formas y ciclo biogeoquímico de P en el suelo de los agroecosistemas.

La distribución de las diferentes formas de fósforo en el suelo depende de factores que incluyen el pH, aporte de fertilizantes, tipo de suelo, tipo de vegetación y actividad microbiana (Rooney *et al.*, 2009.). Las plantas adquieren el fosfato a partir de la solución del suelo en forma inorgánica en estado soluble como fosfatos mono y dibásicos, siendo necesario un pH de 6,5 para que el ion ortofosfato en el suelo quede disponible para las plantas, dado que a ese pH la precipitación de los fosfatos de aluminio y calcio disminuye (Sylvia *et al.*, 1995). Debido al fenómeno de precipitación que sufren los fosfatos, principalmente provenientes de los fertilizantes químicos, una alternativa al empleo de los mismos son los microorganismos solubilizadores de fosfato. Entre éstos, las bacterias solubilizadoras de fosfato han sido motivo de muchos estudios debido a su eficiente capacidad de solubilizar fuentes insolubles de P del suelo.

BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS

La productividad de los sistemas agrícolas depende, en parte, de los procesos funcionales de las comunidades microbianas del suelo (Doran y Zeiss, 2000).

Los microorganismos del suelo son críticos para su funcionamiento ya que llevan a cabo numerosas funciones, tales como descomposición y mineralización de materia orgánica, liberación y transformación de nutrientes inorgánicos, participación en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, mantenimiento de la salud y calidad de los suelos, etc. (Ngoma *et al.*, 2012).

La rizósfera es la interfase suelo-raíz constituida por el suelo adherido a la raíz, así como el suelo que la rodea (Babalola, 2010). También, es definida como el volumen de suelo que rodea a la raíz y donde se establecen interacciones con los microorganismos y las raíces de las plantas (Ngoma *et al.*, 2012). Esta interfase es un entorno ecológico versátil y dinámico de intensas interacciones microorganismos-planta para aprovechar micro y macronutrientes (Jeffries *et al.*, 2003). Un considerable número de especies bacterianas, la mayoría asociadas con la rizósfera de las plantas, son capaces de afectar positivamente el crecimiento de las mismas y han sido denominadas PGPB ("plant growth promoting bacteria") (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Las PGPB poseen mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal. Los mecanismos directos incluyen: fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfato, producción de auxinas, ACC desaminasa, citoquininas, giberelinas, y secuestro de hierro por sideróforos bacterianos. Por

otro lado, los mecanismos indirectos se refieren a rasgos bacterianos que inhiben el funcionamiento de uno o más organismos patógenos de plantas, tanto hongos como bacterias (Balogh *et al.*, 2010; Frampton *et al.*, 2012). Las bacterias con características PGPB a menudo poseen uno o más de los mecanismos mencionados anteriormente y éstos difieren bajo diferentes condiciones ambientales y del suelo (Saharan y Nehra, 2011).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFN₂) y solubilizadoras de fosfato (BSF) aportan directamente N y P, respectivamente a las plantas. Así, la BFN₂ contribuye a disminuir la necesidad de aplicación de fertilizantes nitrogenados químicos y a mantener la estructura y materia orgánica de los suelos (Lodeiro, *et al.*, 2003.). Por su parte, las PGPB que poseen capacidad solubilizadora/mineralizadora de P son de gran importancia ya que están asociadas a la nutrición de este elemento esencial para las plantas (Chen *et al.*, 2006).

Son diversos los mecanismos mediante los cuales las BSP pueden dejar disponible el P dependiendo de la naturaleza química de la fuente. El P es liberado de los compuestos fosforados orgánicos mediante procesos enzimáticos (Picone *et al.*, 2002) tales como las fosfatasas, fitasas, etc. Mientras que la liberación de ácidos orgánicos es el principal mecanismo por el cual los compuestos fosfatados inorgánicos son movilizados (Fernández *et al.*, 2005). Estos ácidos quelan los cationes tales como el Al⁺³, Fe^{+3/+2} y Ca⁺² unidos al P convirtiéndolo en disponible con el subsecuente descenso de pH

(Stevenson, 2005). Entre los ácidos orgánicos secretados por las bacterias, la producción de ácido glucónico es el más reportado y que define el fenotipo MPS (solubilización de fosfato mineral). Este mecanismo ha sido descrito en bacterias Gram negativas las cuales producen este ácido a través de una oxidación de glucosa no fosforilativa por acción de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) y el cofactor proteico pirroloquinolina quinona (PQQ), holoenzima GDH-PQQ (Duine, 1991).

BIOINOCULANTES

En la agricultura moderna, los agroquímicos son frecuentemente aplicados para incrementar el rendimiento de los cultivos (George *et al.*, 2016). Sin embargo, los agroquímicos tienen efectos adversos a largo plazo sobre las propiedades del suelo, como también en las poblaciones de bacterias rizósfericas (Ahemad *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente, una estrategia alternativa para reducir el uso de agroquímicos es la inoculación con PGPB (Vicario *et al.*, 2016). Por lo tanto, el empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato es una alternativa económica y más amigable al empleo de fertilizantes químicos para incrementar el contenido de nutrientes en el suelo. Bashan *et al.* (2014) indican que la formulación y aplicación a campo de inoculantes biológicos solos, en consorcio o combinados con fertilizantes para mejorar la disponibilidad de nutrientes es una estrategia económica y es de gran importancia en una agricultura sustentable. Además, el uso de cepas nativas es un aspecto importante cuando

se pretende introducir bacterias al suelo debido a su superior adaptabilidad al ambiente respecto a cepas foráneas (Ramachandran *et al.*, 2007). Así, diversos autores han reportado efectos benéficos en plantas de interés agronómico cuando las mismas fueron inoculadas con bacterias nativas (Viruel *et al.*, 2014; Pradhan, 2017). Resultados previos del laboratorio demostraron que cepas bacterianas nativas de plantas de maní fueron más efectivas en la promoción del crecimiento de esta leguminosa, respecto a las cepas de referencias utilizadas (Taurian *et al.*, 2013; Anzuay *et al.*, 2017).

HIPOTESIS

Los inoculantes biológicos a base de cepas nativas incrementan la adquisición de fósforo y el crecimiento de plantas de maní y maíz.

Objetivo general:

Estudiar el efecto de inoculaciones bacterianas sobre el crecimiento y estado nutricional de plantas de maní y maíz.

Objetivos específicos:

1. Analizar el efecto de la inoculación (simple y mixta) con bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de plantas de maní y maíz en ensayos en microcosmo.

2. Evaluar el efecto de inoculantes biológicos a base de bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato en la adquisición de P y en el crecimiento de plantas de maní y maíz en diferentes estadios fenológicos.
3. Estudiar el efecto de la aplicación de un inoculante biológico en combinación con diferentes dosis de fertilizantes químicos sobre el rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas utilizadas

1.1. Bacterias nativas asociadas a plantas de maní

Se emplearon 2 cepas bacterianas (*Enterobacter* sp. J49 y *Serratia* sp. S119) aisladas del interior de nódulos de plantas de maní de la región manisera de la provincia de Córdoba (Taurian *et al.*, 2010). Las mismas fueron seleccionadas por presentar eficiente capacidad solubilizadora y mineralizadora de fosfato, fijar N₂ y por promover significativamente el crecimiento de plantas de maní y maíz en ensayos de microcosmo (Taurian *et al.*, 2013; Anzuay *et al.*, 2013, 2015, 2017; Ludueña *et al.*, 2017).

1.2 Cepas de referencia

En los ensayos de inoculación bacteriana en microcosmo se emplearon cepas de referencia para cada una de las plantas. En plantas de maní, se incluyó la cepa comercial *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (IPAGRO, Brasil); microsimbionte fijador de N₂ en esta leguminosa, utilizado en los campos agrícolas de la provincia de Córdoba. En plantas de maíz se empleó la bacteria *Pseudomonas fluorescens* PMT1, la cual es empleada como biofertilizante fosforado en productos comerciales que se aplican para trigo y maíz en Argentina (RIZOFOS"®-RIZOBACTER) y *Azospirillum brasilense* Az 39 (INTA) empleada como biofertilizante en maíz en nuestro país.

2. Medios de cultivos y conservación de las bacterias

Inicialmente las bacterias fueron recuperadas a partir de criotubos en los cuales se encontraban conservadas. Para ello se tomó una alícuota de 50 µl que fue sembrada en medio TY (Beringer, 1974) o LB (Miller, 1972) para las cepas nativas y *P. fluorescens* PMT1, NFb (Döbereiner, 1995.) para *A. brasilense* Az 39 o YEMA (Vincent, 1970) para *B. sp.* SEMIA 6144. Posteriormente, las bacterias se mantuvieron en placas conteniendo el medio correspondiente según la cepa. Para su conservación a largo plazo, se transfirieron alícuotas de cultivos líquidos crecidos hasta fase logarítmica tardía a tubos Eppendorf de 1,5 ml que fueron suplementados con glicerol estéril en una concentración final de 20% y 40% (v/v) y se conservaron a -80°C o -20°C, respectivamente.

Medio TY

Tripteína	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,5 g/l
Agar	15 g/l

Medio LB

Tripteína	10 g/l
Extracto De levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar	15 g/l

Medio YEMA

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
Manitol	10 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Rojo Congo	10 ml/l
pH	6.8-7
Agar	15 g/l

Medio NFB

D-molico	5 g/l	*Solución de micronutrientes	
K ₂ HPO ₄	5 ml/l	Ma ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,2g
NaCl (sol10%)	1 ml/l	MnSO ₄ 2H ₂ O	0,235g
MgSO ₄ 7H ₂ O (sol 10%)	2 ml/l	H ₃ BO ₃	0,28g
CaCl ₂ 2H ₂ O (sol 1%)	0,2 g/l	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,008g
Fe EDMA	4 ml/l	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,024g
KOH	4,5 mg/l		
Extracto de levadura	20 mg/l		
0,3 µl de bromotimol	2 ml/l		
pH	6,5		
Agar	15 g/l		
Solución de Micronutrientes*	2 ml/l		

3. Ensayos de coexistencia bacteriana

Previo a los ensayos de inoculación en plantas se realizaron ensayos de coexistencia entre las diferentes cepas analizadas para su empleo en inoculaciones mixtas. En estos ensayos se sembraron dos bacterias en una misma placa conteniendo medio TY, LB, NFb o YEMA. Las bacterias se sembraron por estrías, desde el centro de la placa hacia los bordes, cada una cubriendo una mitad de la superficie de la misma. Se realizaron siembras simultáneas y espaciadas dependiendo de la velocidad de crecimiento de las bacterias (Olmedo, 2002). Las cepas nativas y *P. fluorescens* PMT1 presentan crecimiento rápido; mientras que, *A. brasilense* Az 39 y *B. sp.* SEMIA 6144 tienen tasas de crecimiento intermedias y lentas, respectivamente. A tal fin éstas últimas fueron sembradas con anterioridad a las otras cepas para asegurar un crecimiento confluyente y analizar la coexistencia.

- Las combinaciones se realizaron entre las cepas nativas solubilizadoras de fosfato y las cepas comerciales fijadoras de N₂. Se incluyo en estos ensayos la combinación de las cepas comerciales solubilizadora de fosfato y fijadora de N₂ (*Pseudomona fluorescens* PMT1; *Azospirillum. brasilense* Az 39) recomendadas para maíz.
- *Serratia* sp. S119 + *B.* sp. SEMIA 6144,
- *Enterobacter* sp. J49 + *B.* sp. SEMIA 6144,
- *Serratia* sp. S119 + *A. brasilense* Az 39,
- *Enterobacter* sp. J49 + *A. brasilense* Az 39.
- *P. fluorescens* PMT1 + *A. brasilense* Az 39.

4. Ensayos de inoculación bacteriana en plantas de maní y maíz en ensayos de microcosmo

Se realizaron ensayos de inoculaciones simples y mixtas, con las bacterias seleccionadas, en plantas de maní y maíz en condiciones controladas de luz y temperatura, creciendo en suelo no estéril en cámaras de cultivo (microcosmo)

4.1 Material vegetal

Para llevar adelante este ensayo se emplearon semillas de maní (cultivar Granoleico) y semillas de maíz (híbrido DK7210).

4.2 Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de maní, se desinfectaron siguiendo el método de Vincent (1970):

- Tratamiento con etanol 96° durante 30 segundos
- Un lavado con agua destilada estéril.
- Tratamiento con agua oxigenada (H₂O₂) 15% durante 15 minutos.
- Seis o siete lavados con agua destilada estéril.

Por su parte, las semillas de maíz fueron desinfectadas según el método descrito por Pereira *et al.* (2011):

- Tratamiento con etanol 96% durante 30 segundos
- Un lavado con agua estéril
- Tratamiento con hipoclorito de sodio 6% durante 10 minutos.
- Cinco a seis lavados con agua destilada estéril

Las semillas desinfectadas, de maní o maíz, fueron germinadas en placas de Petri, conteniendo algodón y papel de filtro humedecido con agua estéril. Las placas fueron colocadas en estufa a 28°C, en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó una longitud aproximada de 2-3 cm. Las semillas germinadas fueron transferidas a macetas conteniendo como soporte suelo no estéril proveniente del área manisera de la provincia de Córdoba.

Las propiedades físico-químicas del suelo fueron: -N: 16,7 ppm (Reducción por Cadmio), -P: 7,35 ppm (Método Kurtz y Bray I), -materia orgánica: 2,4 %

(Método Walkley-Black), -humedad: 7,1 % y -pH: 6,58 (Potenciometría 1:2,5)

(Laboratorio integral agropecuario)

Las macetas, conteniendo las semillas pregerminadas de maní y maíz, fueron colocadas en cámara de cultivo de plantas y se inocularon a los 7 días de crecimiento, cuando tenían una altura aproximada de 10 cm. Las mismas fueron mantenidas en la mencionada cámara con un ciclo de luz día/noche de 16/8 horas, temperatura 25 °C y regadas regularmente con medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) sin P, sin N y/o sin P y N, dependiendo de los tratamientos (punto 4.3).

