

INFLUENCIA DE LA INOCULACION CON *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EN TRIGO CULTIVADO EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA.

E A RODRIGUEZ CACERES¹, C DI CIOCCO², J C PACHECO BASURCO¹

¹Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola CICA INTA C.C. 25 (1712) Castelar, Pcia. de Bs. As., Argentina.

²Universidad Nacional de Luján C.C. 221 (6700) Luján, Pcia. de Bs. As., Argentina.

INFLUENCE OF INOCULATION WITH *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ON WHEAT CULTIVATED IN LA PAMPA PROVINCE, ARGENTINA.

Two field experiments were carried out on Haplustoll soils in the Semiarid Region of La Pampa Province (Argentina), during 1992-1993. Yield response of wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains Az 39 and Cd studied. Seeds were inoculated with peat-charcoal inoculum at the ratio of 32 g kg⁻¹ seeds. Before sowing average values of 1 x 10⁶ cfu seed⁻¹ were obtained. The root and shoot growth response of wheat was studied in pots at two levels of soil water content (12 % and 25 % of field capacity). At the Gral. Pico area *A. brasilense* strains Az 39 and Cd increased yields of wheat cultivar by 30 % and 16 % over the control respectively. Inoculation increased the wheat root dry weight significantly by 37 % with Az 39 and 50 % by Cd in plants growing in greenhouse conditions, at the low level of soil water content. No significant differences in shoot dry weight were observed between treatments and control. The results show that wheat growing in the Semiarid Region of Argentina can benefit from seed inoculation of *A. brasilense* Az 39 and Cd strains.

Key words: *Azospirillum brasilense*-Seed inoculation-Wheat yield-Semiarid conditions

INTRODUCCION

Existen varios trabajos relacionados con la inoculación de *Azospirillum* spp. en plantas de interés agronómico en diferentes condiciones ambientales (Kapulnik *et al.*, 1981; Wani, 1990; Okon, Labandera, 1994). En nuestro país el efecto sobre el rendimiento de trigo se ha observado en forma consistente en ensayos de inoculación en algunas zonas del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires con deficiencia hídrica (Rodríguez Cáceres *et al.* 1996). En las regiones de nuestro país con estas limitaciones se cultiva trigo representando el 30% de la superficie total del área sembrada con este cereal (1,5 x 10⁶ ha). Esto provoca reducción de rendimiento (1.000-1.300 kg ha⁻¹) respecto de las zonas húmedas del país (2.000- 3.000 kg ha⁻¹). En estas circunstancias es necesario encontrar tecnologías alternativas que mejoren el aprovechamiento del agua y de los nutrientes por la planta. Se ha demostrado que las bacterias del género *Azospirillum* poseen capacidad de promover el crecimiento radical en numerosas especies vegetales permitiendo aumentar la tasa de absorción de agua y nutrientes por las plantas (Kapulnik *et al.* 1985, Okon, Kapulnik 1986; Morgenstern, Okon 1987). En ensayos de campo bajo condiciones de estrés hídrico se observó un mejor aprovechamiento del agua del suelo por parte de sorgos inoculados con este diazotrofo, incrementando así el rendimiento final (Sarig *et al.* 1984). Varios autores proponen que la promoción del crecimiento radical se basa en la producción de sustancias

similares a las fitohormonas (auxina y giberelinas) (Bottini *et al.* 1989). Los objetivos de este trabajo fueron el estudio del efecto de la inoculación con *A. brasilense*, sobre el rendimiento de trigo cultivado en campos con baja disponibilidad de agua y en invernadero la evaluación del crecimiento con dos niveles de riego.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las cepas e inoculación de cariopsis