<u>Medio Hoagland</u>		<u>Medio Hoagland sin P y N</u>	
Ca(NO ₃) ₂ 1M	10 ml/l	ClCa1M	10 ml/l
KNO ₃ 1M	10 ml/l	ClK 1M	10 ml/l
SO ₄ Mg	4 ml/l	SO ₄ Mg	4 ml/l
PO ₄ H ₂ K 1M	2 ml/l	ZnSO ₄ 7H ₂ O 1mM	4 ml/l
FeCl ₃	2 ml/l	FeCl ₃ 5mg/ml	2 ml/l
Solución de micronutrientes*	2 ml/l	Solución de micronutrientes*	2 ml/l
<u>Medio Hoagland sin N</u>		<u>Medio Hoagland sin P</u>	
ClCa1M	10 ml/l	Ca ₃ (NO ₃) ₂ 1M	10 ml/l
PO ₄ H ₂ K 1M	2 ml/l	KNO ₃ 1M	10 ml/l
SO ₄ Mg	4 ml/l	SO ₄ Mg	4 ml/l
FeCl ₃ 5mg/ml	2 ml/l	FeCl ₃ 5mg/ml	2 ml/l
Solución de micronutrientes*	2 ml/l	Solución de micronutrientes*	2 ml/l

*Solución de micronutrientes

H ₂ BO ₃	2,83 g/l
MnCl ₂	1,81 g/l
ZnCl ₂	0,11 g/l
CuSO ₄	0,05 g/l
NaMoO ₄	0,025 g/l

4.3. Tratamientos bacterianos utilizados en las inoculaciones

Los tratamientos bacterianos propuestos para las inoculaciones en plantas de maní fueron:

- Inoculaciones simples: 1) *Serratia* sp. S119
2) *Enterobacter* sp. J49
- Inoculaciones mixtas: 3) *Serratia* sp. S119 + *B.* sp. SEMIA 6144
4) *Enterobacter* sp. J49 + *B.* sp. SEMIA 6144

Como controles se emplearon plantas de maní sin inocular suplementadas con 3 ml de medio TY estéril y plantas de maní inoculadas con la cepa comercial *B.* sp. SEMIA 6144.

Los tratamientos propuestos en plantas de maíz fueron:

- Inoculaciones simples: 1) *Serratia* sp. S119
2) *Enterobacter* sp. J49
- Inoculaciones mixtas: 3) *Serratia* sp. S119 + *A. brasilense* Az 39
4) *Enterobacter* sp. J49 + *A. brasilense* Az 39

Como controles en plantas de maíz se emplearon plantas sin inocular suplementadas con 3 ml de medio TY estéril, plantas de maíz inoculadas con *P. fluorescens* PMT1, *A. brasilense* Az 39 y *P. fluorescens* PMT1 + *A. brasilense* Az 39.

4.4. Preparación del inoculante

Cada inoculante bacteriano fue preparado a partir de una colonia aislada crecida en medio TY, LB, YEM o NFb transferida al mismo medio líquido el

cual fue incubado a 28 °C en agitación. Se inoculó un volumen de 3 ml de cada cultivo crecido hasta fase estacionaria (10^9 UFC/ml) en las plántulas de maní o maíz de 7 días en las inoculaciones simples y en los tratamientos de inóculos mixtos se sembraron 1,5 ml de cada cultivo.

4.5. Determinación del efecto de la inoculación bacteriana sobre el crecimiento de plantas de maní y maíz

Las plantas de maní y maíz fueron cosechadas a los 45 días (V5-V6) y 21 días (V4-V5) postinoculación, respectivamente. Se midieron en las mismas las siguientes variables de crecimiento vegetal: longitud (cm) y peso seco aéreo y radical (g/planta) y contenido de P (mg/g planta) de tejidos vegetales aéreos y radicales (Jackson *et al.*, 1973, con modificaciones).

Para la determinación de la longitud aérea y radical, las plantas fueron separadas en el punto en el que comienza el tallo. La longitud aérea se determinó midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la última hoja, y la longitud radical desde la corona radical hasta el extremo de la raíz. Los datos fueron expresados en centímetros (cm). Por otra parte, el peso seco aéreo y radical fue determinado luego de que las partes aéreas y radicales fueran secadas en estufa a 70°C aproximadamente 10 días, hasta obtener peso constante. Se utilizó una balanza granataria con un error de 0,001 g. Los datos fueron expresados en gramos (g/planta).

5. Efecto de la inoculación bacteriana en el aporte de P y crecimiento de plantas de maní y maíz en diferentes estadios fenológicos

Se realizaron ensayos en microcosmos para evaluar el efecto de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y aporte de P durante diferentes estadios del crecimiento de plantas de maní y maíz.

5.1. Desinfección y germinación de semillas

Semillas de maní y maíz sanas y limpias se desinfectaron y germinaron como se mencionó anteriormente en el punto 4.1. Las semillas germinadas fueron transferidas a macetas conteniendo como soporte suelo proveniente del área manisera de la provincia de Córdoba. Las propiedades físico-químicas del suelo fueron: -N: 9,2 ppm, -P: 8,70 ppm, -materia orgánica: 1,25 %, -humedad: 4,2 % y -pH: 6,76 (Laboratorio integral agropecuario). Las plantas fueron mantenidas en cámara de cultivo de plantas en condiciones controladas y regadas regularmente con medio Hoagland sin P.

5.2. Preparación del inoculante

Para este ensayo en microcosmo se emplearon de manera individual las bacterias solubilizadoras de fosfato *Serratia* sp. S119 y *Enterobacter* sp. J49. El inoculante bacteriano fue preparado e inoculado como se mencionó anteriormente en el punto 4.3. Como controles se emplearon plantas de maní y maíz sin inocular suplementadas con 3 ml de medio TY estéril. Las plantas

de maní y maíz fueron cosechadas a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días postinoculación.

5.3. Determinación del efecto de inoculaciones simples con cepas nativas en el crecimiento de plantas de maní y maíz

En los diferentes estadios iniciales de crecimiento vegetal de ambas plantas se midieron los siguientes parámetros de crecimiento: longitud aérea y radical y biomasa seca aérea y radical (ver punto 4.5). Además, se determinó el contenido de P en tejidos aéreos y raíces y en el soporte en cada tiempo analizado (ver punto 4.5).

6. Aplicación de inoculantes biológicos y fertilizantes sobre el rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo

En función de los resultados obtenidos en el ensayo en microcosmo mencionado en el punto 4, se realizaron ensayos a campo empleando como inoculante biológico la cepa nativa *Serratia* sp. S119 en plantas de maíz. Para realizar estos estudios se contó con la colaboración del Ing. Agr. Federico Morla, docente e investigador de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

6.1. Sitio de estudio

Se realizaron ensayos simultáneos en los campos experimentales de la Universidad Nacional de Río Cuarto en las localidades de Río Cuarto (33°06'35"S 64°18'07"O) y La Aguada (64°38'54.94"O), provincia de Córdoba

en la campaña 2017-2018, mientras que en la campaña 2018-2019 el ensayo se realizó en el campo de La Aguada.

Las parcelas constaron de 5 surcos de 40 m de largo separados entre sí por 0,7 m. La siembra se realizó con una sembradora autopropulsada neumática monofila (Nova SIEMBRA) y la inoculación (dosis de 1,5 l/ha diluidas en un caldo de inoculación de 50 l/ha) se llevó a cabo, en el momento de la siembra, de forma manual en el surco abierto donde se depositaron las semillas de maíz (híbrido DK7210), a una profundidad de 5-7 cm, con una tasa de siembra de 6 semillas por metro. Se llevo a cabo un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento.

Previo a la siembra se tomaron sub-muestras de suelo de los primeros 20 cm de profundidad utilizando transectas para analizar las propiedades físico-químicas iniciales del suelo (Tabla 1) (Laboratorio integral agropecuario) .

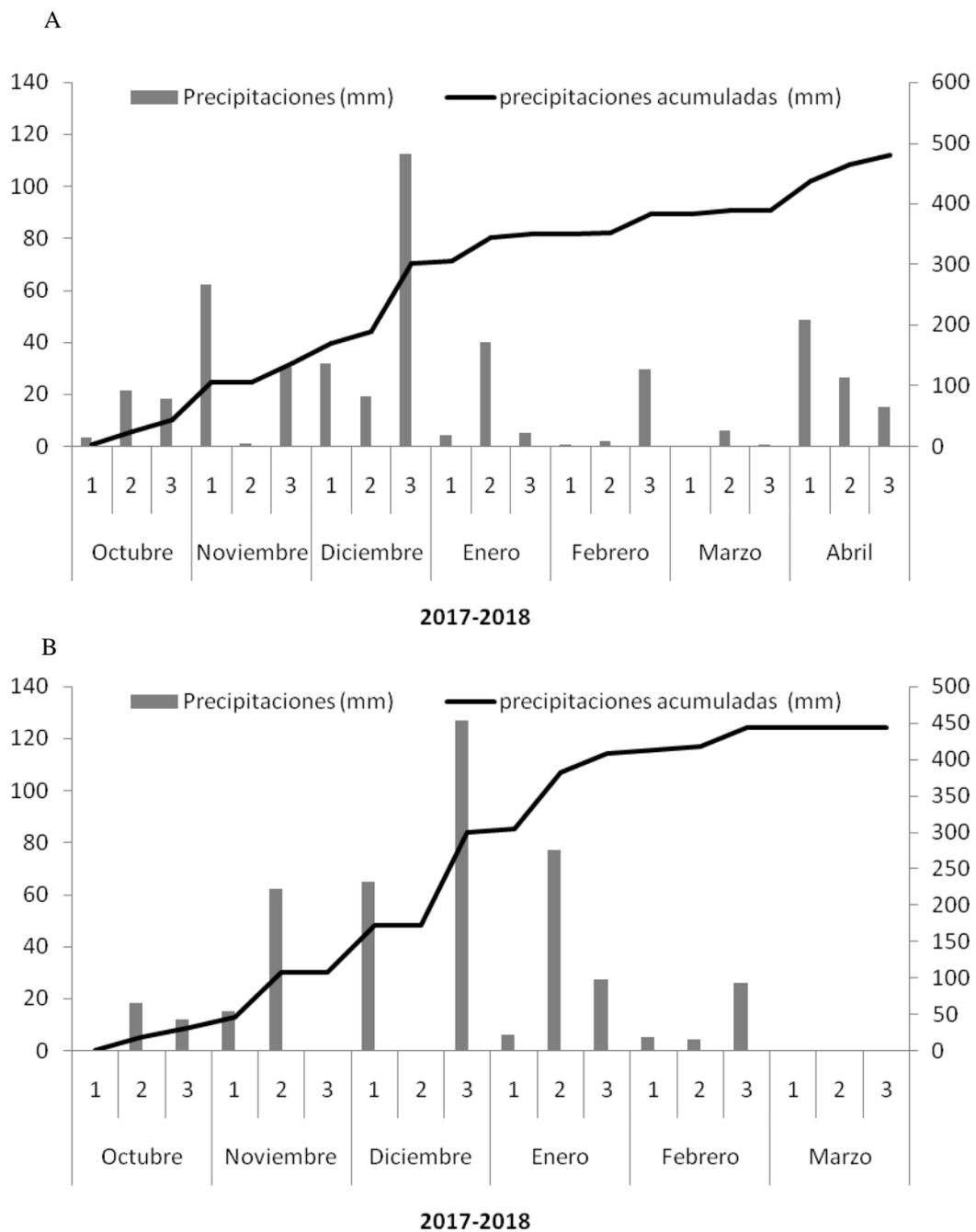
Tabla 1. Características iniciales de los suelos en los campos experimentales de La Aguada y Río Cuarto

Características físico-químicas	Campaña 2017/2018		Campaña 2018/2019
	La Aguada	Río Cuarto	La Aguada
¹ N (ppm)	25,6	21,1	19,8
² P (ppm)	6,4	25,3	13,6
³ Materia Orgánica (%)	12	18	1,22
⁴ Humedad (%)	7,5	20,4	ND
⁵ pH	6,4	6,1	6,1

¹: ácido fenolsulfónico; ²: método I de Kurtz y Bray ³: Método Walkley-Black; ⁴: 100-105 °C; ⁵: Potenciometría 1: 2.5;

ND: no determinado

El campo ubicado en la localidad de Río Cuarto fue mantenido bajo riego artificial cuando el valor de agua útil del suelo era inferior al 50%, mientras que en el campo localizado en La Aguada las condiciones fueron de secano. Durante el período de crecimiento del cultivo de maíz, durante las dos campañas analizadas, se registraron las precipitaciones (mm) en los campos experimentales utilizados (Figura 6).



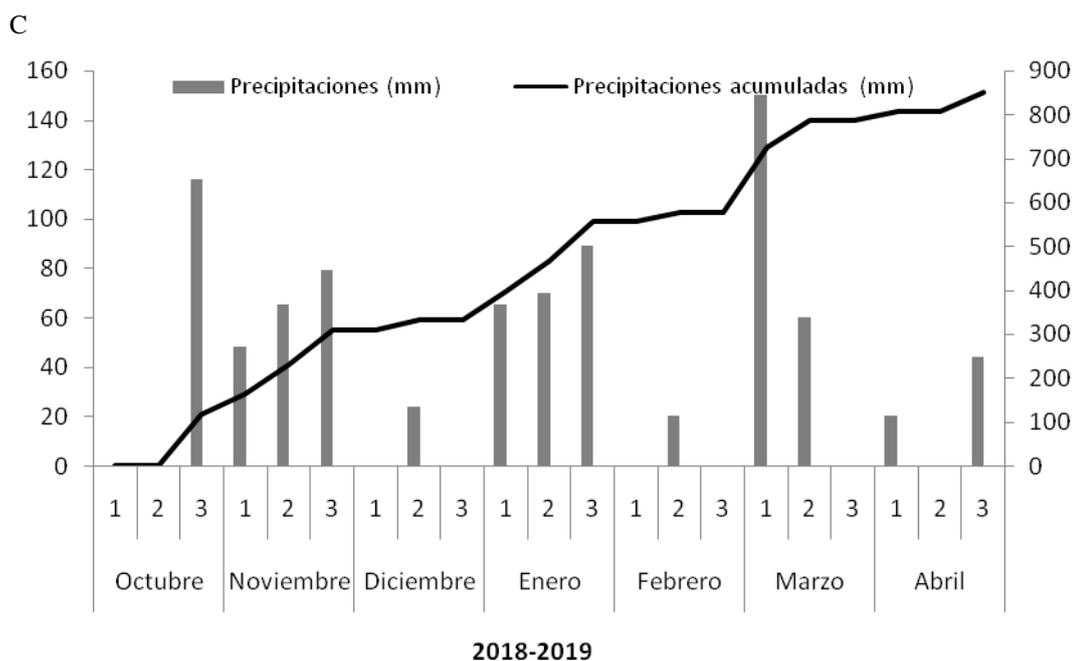


Figura 6: Precipitaciones (mm) registradas en los campos experimentales de Rio Cuarto (A) y La Aguada (B) en la campaña 2017-2018 y en el campo experimental de La Aguada (C) en la campaña 2018-2019.

6.2. Tratamientos

Los tratamientos aplicados en los ensayos a campo fueron:

- Plantas de maíz inoculadas con la cepa nativa *Serratia* sp. S119
- Plantas de maíz crecidas en suelos fertilizados con media dosis de fertilizantes químicos ($\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 100 kg ha^{-1}) e inoculadas con *Serratia* sp. S119
- Plantas de maíz crecidas en suelos fertilizados con dosis completa de fertilizante ($\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ - 200 kg ha^{-1})
- Plantas de maíz sin inocular y sin fertilizar

En los tratamientos fertilizados, la contribución de N se corrigió mediante la aplicación de UAN (fertilizante líquido que contiene urea y nitrato de amonio, 150 l ha⁻¹) en el momento de la siembra y en la etapa fenológica V6-V7.

Durante el ciclo del cultivo se aplicaron los fitosanitarios correspondientes al cultivo de maíz con el fin de disminuir el efecto adverso de malezas, plagas y enfermedades. Los fitosanitarios y fertilizantes químicos empleados, y las dosis aplicadas, son los comúnmente utilizados en los campos del área agrícola de Córdoba.

6.3. Preparación del inoculante

A partir de una colonia aislada de la bacteria nativa *Serratia* sp. S119 se sembró en medio líquido TY y se incubó a 28° C en agitador rotatorio (180 rpm) hasta alcanzar una concentración de 10⁹ UFC/ml. Posteriormente, el cultivo líquido se trasvasó a un Erlenmeyer estéril y se almacenó a 4° C hasta su utilización.

6.4. Determinación del efecto de la inoculación bacteriana en plantas de maíz

Al momento de la cosecha se evaluó el rendimiento final del cultivo y sus componentes numéricos principales (número de plantas y granos por unidad de superficie y peso de 100 granos). Además, se midió el contenido de P en tejidos aéreos de las plantas de maíz, como ya fue descrito anteriormente

(ver punto 4.5), y el contenido de N empleando el método de Kjeldahl modificado (Nelson y Sommers, 1973).

7. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados empleando el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba LSD Fisher para las comparaciones múltiples, utilizando el programa Infostat versión 2014 (Balzarini, *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios de coexistencia bacteriana

Se realizaron ensayos de coexistencia para evaluar si las bacterias analizadas podían ser utilizadas en inóculos mixtos en los ensayos en plantas. Los resultados obtenidos indicaron que hay coexistencia positiva tanto en medio TY como en YEMA y NFB entre las cepas bacterianas (Figura 7, Tabla 2).

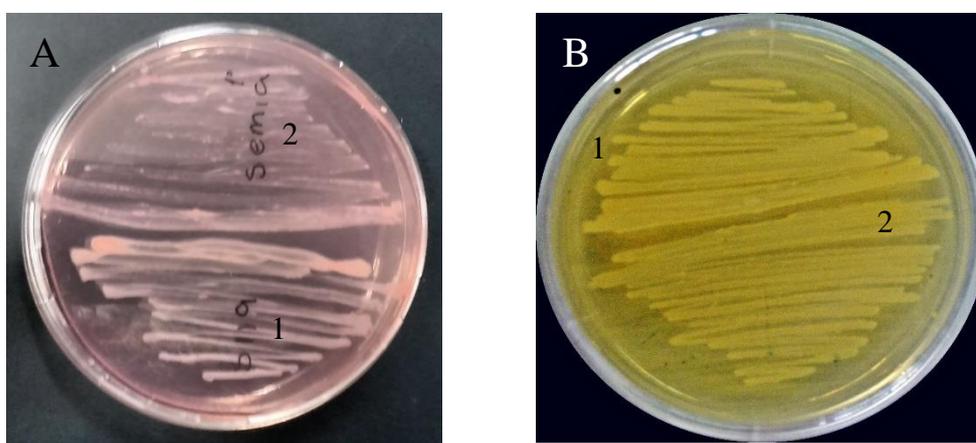


Figura 7: Ensayo de coexistencia entre las bacterias *Serratia* sp. S119 (1) y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (2) en medio YEMA (A) y *Serratia* sp. S119 (1) y *Azospirillum brasilense* Az 39 (2) en medio TY (B).

Tabla 2: Ensayos de coexistencia entre las cepas solubilizadoras de fosfatos y las cepas de referencia fijadoras de nitrógeno.

<i>Enterobacter</i> sp. J49 + <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	+
<i>Serratia</i> sp. S119 + <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	+
<i>Enterobacter</i> sp. J49 + <i>Azospirillum</i> brasilense Az 39	+
<i>Serratia</i> sp. S119 + <i>Azospirillum</i> brasilense Az 39	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PMT1 + <i>Azospirillum</i> brasilense Az 39	+

Los signos + indican coexistencias positivas entre las cepas.

2. Análisis del efecto de la inoculación bacteriana (simple y mixta) en el crecimiento y contenido de P de plantas de maní y maíz en ensayos en microcosmo

El efecto de la inoculación de las bacterias seleccionadas sobre el crecimiento de las plantas de maní y maíz se determinó a los 45 y 21 días postinoculación, respectivamente. Se analizaron diversos parámetros de crecimiento vegetal; y, además, se determinó el contenido de P en los tejidos vegetales.

2.1. Efecto las inoculaciones bacterianas en plantas de maní:

2.1.1. Longitud aérea y radical

Los resultados indican que las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. J49, *B.* sp. SEMIA 6144 y *Serratia* sp. S119 incrementaron significativamente la longitud aérea respecto a las plantas control sin inocular (Figura 8 A). Las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. J49 y *B.* sp. SEMIA 6144 presentaron también un aumento significativo en la longitud radical de las plantas de maní analizadas (Figura 8 B). Las inoculaciones mixtas no presentaron diferencias con respecto a las plantas control en ninguna de las dos variables.

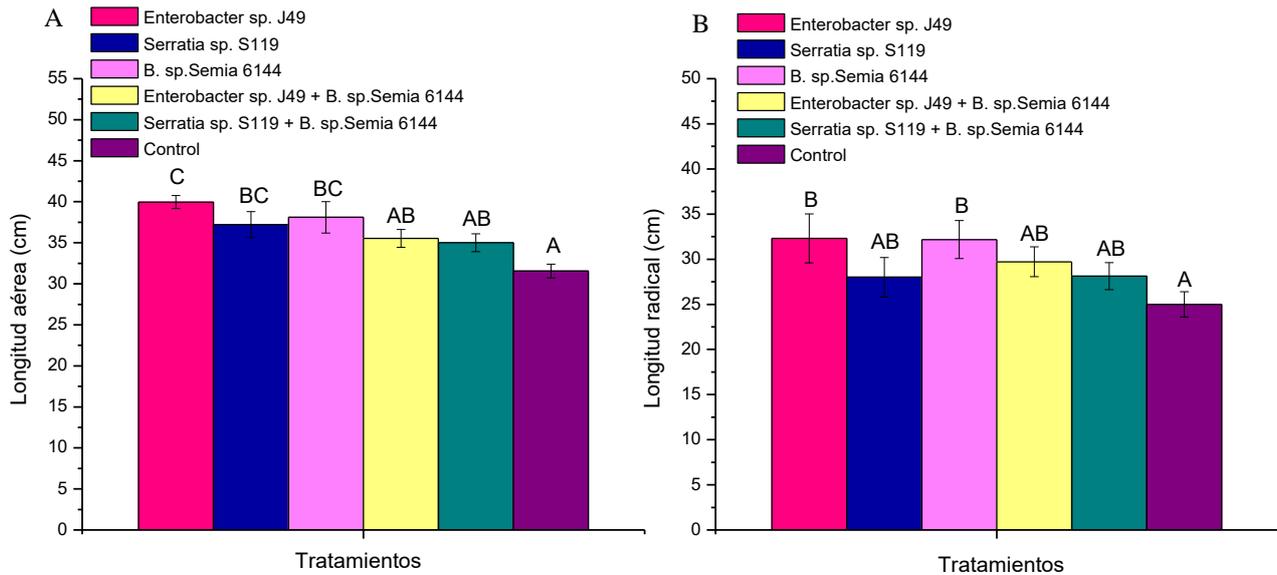


Figura 8: Longitud aérea (A) y radical (B) de las plantas de maní inoculadas con los tratamientos analizados a los 45 días postinoculación

2.1.2. Peso seco aéreo y radical

Los valores obtenidos en el peso seco aéreo de las plantas de maní a los 45 días de crecimiento no presentaron diferencia significativa con respecto al control sin inocular (Figura 9). Por otro lado, el peso seco radical de las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. J49 mostró un aumento significativo respecto a las plantas control.

Considerando que la adquisición de nutrientes del suelo está influenciada por el crecimiento radical y su interacción con los componentes bióticos y abióticos del mismo, los incrementos en la longitud y peso seco radical en las plantas de maní inoculadas *Enterobacter* sp. J49 son altamente prometedores. Estos resultados de promoción del crecimiento vegetal en plantas de maní inoculadas con esta cepa bacteriana coinciden con trabajos previos realizados en el laboratorio (Anzuay *et al.*, 2015, 2017). En particular este trabajo se

analizaron inoculaciones simples con estas cepas nativas y en consorcio con una cepa comercial, utilizada para el cultivo de maní, empleando como soporte suelo del área agrícola Argentina con bajo contenido de fósforo.

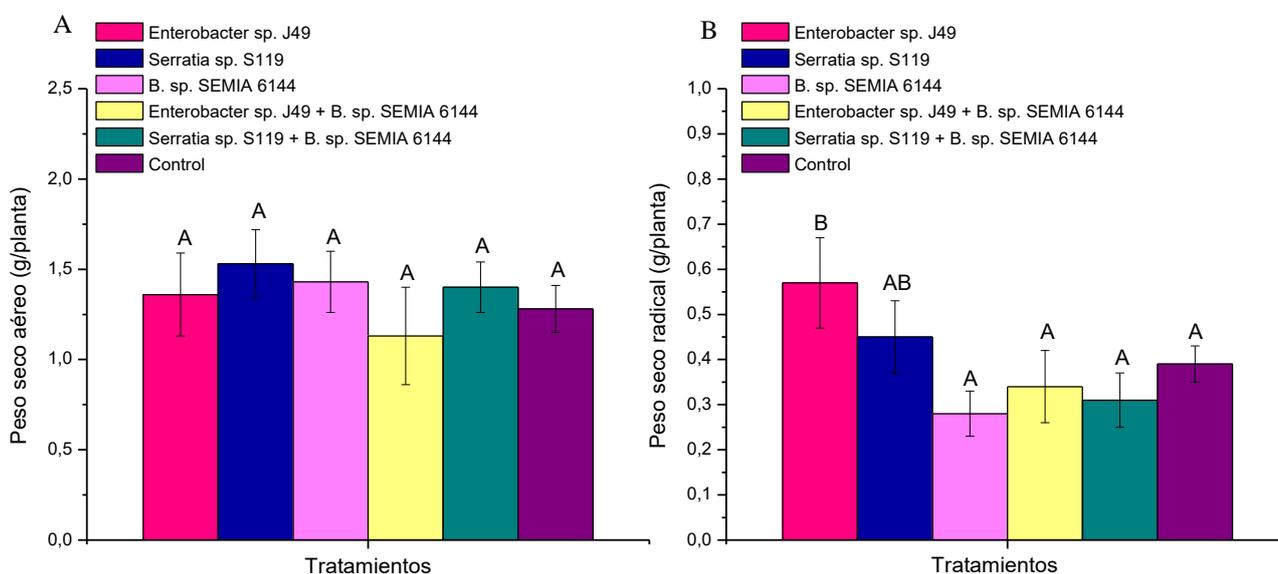


Figura 9: Peso seco aéreo (A) y radical (B) de las plantas de maní inoculadas con los tratamientos analizados a los 45 días postinoculación

2.1.3. Contenido de P aéreo y radical

Los resultados obtenidos de la cuantificación de P en la parte aérea de las plantas de maní indican incremento significativo en las plantas inoculadas con *Enterobacter sp. J49* y con ambas inoculaciones mixtas (*Enterobacter sp. J49* + *B. sp. SEMIA 6144* y *Serratia sp. S119* + *B. sp. SEMIA 6144*) respecto a plantas sin inocular (Figura 10 A). Por su parte, los tratamientos *Enterobacter sp. J49*, *B. sp. SEMIA 6144* y la inoculación mixta *Serratia sp. S119* + *B. sp. SEMIA 6144* aumentaron significativamente el contenido de P radical en las plantas de maní con respecto a las plantas control (Figura 10 B).

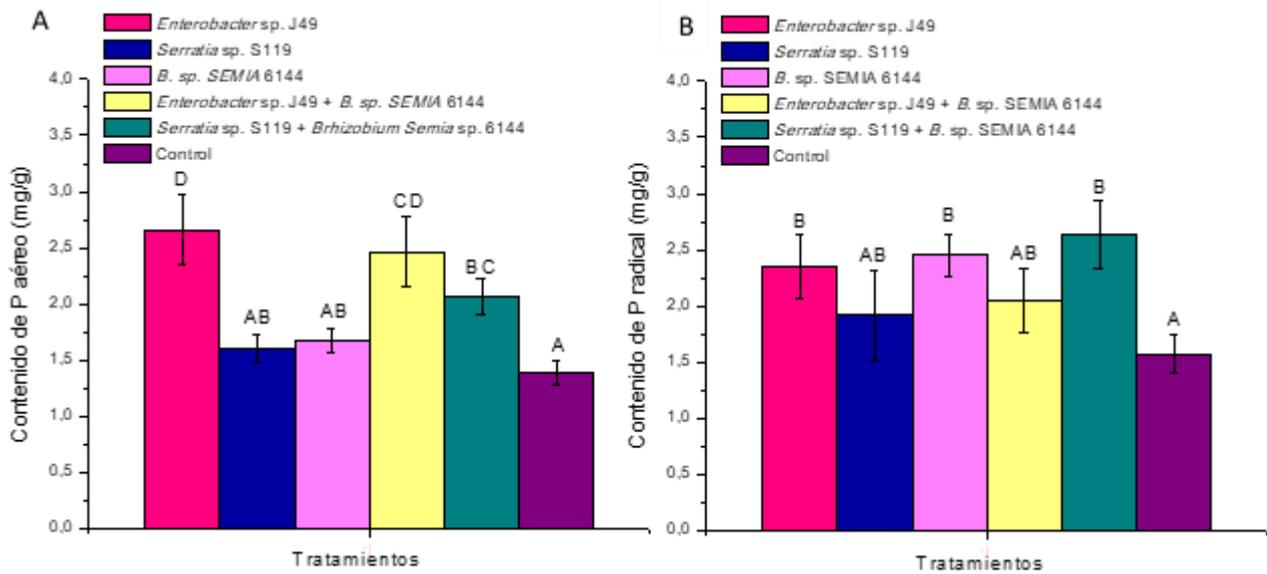


Figura 10: Contenido de fósforo aéreo (A) y radical (B) de las plantas de maní inoculadas con los tratamientos analizados a los 45 días postinoculación

En general, fue posible observar que los tratamientos con inoculaciones simples fueron más eficientes que los de inoculaciones mixtas, en las variables analizadas. Los resultados más alentadores se observaron con el tratamiento *Enterobacter* sp. J49. La inoculación individual con esta cepa en plantas de maní presentó promoción del crecimiento en 3 de los 4 parámetros evaluados e incrementó el contenido de P en tejidos vegetales aéreos y radicales. Como se mencionó anteriormente, esta bacteria posee capacidad solubilizadora y mineralizadora de fosfato y el suelo empleado como soporte para este ensayo en microcosmo posee bajo contenido de P disponible. Así, estos resultados sugieren que la promoción del crecimiento de las plantas de maní inoculadas con *Enterobacter* sp. J49 podría estar relacionada con el mecanismo de solubilización-mineralización de fosfato.

Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios en los cuales se aplicaron BSP en plantas de interés agrícola. Khanna *et al.* (2012) reportó que la utilización de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato (pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*) co-inoculadas con *Rhizobium*, incrementaron el crecimiento de plantas de lentejas, tanto en consorcio como individualmente. Por su parte, Masciarelli *et al.*, (2013), en tratamientos con inoculaciones mixtas y simples con *B. japonicum* y *B. amyloliquefaciens*, observaron incrementos en el crecimiento de plantas de soja. Así también Walpola y Yoon (2013) inoculando dos BSP (*Pantoea agglomerans* y *Burkholderia anthina*) observaron efectos promotores en el crecimiento de plantas de tomate. Por su parte, la inoculación simple con una BSP incrementó el crecimiento de la vid (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) en condiciones de invernadero (Liu *et al.*, 2016). En el caso particular de maní, la inoculación de esta leguminosa con BSP ha mostrado resultados alentadores (Mudalagiriappa *et al.*, 1997; Dey *et al.*, 2004, Taurian *et al.*, 2013, Azuay *et al.*, 2015). Recientemente, Jiang *et al.* (2018) analizaron inoculaciones simples con BSP en condiciones de estrés salino (*Bacillus megaterium*, *Enterobacter* sp., *Providencia rettgeri* y *Ensifer adhaeren*) y observaron promoción del crecimiento en plantas de maní.

2.2 Efecto de los tratamientos bacterianos en plantas de maíz

2.2.1. Longitud aérea y radical

Fue posible observar que la mayoría de las inoculaciones simples y mixtas de las bacterias analizadas en plantas de maíz incrementaron significativamente la longitud aérea y radical, respecto al tratamiento control sin inocular (Figura 11).

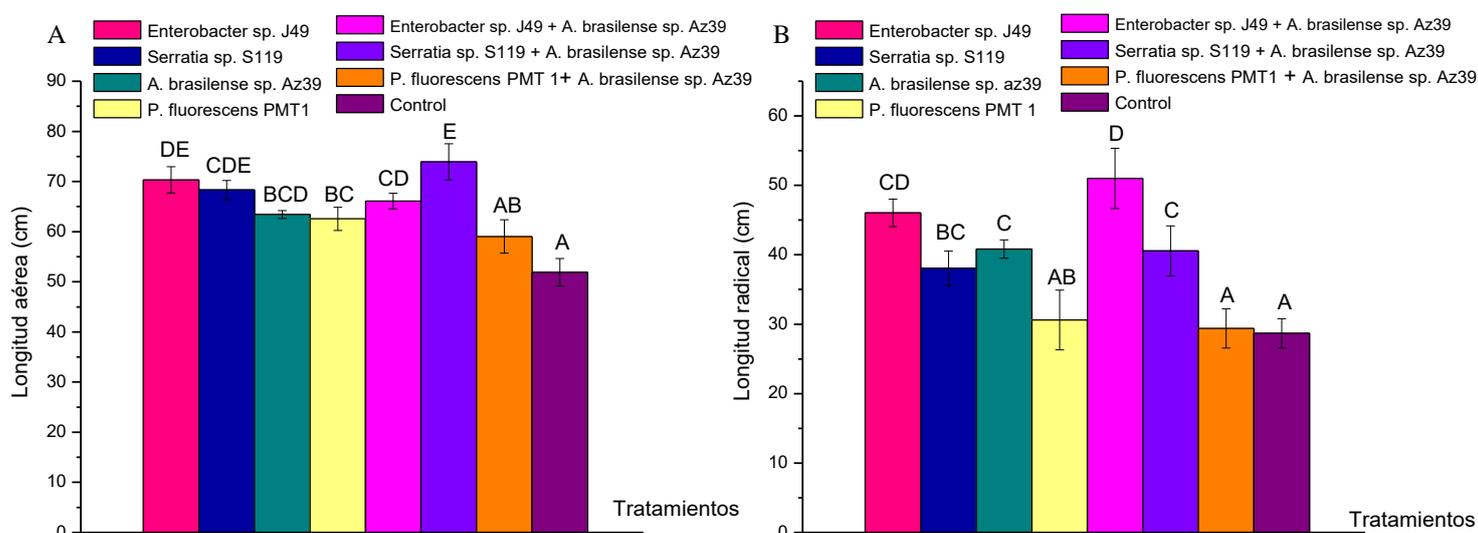


Figura 11: Longitud aérea (A) y radical (B) de las plantas de maíz inoculadas con los tratamientos analizados a los 21 días postinoculación

2.2.2. Peso seco aéreo y radical

Los resultados en el peso seco aéreo de las plantas indican que las plantas de maíz inoculadas con tres de los tratamientos analizados (*Serratia* sp. S119, *Enterobacter* sp. J49 y *Serratia* sp. S119 + *A. Brasilense* sp. az 39) presentaron un aumento significativo respecto al control. Por otro lado, fue posible observar que el peso seco radical presentó incrementos significativos cuando las plantas de maíz fueron inoculadas con *Serratia* sp. S119 y *Enterobacter* sp. J49 + *A. Brasilense* sp. Az 39 (Figura 12).

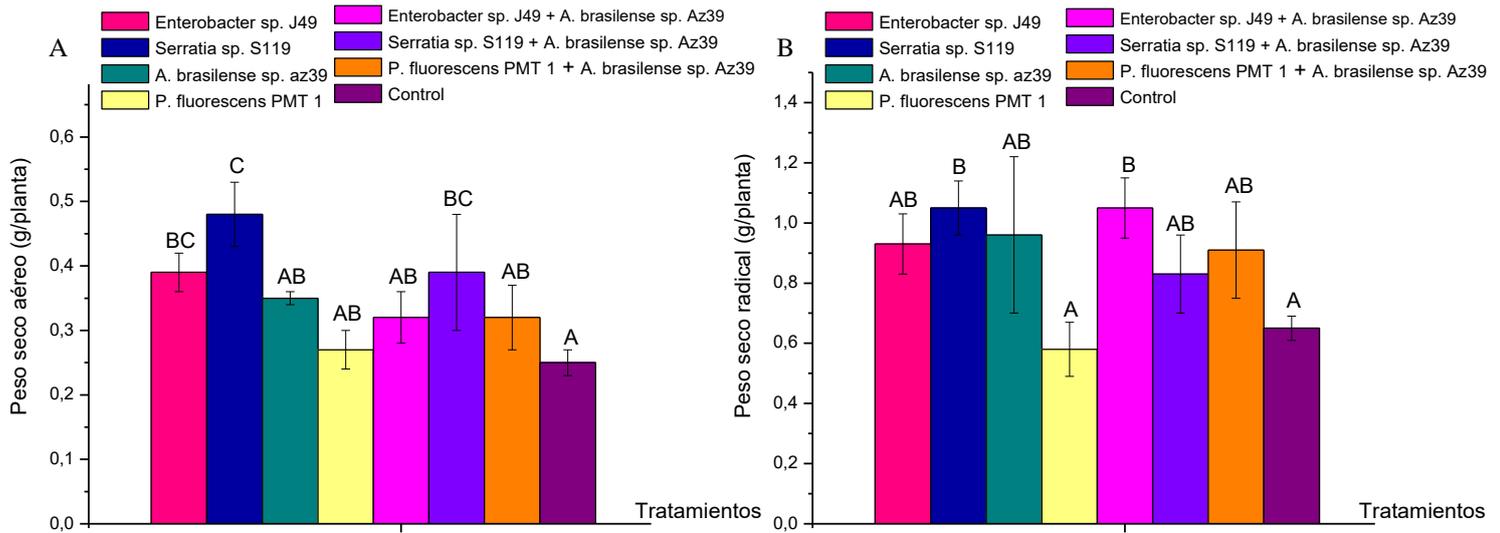


Figura 12: Peso seco aéreo (A) y radical (B) de las plantas de maíz inoculadas con los tratamientos analizados a los 21 días postinoculación

2.2.3 Contenido de P aéreo y radical

Las plantas de maíz inoculadas con *Enterobacter* sp. J49, *Serratia* sp. S119 y *Serratia* sp. S119 + *A. brasilense* sp. Az39 aumentaron significativamente el contenido de P radical con respecto a las plantas sin inocular (Figura 13).

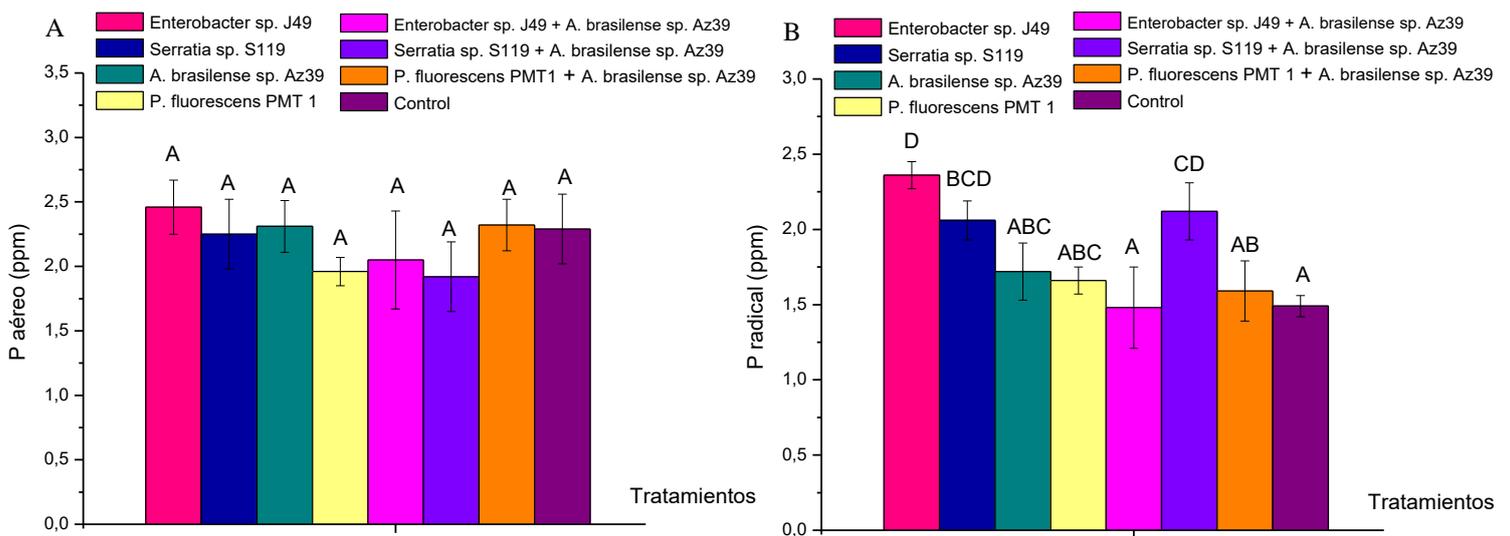


Figura 13: Contenido de fósforo aéreo (A) y radical (B) de las plantas de maíz inoculadas con los tratamientos analizados a los 21 días postinoculación.

En general, las plantas de maíz inoculadas con tratamientos simples y mixtos presentaron promoción en los parámetros de crecimiento vegetal evaluados y en el contenido de P vegetal. Los resultados indican que las inoculaciones simples con las cepas nativas *Serratia* sp. S119 y *Enterobacter* sp. J49 fueron más eficientes en la promoción del crecimiento que las cepas comerciales utilizadas habitualmente en el cultivo de maíz. Además, los resultados indican que las inoculaciones simples con las bacterias nativas *Serratia* sp. S119 y *Enterobacter* sp. J49, presentaron los resultados más alentadores en plantas de maíz. Dentro de estas, el tratamiento con la cepa *Serratia* sp. S119 mostró incrementos significativos en todos los parámetros de crecimiento vegetal evaluados e incrementó el contenido de P en tejidos radicales de las plantas de maíz. Resulta interesante destacar que la inoculación simple y mixta de esta cepa nativa incremento de manera significativa las variables analizadas en estas plantas.

La adquisición de nutrientes es llevada a cabo por las raíces, así el incremento en la longitud y el peso seco de las plantas inoculadas sería beneficioso. De esta manera, el incremento en el contenido de P de los tejidos vegetales sugiere que las inoculaciones bacterianas aumentarían la disponibilidad de este mineral, favoreciendo la incorporación del mismo por las plantas. Kudoyarova *et al.* (2017) reportaron que el empleo de BSP, en plantas de trigo, incrementó la masa del tejido aéreo y radical y el contenido de P radical. Abassy y Manzoor, (2018) demostraron que la inoculación con BSP en maíz

produjo un aumento en la biomasa de las plantas y el contenido de P del suelo. Otros autores también han reportado promoción del crecimiento en plantas de maíz y maní inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfatos nativas de suelos en ensayos a campo y microcosmo, respectivamente (Viruel *et al.*, 2014; Pradhan, 2017).