Se emplearon bacterias de la especie *A. brasilense* (Krieg, Döbereiner 1986) siendo la cepa Az 39 originaria de raíces de trigo de Marcos Juárez (Córdoba, Argentina), y la cepa Cd aislada de macetas con *Cynodon dactylon* que habían sido previamente inoculadas con Sp 7 (American Type Culture Collection -ATCC- Nro. 29729). Esta bacteria presenta la característica de su pigmentación rojiza, en las colonias crecidas en medio de cultivo (Eskew *et al.* 1977). Las cepas de azospirilos, empleadas en los ensayos de campo e invernadero, desarrollaron en medio líquido NFB con cloruro de amonio (Döbereiner, Day 1976) en agitación mecánica a 180 rpm a 28 °C durante 48 horas. En esas condiciones se obtuvieron 5 x 10⁹ unidades formadoras de colonia (UFC) ml⁻¹ utilizando la técnica de dilución y siembra de una alícuota de 0,1 ml en cajas de Petri con medio RC (Rodríguez Cáceres 1982). Para la elaboración del inoculante se empleó una mezcla de turba de *Sphagnum* sp. y carbón vegetal en relación 75:25 v/v finamente molida (76 % pasa por malla 140 US Standard Sieve Series) con 10 % de humedad, neutralizada a pH 7 con CO₂Ca y esterilizada en autoclave durante 1 hora a 120 °C. Se impregnó con caldo de cultivo de cada cepa de azospirilo en proporción de 100 % peso/volumen. El inoculante así preparado se mantuvo a temperatura de laboratorio en bolsas de polietileno hasta el momento de su uso. Previo a la siembra se

remojó 1 kg de semillas con 30 ml de goma arábiga (20 % p/v) previamente neutralizada. Luego se adicionó 30 g de inoculante mezclando lo suficiente como para lograr un recubrimiento homogéneo. Se dejó airear a la sombra y se embolsó para su posterior siembra. Para evaluar la cantidad de diazotófos presentes se tomaron 100 granos inoculados y se colocaron en 100 ml de solución fisiológica estéril ($8,5 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl). Luego de una agitación mecánica durante 30 minutos se realizaron diluciones decimales y se sembró 0,1 ml en medio RC. Las cajas se incubaron a 37°C durante 4 días contándose las colonias típicas de *Azospirillum*. Se lograron valores promediados de 106 UFC cariópse¹ en los ensayos de campo y de 107 UFC cariópse¹ en la experiencia de invernadero.

Cultivo en campo:

Los ensayos se realizaron en el ciclo agrícola 1992-1993 en Anguil y Gral Pico (Pcia. de La Pampa, Argentina). Las características químicas de los suelos se detallan en la Tabla 1. La fecha de siembra fue el 15 de julio de 1992 y la cosecha se realizó el 5 de enero de 1993, para ambos ensayos. La densidad de siembra fue de 260 plantas m^2 utilizando una sembradora manual tipo Planet Junior. El tamaño de las parcelas fue de 1,40 m por 5,5 m con 7 líneas y una distancia entre surcos de 0,20 m. El cultivar de trigo (*Triticum aestivum* L.) empleado fue Cochicó INTA tipo duro con un peso de 1.000 semillas de 35,5 g y ciclo intermedio. Se efectuaron los siguientes tratamientos: 1) testigo, 2) inoculado con *Azospirillum brasilense* Az 39, 3) inoculado con *Azospirillum brasilense* Cd. Las parcelas testigo se sembraron con semillas tratadas de la misma forma que la inoculadas pero con el adición de inoculante previamente esterilizado por autoclave. El rendimiento se obtuvo de la cosecha de 5 m^2 de parcela. Se cortaron a mano las espigas y posteriormente se trillaron. El diseño estadístico utilizado fue en bloques completos al azar con 4 repeticiones. Los datos fueron analizados estadísticamente por el análisis de la variancia y la comparación de medias se efectuó según la prueba de Duncan ($P < 0,05$) (Little, Hills 1975).

Ensayo en invernadero

Con el objetivo de determinar el efecto de la inoculación de trigo cultivado en condiciones de deficiencia hídrica se efectuó un ensayo de invernadero en INTA Castelar con suelo de la Zona Semiárida (Gral Pico, La Pampa) con las características detalladas en la Tabla 1. Para tal fin se establecieron 2 niveles de humedad edáfica. Estos niveles fueron de 12,5 % y 25 % de la capacidad de campo. Las macetas con 2 kg de suelo se sembraron inicialmente con cinco semillas (inoculadas o no según corresponda al tratamiento) del mismo cultivar empleado en los ensayos en campo. Luego de 15 días de la germinación se ralearon a tres plantas por maceta. Los dos niveles hídricos (tratamientos principales) se mantuvieron por regulación diaria del peso total de cada maceta, reponiendo el agua necesaria con agua destilada. Los subtratamientos fueron: 1) testigo, 2) inoculado con Az 39 y 3) inoculado con Cd. Cada unidad experimental