3. Efecto de la inoculación bacteriana en el aporte de P en plantas de maní y maíz en diferentes estadios fenológicos

Se realizaron ensayos en microcosmo de plantas de maní y maíz inoculadas con las cepas nativas *Serratia* sp. S119 y *Enterobacter* sp. J49 en las cuales se midieron parámetros de crecimiento vegetal y contenido de P de tejidos aéreos y radicales en distintos estadios fenológicos de las plantas. Estas variables fueron medidas cada 10 días durante un período de 60 días en ambas plantas. Este análisis se realizó para intentar establecer el requerimiento de P en las primeras etapas del desarrollo vegetal y además el tiempo en el cual comienza a observarse el efecto de la inoculación bacteriana en el aporte de este nutriente y en el crecimiento de las plantas analizadas.

3.1. Efecto de la inoculación con BSP sobre los parámetros de crecimiento y contenido de P en plantas de maní durante los primeros estadios de crecimiento vegetal

Fue posible observar que a partir de los 10 días postinoculación las plantas tratadas con la cepa *Serratia* sp. S119 presentaron un incremento significativo

en la longitud aérea respecto a las plantas control. Dicho incremento significativo se mantuvo durante los 20 y 60 días postinoculación. Por otro lado, las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. J49 mostraron incremento significativo en este parámetro, a los 20 días postinoculación y se mantuvo, aunque sin presentar diferencia significativa con las plantas control (Figura 14 A). Por su parte, la longitud radical de las plantas de maní, inoculadas con ambas cepas analizadas, incrementaron significativamente este parámetro a partir de los 10 días postinoculación, y dicho aumento fue mantenido en el tiempo, mostrando diferencias significativas, a los 20 y 50 días postinoculación comparados con las plantas sin inocular (Figura 14 B).

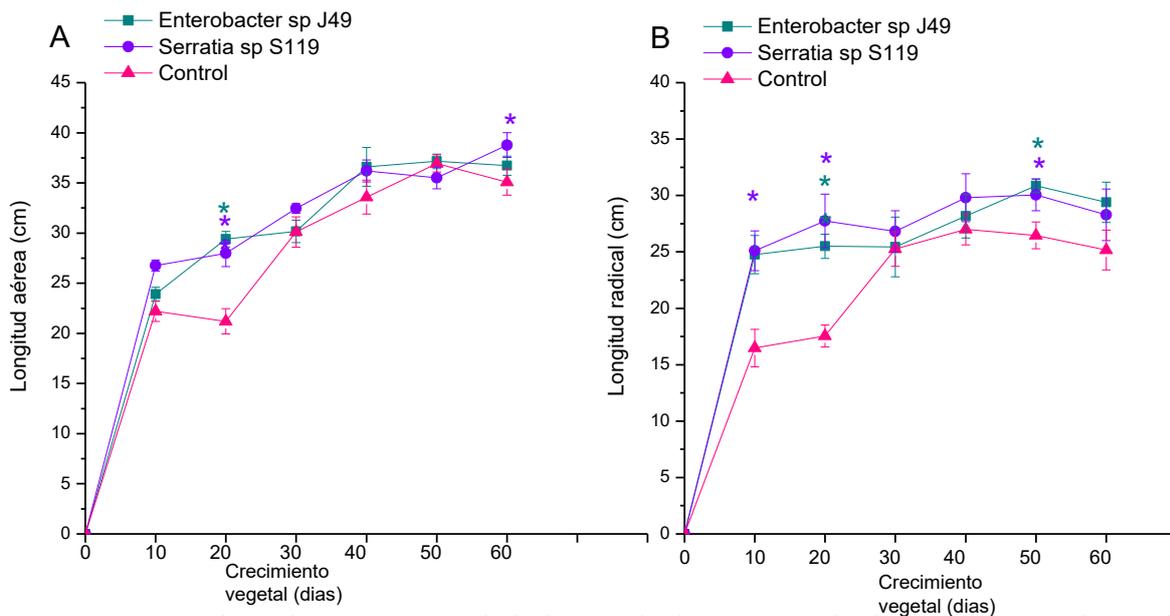


Figura 14: Cinética de crecimiento de la longitud aérea (A) y radical (B) de plantas de maní. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Fue posible observar incrementos significativos, con respecto a las plantas control, en el peso seco aéreo y radical de las plantas inoculadas con

Enterobacter sp. J49 a partir de los 20 días y se mantuvo hasta los 40 días postinoculación (Figura 15).

En general, de las dos cepas nativas analizadas, la inoculación con la cepa nativa *Enterobacter* sp. J49 fue eficiente en plantas de maní; al igual que lo observado en el punto anterior y en resultados previos del laboratorio (Anzuay *et al.*, 2015, 2017). En este ensayo, en las plantas inoculadas con esta cepa nativa, se observó promoción en todos los parámetros de crecimiento vegetal a partir de los primeros estadios analizados (10–20 días postinoculación).

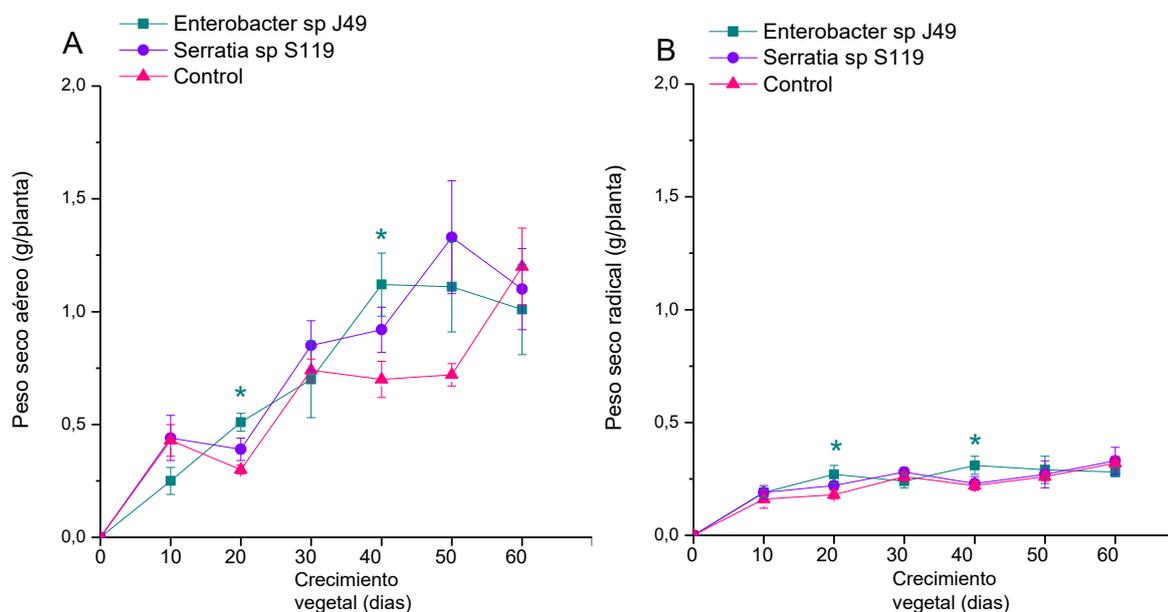


Figura 15: Cinética de crecimiento de peso seco aérea (A) y radical (B) de plantas de maní. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Fue posible observar que el contenido de P de las plantas de maní presentó los valores más elevados a los 20 días en tejidos aéreos y a los 30 días en tejidos radicales. Todos los tratamientos mostraron una disminución en el contenido de P aéreo a los 50 días y de P radical a los 40 días postinoculación (Figura 16). Esto podría deberse a que las plantas de maní aproximadamente

a los 45 días comienzan la etapa de floración, y en ella los nuevos órganos requieren de grandes cantidades de nutrientes tales como el fósforo.

Las plantas inoculadas con *Serratia* sp. S119 presentaron incrementos significativos en el contenido de P aéreo a los 10 días postinoculación; dicho aumento fue mantenido en el tiempo, presentando diferencia significativa a los 50 días postinoculación, con respecto a las plantas control. Ambas cepas nativas, mostraron incrementos significativos en el contenido de P de tejidos aéreos a los 50 días y a los 40 días en el tejido radical, respecto a las plantas sin inocular. Así, la inoculación con BSP analizadas podría contribuir a aportar P en las plantas de maní cuando estas se encuentran en períodos críticos de necesidad de este nutriente.

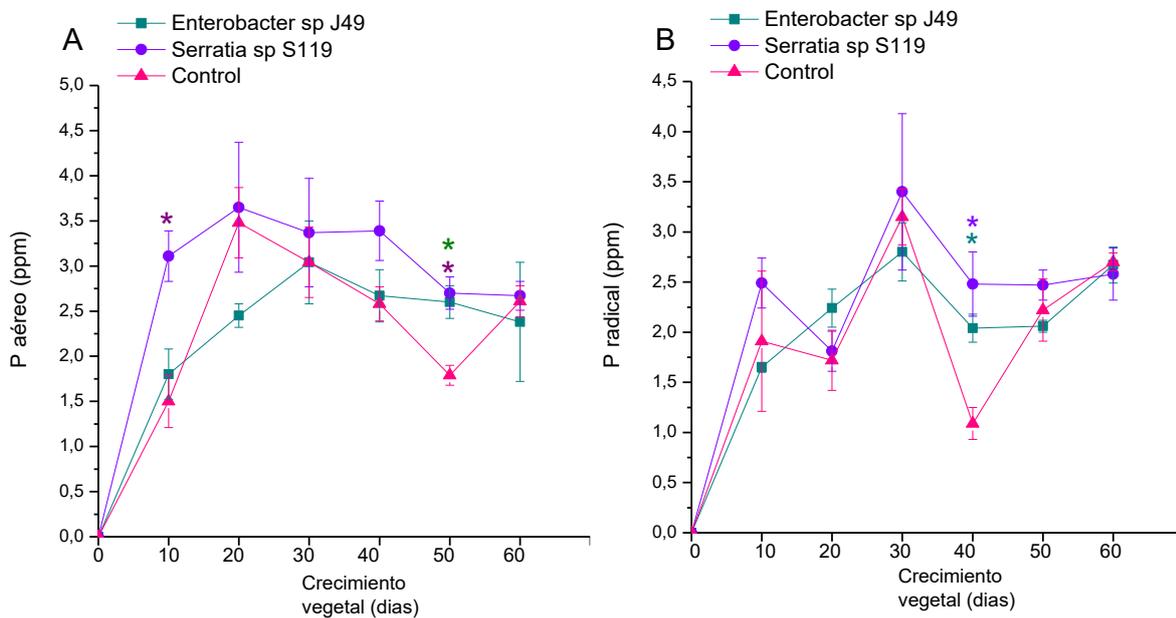


Figura 16: Cinética de crecimiento contenido de P aéreo (A) y radical (B) de plantas de maní. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Los resultados del contenido de P de suelos de las macetas (soporte) no indican diferencias significativas respecto a las plantas control (Figura 17). Estos resultados sugieren que las bacterias en el soporte no dejarían excedente de P. Sin embargo, las plantas de maní inoculadas con ambas bacterias incrementaron los parámetros de crecimiento y el contenido de P de los tejidos vegetales en la mayoría de los tiempos analizados. Ello sugiere que el P solubilizado por las bacterias, ya no se encontraría en el soporte y habría sido utilizado por las plantas para su desarrollo.

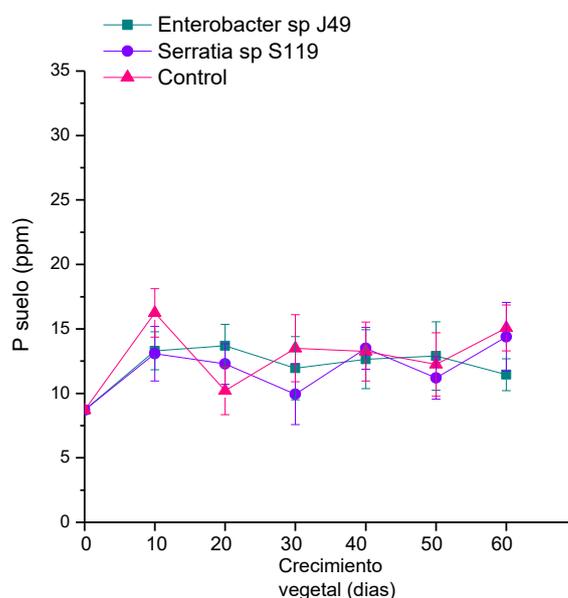


Figura 17: Cinética de contenido de P de suelo de macetas con plantas de maní. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Las inoculaciones con ambas cepas nativas mostraron incrementar las variables analizadas. Como se mencionó anteriormente los resultados fueron más alentadores en plantas inoculadas con la cepa *Enterobacter* sp J49. Estos resultados coinciden con lo observado en ensayos en microcosmo y a campo (Anzuay *et al.*, 2019, trabajo en preparación). Los resultados de este trabajo

indican que el efecto de la inoculación con esta cepa comienza en los estadios iniciales de crecimiento; incrementando en plantas de maní su crecimiento y el contenido de P en tejidos aéreos y radicales. Considerando lo expuesto es factible proponer a la cepa nativa *Enterobacter* sp. J49 como potencial bioinoculante para ser empleado en plantas de maní.

3.2 Efecto de la inoculación con BSP sobre los parámetros de crecimiento y contenido de P en plantas de maíz

La longitud aérea en plantas de maíz presentó un crecimiento exponencial a partir de los 10 días. No fue posible observar diferencias entre las plantas inoculadas y control. Las inoculaciones con ambas cepas analizadas, principalmente con *Enterobacter* sp. J49, presentaron incrementos significativos en la longitud radical, a los 60 días postinoculación, respecto a las plantas sin inocular (figura 18).

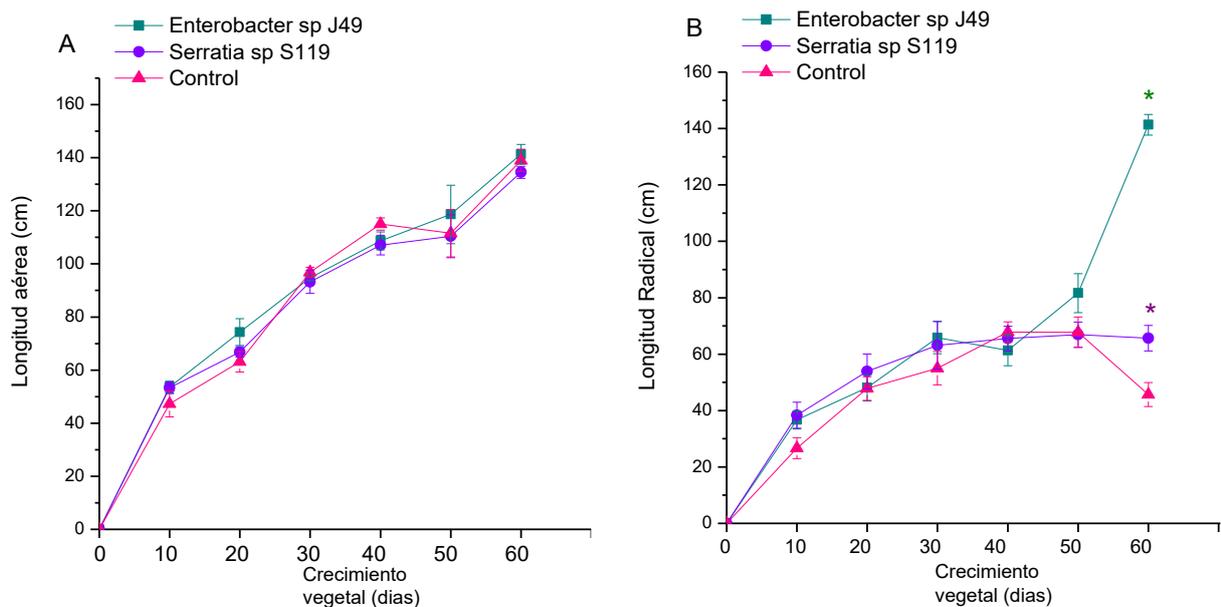


Figura 18: Cinética de crecimiento de Longitud aérea (A) y radical (B) de plantas de maíz. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Fue posible observar que las plantas de maíz inoculadas con la cepa *Enterobacter* sp. J49 presentaron un incremento significativo en el peso seco aéreo, respecto al control, a partir de los 40 manteniéndose hasta los 60 días postinoculación. En este último tiempo analizado las plantas inoculadas con ambas cepas presentaron diferencias significativas respecto a las plantas sin inocular. Las inoculaciones con *Serratia* sp. S119 incrementaron significativamente el peso seco radical a partir de los 10 días postinoculación. Este efecto se mantuvo hasta los 40 días, tiempo en el cual esta cepa y *Enterobacter* sp. J49 aumentaron significativamente este parámetro (Figura 19).

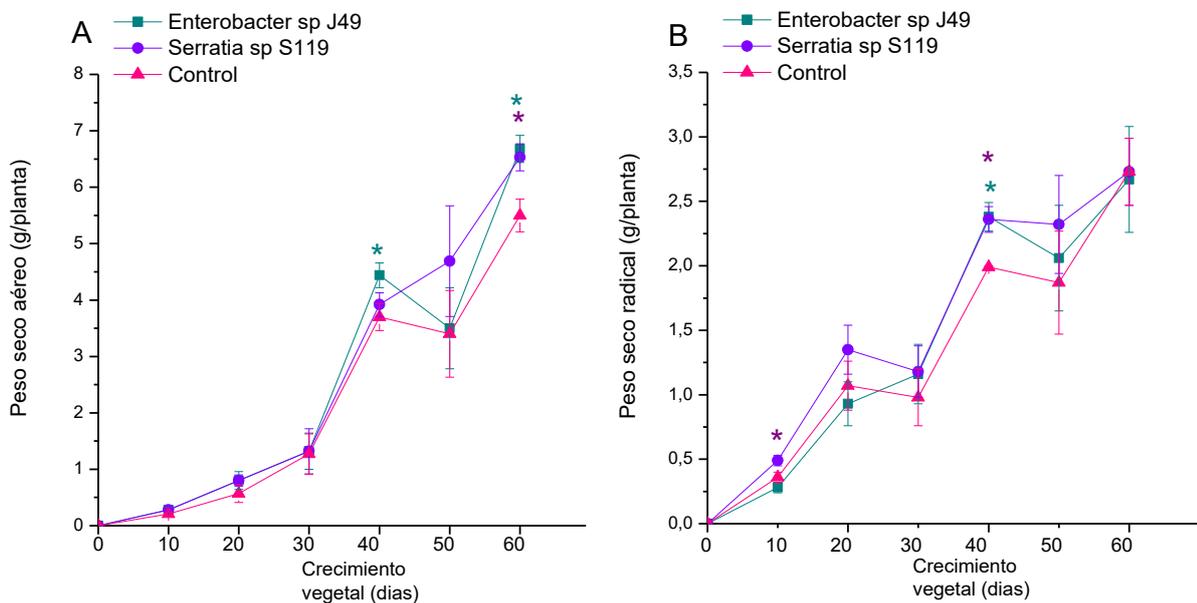


Figura 19: Cinética de crecimiento de peso seco aérea (A) y radical (B) de plantas de maíz. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

El contenido de P de los tejidos vegetales de plantas de maíz no mostró diferencias significativas, en ninguno de los estadios de crecimiento vegetal con los tratamientos analizados, respecto a las plantas control, (Figura 20).

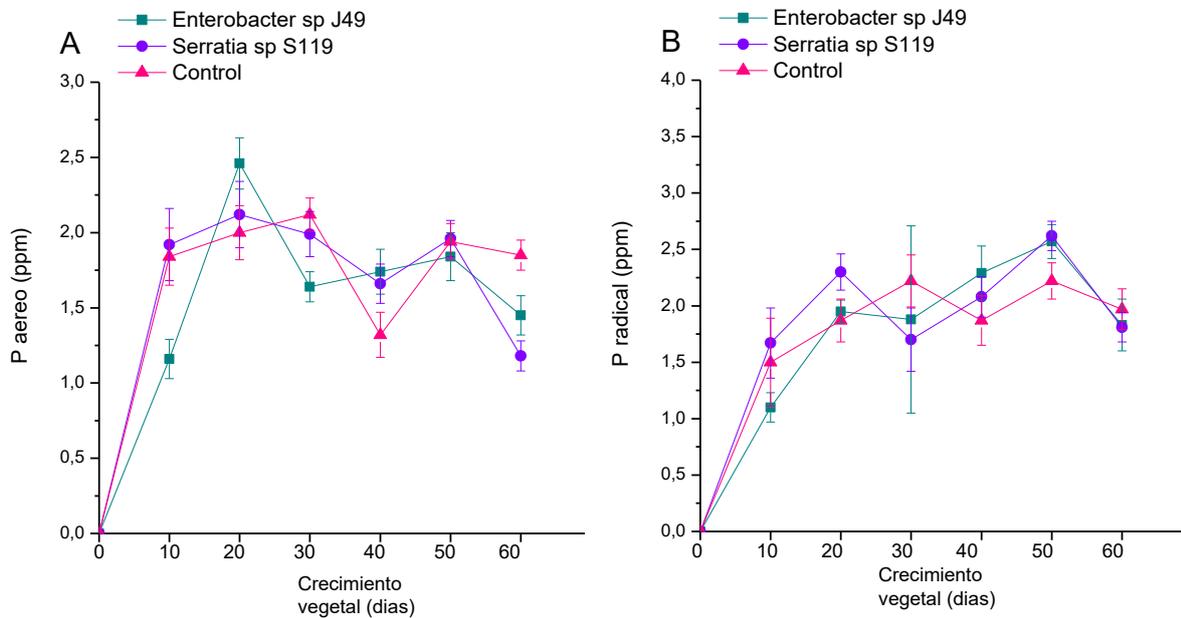


Figura 20: Cinética de crecimiento contenido de P aérea (A) y radical (B) de plantas de maíz. *: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Al igual que lo observado en el contenido de P del suelo (soporte) de las plantas de maní, el soporte en las plantas de maíz no presentó diferencias significativas respecto a las plantas control en esta variable (Figura 21).

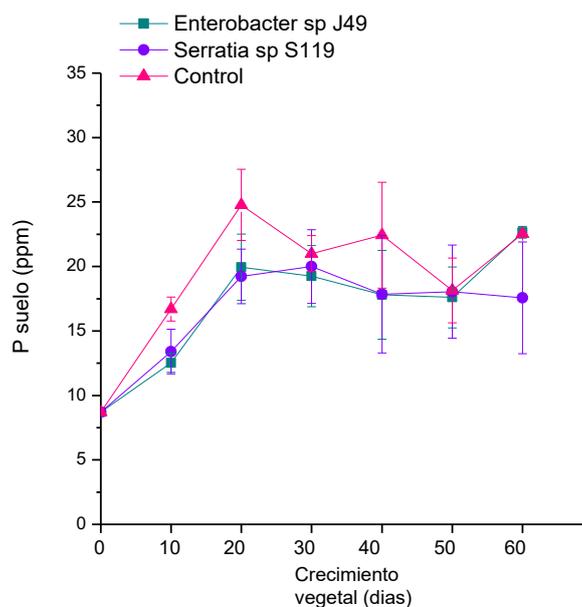


Figura 21: Cinética de crecimiento contenido de P de suelo de macetas con plantas de maíz.
*: Indica diferencia significativa $p > 0,05$ respecto al tratamiento control en cada tiempo analizado

Fue posible observar, respecto al valor de P inicial en el soporte, que el contenido de P en las macetas incrementó en presencia de ambas plantas analizadas. Sin embargo, los valores de P más elevados se observaron en suelo proveniente de macetas que contenían plantas de maíz, con respecto de aquellas con plantas de maní. Como se mencionó anteriormente, el requerimiento de este nutriente para el crecimiento de plantas de maíz es superior a los valores de P necesarios para las plantas de maní.

Estos incrementos en la concentración de P en el suelo podrían estar asociados a la liberación de exudados radicales (ER). La concentración de P en la rizósfera podría modular la composición de los ER. Chaparro *et al.*, (2012) informaron que la composición y concentración de los mismos puede variar de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, entre otros factores. Además, los microorganismos presentes en la rizósfera también podrían, mediante la

solubilización y mineralización de fosfatos, incrementar los valores de este nutriente en el soporte. Kudoyarova *et al.* (2017) analizaron el efecto de BSP en suelos con presencia y ausencia de plantas y observaron que cuando en el sustrato se encontraban solo bacterias se incrementaba el contenido de P del soporte. Contrariamente, cuando en el sustrato además de bacterias se encontraban plantas, observaron una disminución en el contenido de P del soporte. Esto sugiere, al igual que lo observado en nuestro trabajo, que las BSP aportarían P al soporte y que el mismo sería incorporado y utilizado por las plantas para su crecimiento.

En general, en plantas de maní fue posible observar que las inoculaciones bacterianas promovieron los parámetros de crecimiento analizados en los primeros estadios (10, 20 días postinoculación), manteniendo esta promoción hasta finalizar el ensayo. Por otro lado, en plantas de maíz las inoculaciones con las cepas nativas promovieron tales parámetros a partir de los últimos tiempos evaluados (40, 50, 60 días post inoculación).

4. Efecto de la aplicación de inoculantes biológicos y fertilizantes sobre el rendimiento del cultivo de maíz en ensayos a campo

El efecto beneficioso observado en el crecimiento de plantas de maíz inoculadas con *Serratia* sp. S119 (resultados descritos en los puntos 2 y 3) motivó seleccionar esta cepa para realizar ensayos a campo y analizar el efecto de la inoculación de la misma sobre el rendimiento de este cultivo. Además,

resultó interesante analizar el contenido de P de las plantas obtenidas en el ensayo a campo a los efectos de establecer una posible correlación entre este parámetro y la capacidad solubilizadora de fosfato de la bacteria empleada. A tal efecto, se analizó la aplicación de un bio-inoculante, basado en esta cepa, con diferentes dosis de fertilizantes químicos sobre el rendimiento del cultivo de maíz en la campaña 2017-2018 en dos campos experimentales de manera simultánea y en la campaña 2018-2019.

4.1. Campaña 2017/2018: Rendimientos de maíz inoculado con *Serratia* sp. S119 en los campos experimentales de La Aguada y Río Cuarto.

Entre los componentes numéricos analizados, el peso de 100 granos es una variable de relevancia a analizar (Viruel, 2014, Zamudio- Gonzales *et al.*, 2015). Este parámetro presentó incrementos significativos, respecto a las plantas control, en las plantas de maíz inoculadas con la cepa nativa *Serratia* sp. S119 en el campo experimental de La Aguada; mientras que, en el campo de Río Cuarto todos los tratamientos incrementaron el mismo (Figura 22).

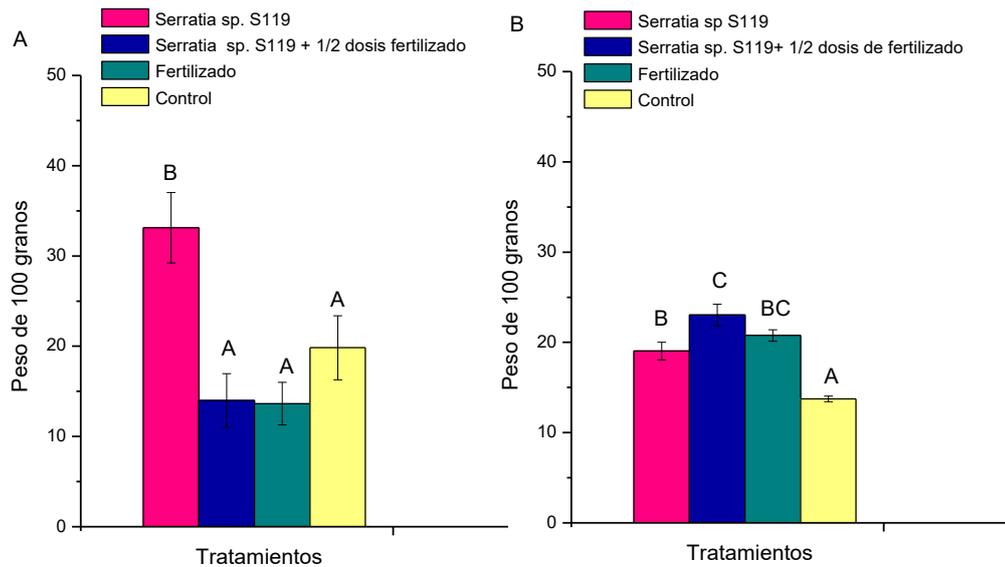


Figura 22: Peso de 100 granos de plantas de maíz, al momento de la cosecha, inoculadas y fertilizadas en el campo experimental de La Aguada (A) y Río Cuarto (B). Las letras indican diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de la misma campaña analizada.