Tabla 1. Características de los suelos empleados

	Haplustoles énticos	
	Anguil	Gral. Pico
Materia orgánica (%)	2,21	1,60
Carbono orgánico (%)	1,30	0,96
Nitrógeno total	0,11	0,09
Relación C/N	12,8	10,6
Fósforo asimilable (mg kg^{-1})	30,1	10,9
pH	6,9	6,4
Conductividad en pasta (mmhs cm^{-1})	0,48	0,19
Calcio (cmol kg^{-1})	11,8	18,0
Magnesio (cmol kg^{-1})	2,5	3,6
Sodio (cmol kg^{-1})	0,8	0,8
Potasio (cmol kg^{-1})	3,1	2,1

estuvo representada por 2 macetas y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Se evaluó el peso seco del vástago y raíz a fines de espigazón. Todos los datos fueron analizados por análisis de variancia empleando el programa de Statistical Analysis Systems (SAS 1985) y la comparación de medias se efectuó según la prueba de Duncan ($P < 0,05$) (Little, Hills 1975).

RESULTADOS Y DISCUSION

La inoculación de las cepas Az 39 y Cd de *Azospirillum brasilense* en trigo provocaron aumentos en el rendimiento, en la localidad de Gral Pico, (Tabla 2). Las variaciones en la respuesta a la inoculación podrían hallarse al comparar el rendimiento de los testigos en las dos localidades. La producción de grano del testigo en Anguil (1.340 kg ha^{-1}) fue mayor que el obtenido en el ensayo realizado en Gral. Pico (1.200 kg ha^{-1}), mientras que los inoculados mantuvieron sus rendimientos. Esto se debería posiblemente a que los suelos de Gral Pico presentaron un menor nivel de fertilidad. De esta manera la baja fertilidad habría permitido que la inoculación incrementara el rendimiento en forma notoria. Estos resultados concuerdan con los hallados por Jagnow, (1987), quien encontró que la respuesta del trigo a la inoculación dependía del contenido inicial de nitrógeno de un suelo. En un trabajo previo que realizamos con plantas de moha de Hungría cultivadas en arena y regadas con distintos niveles de una solución nutritiva (hidroponia) se observó que las mayores diferencias en el peso seco del vástago y la raíz a favor de las plantas inoculadas con azospirilos respecto a las no inoculadas se establecían en aquellas plantas fertilizadas con la menor cantidad de solución nutritiva, que se suministró durante todo el ciclo de las plantas, correspondiente a 26 mg de nitrógeno, 4 mg de fósforo y 61 mg de potasio (Di Ciocco, Rodríguez Cáceres 1991). En este caso también se observó que la respuesta a la inoculación se relacionó inversamente con la fertilidad.

Como se advierte en la Tabla 2, la inoculación con la Az 39 (cepa aislada de raíces de trigo), superó los incrementos producidos con la Cd. Trabajos previos realizados durante varios años en Bordenave (Pcia. de Buenos Aires) con diferentes cultivares y cepas muestra-

Tabla 2. Rendimiento de trigo inoculado con *A. brasilense* Cd en condiciones de campo.

Tratamientos	Rendimiento (kg ha^{-1})	
	Anguil	Gral Pico
Testigo	1.340 a	1.200 a
Inoculado con Az 39	1.550 a	1.560 b
Inoculado con Cd	1.410 a	1.390 c

Datos con letras idénticas en cada columna no difieren significativamente, ($P > 0,05$)

ron que la inoculación con la cepa Az 39 en trigo cultivar Cochicó INTA, provocó incrementos en los rendimientos de grano durante 3 años seguidos que variaron entre un 13 y 33 % respecto a los testigos sin inocular (Rodríguez Cáceres *et al.* 1996). Esta cepa de *A. brasilense* también mejoró los rendimientos en forraje de moha de Hungría cultivar Yaguané en condiciones de campo en la Pradera Pampeana Húmeda (Di Ciocco, Rodríguez Cáceres 1994) y de granos de maíz en suelos Haplustoles de la provincia Córdoba (Fulchieri, Frioni 1994).