Fue posible observar que el rendimiento de las plantas de maíz inoculadas con la cepa *Serratia* sp. S119 en el campo de La Aguada presentaron incrementos significativos (227%) respecto a las plantas sin inocular y sin fertilizar (Figura 23 A). Por su parte, en el campo de Río Cuarto todos los tratamientos incrementaron significativamente el rendimiento de las plantas de maíz respecto a las plantas control (Figura 23 B). En este campo, el aumento más destacado se observó en el rendimiento de las plantas de maíz crecidas en suelos inoculados con *Serratia* sp. S119 + media dosis de fertilizantes (23%). Además, las plantas inoculadas con la cepa *Serratia* sp. S119 presentaron un incremento del 3%. Resultados similares fueron reportados por Kaur *et al.* (2014) quienes observaron una mejora en el rendimiento de maíz y trigo, como resultado de la inoculación con microorganismos solubilizadores de fosfatos.

Estos autores además reportaron que la utilización de BSP con aplicación de una fuente fosforada al sustrato presentó efectos beneficiosos.

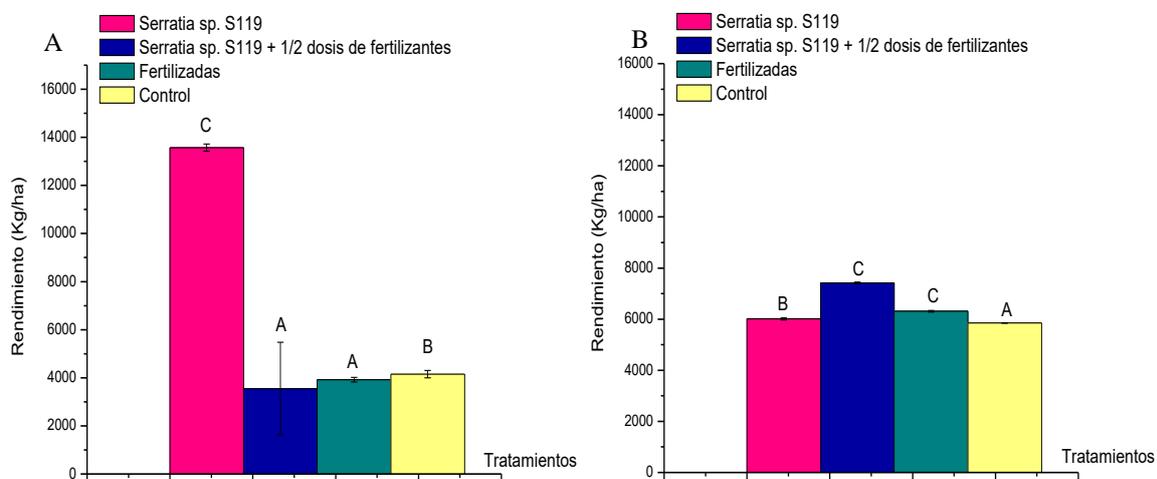


Figura 23: Rendimiento (Kg/ha) de plantas de maíz, al momento de la cosecha, inoculadas y fertilizadas en el campo experimental de La Aguada (A) y Río Cuarto (B). Las letras indican diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos de la misma campaña analizada.

En general, los rendimientos observados en la campaña 2017/2018 fueron inferiores a los observados habitualmente en el área agrícola Argentina. Estos resultados posiblemente se deban a las condiciones de sequía que se produjeron durante esta campaña. El agua es vitalmente necesaria para cada organismo en una cantidad específica, por lo que, cualquier déficit hídrico impone condiciones de estrés. El estrés por sequía es una de las condiciones naturales que más afecta la productividad agrícola en la provincia de Córdoba (Fernández *et al.*, 2017).

Los incrementos en el rendimiento observados con el tratamiento *Serratia sp.* S119, respecto al tratamiento control, en el campo experimental de Río Cuarto no fueron tan marcados como en el campo experimental de La Aguada. Esto

podría deberse a que en el campo de Río Cuarto el suelo no presentaba un marcado déficit de P. Por su parte, los tratamientos de fertilización e inoculación presentaron incrementos significativos respecto al control. Por otro lado, en el campo de La Aguada, el suelo es nutricionalmente pobre, presentando un bajo contenido de P disponible, lo cual podría explicar la correlación entre la inoculación con la cepa nativa, eficiente solubilizadora y mineralizadora de fosfato, y el incremento significativo observado en el rendimiento del cultivo de maíz en el mismo. La limitación de P del sustrato promueve la solubilización de fosfatos insolubles por parte de las bacterias (Pineda, 2014). Además, las PGPB pueden conferir tolerancia a sequía a través de múltiples mecanismos, entre ellos la síntesis de auxinas (Acido indolacético (AIA)) y 1-amilociclopropano-1-carbocilato desaminasa (ACCd) (Glick, 1995). *Serratia* sp. S119 además de presentar una eficiente capacidad de solubilización de fosfato, posee capacidad de producción de AIA y actividad ACCd (datos no publicados). Este último mecanismo es el más estudiado en las bacterias involucradas en la tolerancia a la sequía por las plantas. La enzima ACCd descompone al ACC que es el precursor intermediario de etileno a α -acetobiturato y amoniaco, resultando en la disminución de los niveles de esta hormona en las plantas, lo que reanuda el crecimiento de tallo y raíz (R.Glick, 2014). Por lo tanto, la hormona vegetal etileno permanece por debajo de los niveles inhibitorios de crecimiento y contribuye al crecimiento de la raíz y así, a la eficiencia en la adquisición de agua por parte de la planta huésped (Glick

2004, Berg 2009, Grover 2011). Por otro lado, las auxinas están involucradas en el geotropismo y fototropismo, diferenciación del tejido vascular, dominancia apical, iniciación radical (lateral y adventicia), división celular y elongación de tallo y raíz (Grobela *et al.*, 2015). El AIA de origen bacteriano aumenta el área y la longitud de la superficie de la raíz, y por lo tanto proporciona a la planta un mayor acceso a los nutrientes del suelo y a la absorción de agua (Vessey 2003; Ali *et al.*, 2010). Saleem *et al.*, (2018) demostraron que la disminución del contenido de ACC en el tejido vegetal, con la posterior inhibición de la liberación de etileno, en plantas inoculadas con rizobacterias que producen ACC desaminasa y AIA, incrementaron la tolerancia al estrés por sequía en frijol terciopelo. Además de la producción de fitohormonas, la capacidad de fijación de N₂ y la capacidad de solubilización de fosfato de las bacterias PGPB han mostrado efectos positivos sobre el crecimiento y el rendimiento de varios cultivos como el trigo, la soja y la remolacha azucarera (Cattelan *et al.*, 1999; Ozturk *et al.*, 2003; Salantur 2006; Çakmakçi *et al.*, 2006). A partir de lo expuesto y considerando que la cepa *Serratia* sp. S119 posee además de la capacidad solubilizadora de fosfato, la síntesis de AIA y ACCd sugiere que estos mecanismos podrían ser responsables de los resultados favorables observados en las plantas de maíz en períodos de sequía.

Los resultados obtenidos en el campo experimental de La Aguada indican que las plantas de maíz inoculadas con *Serratia* sp. S119 + media dosis de

fertilizantes, incrementaron significativamente el contenido de N en tejidos aéreos. Por otra parte, en el campo experimental de Río Cuarto se observó un incremento significativo en el contenido de P en granos en las plantas inoculadas con esta cepa, respecto a las plantas control (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de P y N de los tejidos aéreos y granos de plantas de maíz con los tratamientos analizados al momento de la cosecha en los campos experimentales de La Aguada y Río Cuarto, Campaña 2017/2018

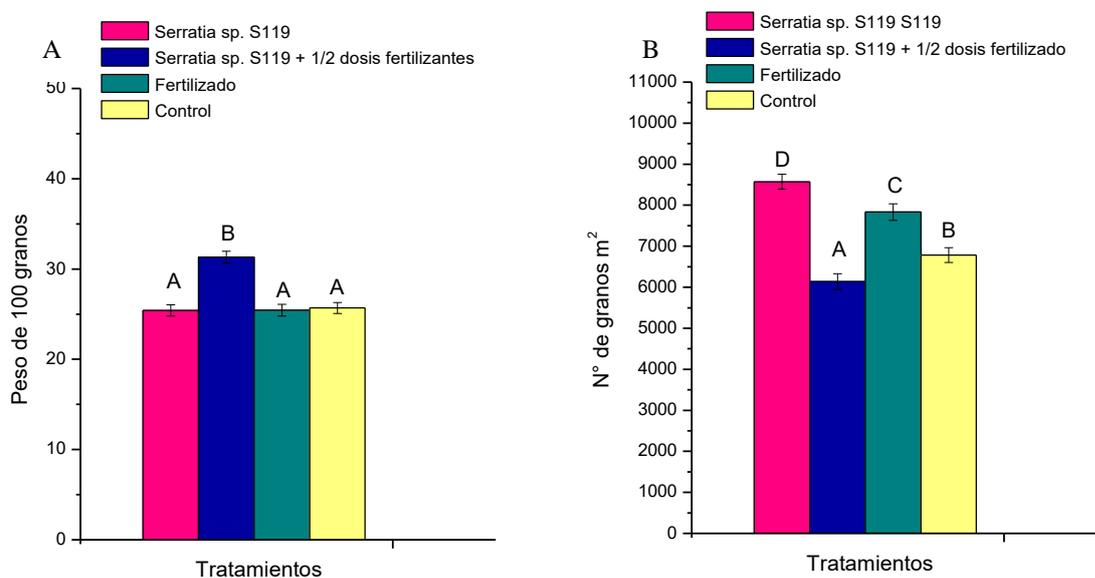
Tratamientos	La Aguada				Río Cuarto			
	Contenido de P (mg/g planta)		Contenido de N (mg/g planta)		Contenido de P (mg/g planta)		Contenido de N (mg/g planta)	
	Tejidos aéreos	Granos	Tejidos Aéreos	Granos	Tejidos Aéreos	Granos	Tejidos Aéreos	Granos
<i>Serratia</i> sp. S119	2,32 ^A ±0,18	1,16 ^A ±0,39	5,0 ^A ±0,2	10,74 ^{AB} ±0,17	2,59 ^A ±0,20	0,66 ^A ±0,08	8,30 ^A ±0,90	12,93 ^A ±0,33
<i>Serratia</i> sp. S119+ 1/2dosis fertilizantes	2,55 ^A ±0,15	1,20 ^A ±0,37	7,1 ^B ±0,7	12,24 ^C ±0,45	2,59 ^A ±0,19	0,85 ^A ±0,21	7,40 ^A ±0,10	12,03 ^A ±0,36
Fertilizado	2,32 ^A ±0,15	0,75 ^A ±0,25	5,9 ^{AB} ±0,7	9,82 ^A ±0,13	2,40 ^A ±0,09	5,95 ^B ±0,53	7,60 ^A ±0,70	12,73 ^A ±0,23
Control	2,17 ^A ±0,14	0,84 ^A ±0,10	4,4 ^A ±0,5	11,72 ^{BC} ±0,07	2,64 ^A ±0,17	0,61 ^A ±0,13	7,50 ^A ±0,20	12,44 ^A ±0,55

Los datos representan la media ± E.S. de 3 réplicas biológicas (n=3) (p<0,05). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por columna.

A partir de los resultados obtenidos en la campaña 2017/2018 fue posible observar que el rendimiento de granos incrementó significativamente en las plantas inoculadas con la cepa nativa *Serratia* sp. S119 respecto a las plantas control, en ambos campos experimentales, aún en condiciones de sequía. Además, los aumentos fueron más notorios en campos con déficit de P. Estos resultados motivaron a realizar un segundo ensayo en el campo experimental de la localidad de La Aguada.

4.2 Campaña 2018/2019: Análisis de las plantas de maíz inoculadas con *Serratia* sp. S119 en el campo experimental de La Aguada

Los resultados obtenidos de este ensayo permitieron observar que en el peso de 100 granos de maíz se obtuvieron incrementos significativos, respecto al tratamiento control, en plantas de maíz inoculadas con *Serratia* sp. S119 crecidas con media dosis de fertilizantes (Figura 24 A). Cuando se analizó el número de granos por m², las plantas tratadas con el inoculante y aquellas fertilizadas, presentaron incrementos significativos con respecto de las plantas control. Sin embargo, las plantas inoculadas con *Serratia* sp. S119 crecidas con media dosis de fertilizantes presentaron los valores más bajos (Figura 24 B).



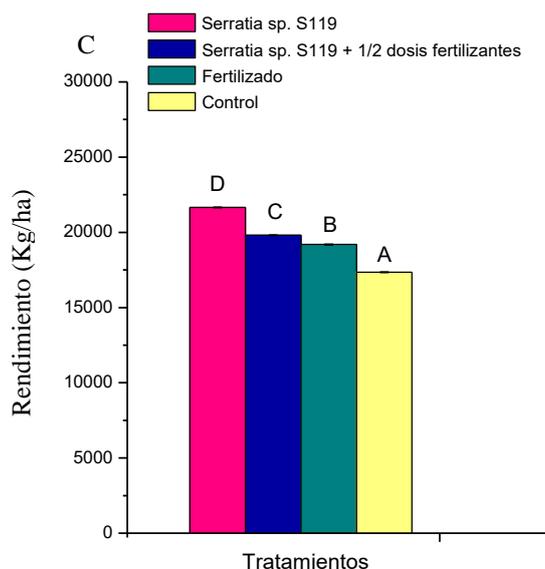


Figura 24: Peso de 100 granos (A), N° de granos m² (B) y rendimiento (Kg/ha) (C) de plantas de maíz inoculadas y fertilizadas, al momento de la cosecha, en el campo experimental de La Aguada. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos

Fue posible observar incremento significativo en el rendimiento de las plantas de todos los tratamientos respecto a las plantas control. Las plantas tratadas con *Serratia* sp S119 mostraron el mayor incremento del rendimiento (24%) con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (Figura 24 C).

Al igual que en la campaña anterior (2017/18), las plantas de maíz inoculadas con la cepa nativa presentaron el mayor rendimiento. Cabe destacar que en esta última campaña analizada las condiciones pluviométricas fueron las esperadas en el área agrícola de Córdoba (Figura 6). Estos resultados indican que la inoculación con la cepa bacteriana *Serratia* sp S119 en plantas de maíz incrementa el rendimiento de las mismas en suelos con bajo contenido de nutrientes, tanto en condiciones de precipitaciones óptimas como en sequía.

Por otro lado, el contenido de P en tejidos aéreos y radical no mostró incrementos en ninguno de los tratamientos comparados con las plantas control.

Tabla 4. Contenido de P y N de los tejidos aéreos y granos de plantas de maíz con los tratamientos analizados al momento de la cosecha en el campo experimental de La Aguada, Campaña 2018/2019

Tratamientos	La Aguada			
	Contenido de P (mg/g planta)		Contenido de N (mg/g planta)	
	Tejidos Aéreos	Granos	Tejidos Aéreos	Granos
<i>Serratia</i> sp. S119	2,20 ^A ±0,23	1,07 ^A ±0,22	5,20 ^A ±0,39	12,24 ^C ±0,10
<i>Serratia</i> sp. S119+ 1/2dosis fertilizantes	1,85 ^A ±0,23	0,74 ^A ±0,17	5,60 ^A ±0,13	11,98 ^B ±0,06
Fertilizadas	2,44 ^A ±0,23	0,74 ^A ±0,17	5,85 ^A ±0,15	11,59 ^A ±0,09
Control	2,44 ^A ±0,23	1,07 ^A ±0,22	5,26 ^A ±0,08	12,39 ^C ±0,06

Los datos representan la media ± E.S. de 3 réplicas biológicas (n=3) (p<0,05). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

En los resultados obtenidos en los ensayos en microcosmo y a campo se observó incremento de parámetros de crecimiento y rendimiento de plantas de maíz tratadas con la cepa nativa *Serratia* sp. S119. Estos incrementos podrían estar relacionados con el incremento de P observado en tejidos vegetales en ensayos en microcosmo. Sin embargo, en los ensayos a campo no se observó acumulación de este mineral en los tejidos vegetales. Esto podría deberse, por un lado, a que los nutrientes ya habrían sido utilizados por las plantas y esto se ve traducido en el incremento en el crecimiento y

rendimiento de las plantas. Por otro lado, ha sido descrito que las PGPB, generalmente, tienen más de un mecanismo que favorece el crecimiento de las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017). Considerando ello, la cepa nativa *Serratia* sp. S119, además de ser una eficiente mineralizadora y solubilizadora de fosfato, presenta las propiedades de fijación biológica de nitrógeno, producción de sideróforos, síntesis de AIA y ACCd; los cuales podrían estar explicando el efecto benéfico observado.

Chen *et al.* (2005) reportaron a *Serratia* como un género bacteriano que presenta mayor actividad mineralizadora y solubilizadora de fosfato con respecto a miembros de los géneros *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Arthrobacter*. También se ha descrito para este género bacteriano múltiples funciones PGPB entre ellas la producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas, ácido jasmónico, ácido abscísico, resistencia sistémica inducida y bio-control dependiente de acil homoserina lactonasa (Ahmad Zaheer 2016, Sajjad *et al.*, 2017) y la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio, hierro y aluminio y fijar N₂.

A partir de los resultados de estos ensayos que demuestran que la cepa nativa *Serratia* sp. S119 incrementó el rendimiento de maíz incluso en condiciones de sequía, sumados a los obtenidos en microcosmo, permite proponer esta cepa como potencial bio-inoculante para este cultivo.

Conclusiones

- La inoculación de maní y maíz con las cepas nativas BSP *Enterobacter* sp. J49 y *Serratia* sp. S119 promueve el crecimiento de estas plantas, siendo la primera más beneficiosa en la leguminosa, mientras que la segunda en la poácea.
- El efecto benéfico de las inoculaciones con las cepas nativas solubilizadoras de fosfato se produce más tempranamente en plantas de maní que en plantas de maíz.
- *Serratia* sp. S119 incrementa el rendimiento del cultivo de maíz en suelos con estrés nutricional de P y sequía.

A partir de la hipótesis planteada es posible confirmar que los inoculantes biológicos a base de cepas nativas utilizados en este trabajo incrementan la adquisición de P y el crecimiento de plantas de maní y maíz.

Bibliografía

- Agrovoz, 2018. El clima derrumbó 48% la producción de maní en Córdoba: la más baja en una década. <http://agrovoz.lavoz.com.ar/agricultura/el-clima-derrumbo-48-la-produccion-de-mani-en-cordoba-la-mas-baja-en-una-decada>.
- Achal, V., Savant, V. V., & Reddy, M. S. (2007). Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 695-699.
- Ahemad, M. Khan, M. S. (2010). Influence of Selective Herbicides on Plant Growth Promoting Traits of Phosphate Solubilizing *Enterobacter asburiae* strain PS2. *Research Journal of Microbiology*, 849-857.
- Ahmad Zaheer; Babur S.Mirza; Joan E.Mclean; Sumera Yasmina; Tariq Mahmu; Shahb Kauser A. Malike M. Sajjad Mirzaa (2016). Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules. *Research in Microbiology*, doi: 10.1016/j.resmic.2016.04.001.
- Ramachandran, K; Srinivasan, V; Hamza S; Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 325-331.
- Anzuay, M.S., Ludueña, L.M., Angelini, J.G. et al. Beneficial effects of native phosphate solubilizing bacteria on peanut (*Arachis hypogaea* L) growth and phosphorus acquisition. *Symbiosis* 66, 89-97 (2015) doi:10.1007/s13199-015-0337-z
- Anzuay, M.S., Frola, O., Angelini, J.G. et al. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis* 60, 143-154 (2013) doi:10.1007/s13199-013-0250-2
- Anzuay, M. S., Ciancio, M. G. R., Ludueña, L. M., Angelini, J. G., Barros, G., Pastor, N., & Taurian, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological research*, 199, 98-109.
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32, 1559-1570.
- Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 48-57.
- Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., & Robledo, C. W. (2008). Manual del usuario. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina, 336.
- Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C., & Standing, D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* Sp. And *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science*, 4(6), 378.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 84(1), 188-198.
- Bolsa de cereales de Córdoba, 2018. <http://www.bccba.com.ar/datos-finales-produccion-6381.html>
- Bolsa de cereales de Córdoba, 2019. Informe de cultivos N°158. http://www.bccba.com.ar/images_db/noticias_archivos/4350-Descargar%20informe.pdf#viewer.action=download
- Bolsa de Comercio de Rosario, 2019. El ranking de las empresas agroindustriales según ventas en la campaña comercial. <https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/73034>
- Bongiovanni, R., Troilo, L., Pedelini, R., & Barberis, N. (2012). Buenas Prácticas agrícolas para la producción de maní. Ediciones INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Manfredi, Argentina. 1ra Edición. p, 73.
- Cakmakçi, R., Dönmez, F., Aydın, A., & Şahin, F. (2006). Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1482-1487.
- Cámara Argentina del Maní, 2. (s.f.).
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G., & Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63(6), 1670-1680.

- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, 34(1), 33-41.
- Dobereiner, J. (1995). Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*.
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied soil ecology*, 15(1), 3-11.
- Duine, J. (1991). Quinoproteins-enzyme containing the cofactor pyrroloquinoline quinine, topaquinone or tryptofan quinine. *Eur. J. Biochem.*, 200, 271-284.
- Ferguson, M. E., Bramel, P. J., & Chandra, S. (2004). Gene diversity among botanical varieties in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Crop Science*, 44(5), 1847-1854.
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2005). Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo*, 23(1), 31-37.
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2007). Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 43(6), 805-809.
- Fiant, S., Alonso, C., Fontana, T., Spinazzé, C., Costero, D., Agosto G., Pérez, C., Bonvehi, L., Fuentes, L., Merigiola, P. (2013). Caracterización de la producción de maní (*Arachis hipogaea*) campaña 2012/2013. Bolsa de Cereales de Córdoba. XXVIII Jornada Nacional del maní. Córdoba, Argentina. Libro de resúmenes. (pp.24-25).
- Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International journal of microbiology*, 2012.
- García-Lara, S., & Bergvinson, D. J. (2007). Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. *Agricultura técnica en México*, 33(2), 181-189.
- Glick, B. R., Karaturovic, D. M., & Newell, P. C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. *Canadian journal of microbiology*, 41(6), 533-536.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22-28.
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231-1240.
- Gudelj, V., Vallone, P., Galarza, C., Anselmi, H., Donadío, H., Conde, B. (2016). Actualización. Información Para Extensión INTA Marcos Juárez.
- Gulati, A., & Pursell, G. (2008). Distortions to agricultural incentives in India and other South Asia.
- Gulati, A., Rahi, P., & Vyas, P. (2008). Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Current microbiology*, 56(1), 73-79.
- Gulati, A., & Pursell, G. (2008). Distortions to agricultural incentives in India and other South Asia.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., & Barea, J. M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and fertility of soils*, 37(1), 1-16.
- INTA, 2014. "Maní: rotar para minimizar el impacto sobre el suelo". <http://intainforma.inta.gov.ar>
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2014). Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. *European Journal of Soil Biology*, 61, 35-40.
- Kudoyarova, G. R., Vysotskaya, L. B., Arkhipova, T. N., Kuzmina, L. Y., Galimsyanova, N. F., Sidorova, L. V., ... & Veselov, S. Y. (2017). Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta physiologiae plantarum*, 39(11), 253.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- Krapovickas, A., Vanni, R. O., Pietrarelli, J. R., Williams, D. E., & Simpson, C. E. (2009). Las razas de maní de Bolivia. *Bonplandia*, 95-189.
- Ludueña, L. M., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., McIntosh, M., Becker, A., Rupp, O., ... & Taurian, T. (2018). Strain *Serratia* sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. *Applied soil ecology*, 126, 107-112.
- Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. *Revista argentina de microbiología*, 47(3), 261-273.

- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1-25.
- MAGRAMA. (2013). *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*. Obtenido de <http://www.magrama.gob.es/app/materialvegetal/fichamaterialvegetal.aspx?idficha=1180>.
- Maní, C. A. (2018). Obtenido de http://www.camaradelmani.org.ar/espanol/wp-content/uploads/2018/CAM_caracterizacion_web.pdf
- Manzoor, J., Sharma, M., & Wani, K. A. (2018). Heavy metals in vegetables and their impact on the nutrient quality of vegetables: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1744-1763.
- Masciarelli, O., Llanes, A., & Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological research*, 169(7-8), 609-615.
- Miller, J. (1976). *Experiments in Molecular Genetics* [Russian translation]. Moscow: Mir.
- Moss, J. P., Rao, V. R., Pattee, H. E., & Stalker, H. T. (1995). The peanut–reproductive development to plant maturity. *Advances in peanut science*, 1-13.
- Ngoma, L., Esau, B., & Babalola, O. O. (2013). Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng, South Africa. *African journal of Biotechnology*, 12(26).
- Ngoma, L., Babalola, O. O., & Ahmad, F. (2012). Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. *Scientific Research and Essays*, 7(47), 4003-4013.
- Olmedo, C. A. (2002). Selectigon of bacteria with growth promotion activity on soybean (Doctoral dissertation, PhD Thesis, National University of Tucuman, Argentina).
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197.
- Ozturk, A., Caglar, O., & Sahin, F. (2003). Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(2), 262-266.
- Paliwal, R. L. (2001). *Usos del maíz. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*, 1.
- Pereira, P., Ibáñez, F., Rosenblueth, M., Etcheverry, M., & Martínez-Romero, E. (2011). Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecology*, 2011.
- Picone, L., & Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del cono sur*, 16, 11-15.
- Pineda, M. E. B. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
- Pradhan, M., Sahoo, R. K., Pradhan, C., Tuteja, N., & Mohanty, S. (2017). Contribution of native phosphorous-solubilizing bacteria of acid soils on phosphorous acquisition in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Protoplasma*, 254(6), 2225-2236.
- Puig-Junoy, J., & Argiles, J. M. (2004). The influence of management accounting use on farm inefficiency. *Agricultural Economics Review*, 5(389-2016-23420), 47-66.
- Rooney, D. C., & Clipson, N. J. (2009). Phosphate addition and plant species alters microbial community structure in acidic upland grassland soil. *Microbial ecology*, 57(1), 4.
- Rozas, H. S., Echeverría, H., & Angelini, H. (2012). Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y ExtraPampeana argentina. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38(1), 33-39.
- Saini, P., & Khanna, V. (2012). Evaluation of native rhizobacteria as promoters of plant growth for increased yield in lentil (*Lens culinaris*). *Recent Research in Science and Technology*, 4(4).
- Saleem, M., Law, A. D., Sahib, M. R., Pervaiz, Z. H., & Zhang, Q. (2018). Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. *Rhizosphere*, 6, 47-51.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Sajjad, Y., Jaskani, M. J., Asif, M., & Qasim, M. (2017). Application of plant growth regulators in ornamental plants: a review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2).
- Salantur, A., Ozturk, A., & Akten, S. (2006). Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil and Environment*, 52(3), 111.
- Sánchez-Domínguez, S. e. (2006). Caracterización y clasificación de germoplasma mexicano de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.). *Agrociencia*, 40: 171-182.
- Sindhu SS, P. P. (2014). Nutrient cycling: potassium solubilization by microorganisms and improvement of crop growth. *Geomicrobiology and biogeochemistry*, 175 - 198.
- Stevenson, F. J. (2005). *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. New York: John Wiley and Son.

- Taurian, T., Anzuay, M. S., Angelini, J. G., Tonelli, M. L., Ludueña, L., Pena, D., ... & Fabra, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, 329(1-2), 421-431.
- Taurian, T., Anzuay, M. S., Ludueña, L. M., Angelini, J. G., Muñoz, V., Valetti, L., & Fabra, A. (2013). Effects of single and co-inoculation with native phosphate solubilising strain *Pantoea* sp J49 and the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth. *Symbiosis*, 59(2), 77-85.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., ... & Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *science*, 292(5515), 281-284.
- Velazco, C. L. (2013). Crop rotation design in view of soilborne pathogen dynamics. A methodological approach illustrated with *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. Wageningen Universiteit (Wageningen University).
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.
- Vicario, J. C., Primo, E. D., Dardanelli, M. S., & Giordano, W. (2016). Promotion of peanut growth by co-inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. *Journal of plant growth regulation*, 35(2), 413-419.
- Vincent, J. M. (1975). Manual práctico de rizobiología (No. 631.847 V5Y).
- Viruel, E., Erazzú, L. E., Martínez Calsina, L., Ferrero, M. A., Lucca, M. E., & Sñeriz, F. (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(4), 819-831.
- Zapata, N., Vargas, M., Finot, V. L., & Vallejos, B. (2012). Caracterización fenológica y morfológica de veinte accesiones de maní (*Arachis hypogaea* L.) establecidas en la Provincia de Ñuble, Chile. *Chilean J. Agric. Anim. Sci.(ex AgroCiencia)*, 28, 127-137.