En la Tabla 3 se observa que las plantas inoculadas alcanzaron un mayor peso seco de la raíz que las no inoculadas con incrementos de 37 % con la cepa Az 39 y de 30 % con Cd en el menor nivel de riego. Fulchieri y Frioni en 1994 observaron que la inoculación de maíz con las cepas Az 39 de *A. brasilense* y Az 30 de *A. lipoferum* en Haplustoles incrementaron el peso seco de las raíces de plantas inoculadas más de 2 veces respecto a los controles sin inocular. En el nivel de agua superior las plantas de trigo no presentaron diferencias en el peso seco de la raíz. Puede observarse también que el peso seco de las raíces de las plantas inoculadas crecidas en el nivel de 12,5 % de la capacidad de campo fueron semejantes a aquellas no inoculadas, cultivadas en el mayor nivel de riego. En ningún caso se observó diferencias en el desarrollo de los vástagos, a pesar del incremento radicular de las plantas de trigo inoculadas en el menor nivel de riego. Es probable que las limitaciones de espacio y fertilidad que presenta toda maceta no hayan permitido que las raíces más grandes elevaran la tasa de absorción de agua y nutrientes llevando a un mayor crecimiento del vástago.

Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta a la inoculación varía en función del grado de fertilidad y de la disponibilidad de agua del suelo. También se observó la importancia que puede adquirir la especificidad cepa-cultivar.

Tabla 3. Influencia del nivel de riego y de la inoculación con *A. brasilense* Cd sobre diferentes órganos de trigo cultivado en macetas y cosechado en espigazón.

	Peso seco (g)	
	Raíz	Vástago
12,5 % de capacidad de campo.		
Testigo	4,98 a	5,17 a
Inoc. con Az 39	6,83 bc	5,36 a
Inoc. con Cd	6,46 b	5,86 a
25 % de capacidad de campo.		
Testigo	7,58 bc	5,95 a
Inoc. con Az 39	8,04 c	6,29 a
Inoc. con Cd	7,77 bc	5,87 a

Valores con letras idénticas en cada columna no difieren significativamente ($P > 0,05$)

REFERENCIAS

- Bottini R, Fulchieri M, Pearse D, Pharis R. 1989. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90: 45-47.
- Di Ciocco, C., Rodríguez Cáceres E. 1991. Respuesta de *Setaria italica* a la inoculación con *Azospirillum* spp. XIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. 52-53
- Di Ciocco, C., Rodríguez Cáceres, E. 1994. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine Humid Pampas. *Field Crops Research* 37:253-257
- Döbereiner, J., Day, J.M. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En: Newton, W.E. y C.J. Nyman (Eds.). *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press. Pullman. pp. 518-538
- Eskew, D.L., Folch, D.D., Ting, P. 1977. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl. and Environm. Microbiol.* 34: 582-585
- Fulchieri, M., Frioni, L. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Effect on yield in a field experiment in Central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923
- Jagnow, G. 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen fixing rhizosphere bacteria: posible causes of success and failure with regard to yield response: a review. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 150:361-368
- Kapulnik Y., Okon Y., Henis, Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887
- Kapulnik, Y., Sarig, S., Nur, Y., Okon, Y., Kigel, J.; Henis, Y. 1981. Yield increases in summer cereal crops of Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. *Exp. Agric.* 17: 179-187
- Krieg, N.R.; Döbereiner, J. 1986. The genus *Azospirillum*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg N.R. y J.G. Holt (Eds). Vol 1. Williams y Wilkins Co., Baltimore, MD. pp. 96-104
- Little, T.M.; Hills, F.J. 1976. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial Trillas, México. pp 67-77
- Morgenstern, E.; Okon Y. 1987. The effect of *Azospirillum* brasilense and auxin root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*. *Arid Soil Res. Rehabil.* 1: 115-127
- Okon, Y.; Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16
- Okon, Y.; Labandera, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601
- Rodríguez Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991
- Rodríguez Cáceres; E. Gonzalez Anta, G.; López, J.R.; Di Ciocco, C.A.; Pacheco Basurco J.; Parada J.L. 1996. Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum* brasilense and *Bacillus polymyxa* in the Semiarid Region of Argentina. *Arid Soil Res.Rehabil* 10:13-20
- Sarig S, Kapulnik, Y.; Nur, Y.; Okon, Y. 1984. Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* and *Azospirillum* inoculation. *Exp. Agric.* 20:59-66
- SAS Institute Inc. 1985. En *SAS user's guide: statistics*. Version 5 ed. SAS Inst.
- Wani, S.P. 1990. Inoculation with associative nitroge-fixing bacteria: role in cereal grain production improvement. *Indian Journal of Microbiology* 30:363-393