

MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Inés E. García de Salamone

¹ Universidad de Buenos Aires, Argentina. Facultad de Agronomía. Correo electrónico: igarcia@agro.uba.ar

INTRODUCCION

Existen numerosas evidencias en la literatura que indican que la utilización de PGPB puede tener un rol significativo en la sustentabilidad de los agroecosistemas (Reed, Glick 2004; Antoun y Prevost 2006). La inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), contribuye a la implantación, desarrollo y producción de cultivos tales como arroz, trigo y maíz (García de Salamone et al., 2007; Baldani et al., 2008). La fijación biológica de N (FBN) adquiere relevancia y puede ser incorporada a través de ciertas asociaciones cereal-PGPB para aportar N al agroecosistema (García de Salamone et al. 1996; Urquiaga et al., 2004)

Trabajos realizados en condiciones de laboratorio habían mostrado interacciones entre variedades de trigo e híbridos de maíz y cepas de *Azospirillum* aisladas localmente (García de Salamone et al., 1989, 1990, 1992). En el marco de un proyecto de investigación binacional financiado por CONICET de Argentina y CNPq de Brasil (1989-1991) se encararon trabajos de selección de cepas a partir de plantas de estos cereales cultivadas en condiciones de campo. Las mismas fueron aisladas de endorrizosfera de raíces de trigo y maíz muestreadas en floración y tratadas con Cloramina T, y luego maceradas para proceder a obtener los aislamientos. El objetivo de selección fue en todos los casos obtener cepas que tuvieran elevada capacidad de fijar nitrógeno estimada a través de cromatografía gaseosa por el método de reducción de acetileno. La obtención de numerosas cepas de *Azospirillum* asociadas a la rizosfera de trigo con posibilidades de fijar N ya había desencadenado un interés fundamental en el progreso de las siguientes investigaciones que estaban en relación a los resultados obtenidos por diversos grupos de trabajo del mundo (García de Salamone, Monzón de Asconegui 2008). Esas investigaciones ya habían aportado datos sobre la práctica de inoculación de semillas de gramíneas y su cultivo como posibles tecnologías de bajo costo para la incorporación de N₂ vía fijación biológica, con beneficios colaterales, como son una mayor efectividad en la producción agrícola-ganadera y un ahorro sustancial en el uso de la fuente no renovable de energía de los combustibles fósiles (Baldani et al. 2008; Boddey et al. 1986).

En este contexto se realizaron numerosos trabajos para evaluar en condiciones de campo el comportamiento de cepas de *Azospirillum* aisladas de raíces de trigo y maíz ya sea localmente en la zona pampeana argentina, como así también algunas suministradas por el CNPAB de EMBRAPA, Brasil. En aquellos momentos se pensó en las posibilidades de combinar los efectos aún no perfectamente establecidos de esta bacteria rizosférica intentando lograr bases experimentales para que la práctica de inoculación pudiera extenderse al productor agropecuario. Los ensayos fueron programados con diseños factoriales en bloques completos aleatorizados con tres o más repeticiones. En la mayoría de los casos se consideraron combinaciones con dosis de nitrógeno aplicadas en la práctica de campo. Las condiciones de manejo de los cultivos experimentales fueron similares a aquellas aplicadas por el dueño del establecimiento donde se instalaba cada ensayo o por el productor en general.

García de Salamone et al., (1990) pudieron demostrar que la inoculación con dos cepas de *Azospirillum brasilense* mejora la implantación del cultivo. Esto resulta en un beneficio para el desarrollo de las futuras etapas de crecimiento. Un cultivo más rápidamente implantado comenzará más rápidamente a producir materia seca que le permitirá generar las estructuras de rendimiento por períodos más prolongados posibilitando de esta manera el logro de una mayor producción.

De los resultados de ensayos de campo se pudo concluir que la inoculación con esta bacteria rizosférica produce ventajas fisiológicas y económicas para su aplicación al nivel de productor agropecuario (García de Salamone 1993). Otras investigaciones realizadas en el país, que reflejaban

Conclusiones similares fueron presentadas en el Taller sobre *Azospirillum* realizado en el Laboratorio de Microbiología y Producción Inoculantes, Montevideo, Uruguay en agosto de 1993. Las conclusiones del mismo fueron compiladas por Okón, Labandera (1994) y conllevó a un interés incipiente por algunas empresas productoras de inoculantes existentes en el mercado que empezaron a presupuestar y establecer programas de investigación y desarrollo de inoculantes de otras PGPB distintas a *Rhizobium*.

Con estos y algunos otros objetivos complementarios como el efecto sobre las comunidades microbianas rizosféricas se realizaron en el periodo 2004-2006, experimentos de trigo en condiciones de campo con la tecnología aplicada por el productor. Las características generales de los mismos se detallaron en García de Salamone, Monzón de Asconegui, (2008). El análisis conjunto de los experimentos descritos por estos autores muestra que la inoculación con *Azospirillum* incrementa siempre el rendimiento en grano. La partición a espigas y la producción de biomasa aérea total se pueden incrementar mediante la práctica de inoculación con esta PGPB. Esto representa una ventaja para la producción de granos que favorece la sustentabilidad del agroecosistema pues significa mayor aporte de residuos al suelo. Sin embargo, la interacción “genotipo x ambiente x inoculante” observada refleja la necesidad de profundizar estos estudios. Como complemento a lo anterior Naiman et al., (2009), observaron que prácticas tradicionales como la fertilización modifican las comunidades microbianas rizosféricas en mayor medida que la práctica de inoculación con PGPB de los géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum*, brindando similares incrementos de rendimiento y producción de biomasa aérea. Esto se complementa con la mayor producción de biomasa que se puede obtener con la inoculación con PGPB que en promedio para cuatro experimentos, incrementó un 21% la producción de biomasa aérea mientras la fertilización nitrogenada aumentó esta sólo en un 5% extra. Esto permite inferir que la inoculación con ciertas cepas de esta PGPB favorecería la producción en forma más sustentable permitiendo la reducción de los niveles de aporte de nutrientes sin resentir el rendimiento esperado de trigo.

ENSAYOS DE MAIZ

A comienzos de la década de los '90, la asociación entre la bacteria diazotrófica *Azospirillum* y plantas de cultivo ya era considerada un fenómeno de considerable valor científico y económico. También se sabía que un número elevado de factores condicionaban la respuesta a la inoculación en condiciones de campo. Con relación a esto, García de Salamone (1993), propuso que para usar estas asociaciones bacteria-planta, a escala agronómica, debería considerarse el criterio de ideotipo propuesto por Donald (1968) y utilizado en mejoramiento vegetal, donde la combinación exacta de ambos socios debería estar referida a un ambiente en particular.

Basándose en los resultados de varios ensayos se puede inferir que los programas de mejoramiento deberían incluir el estudio de las interacciones “*Azospirillum* -planta” con el fin de seleccionar genotipos de maíz que utilicen mejor las interacciones “suelo-planta-atmósfera” en la conformación de sistemas cultivados de mayor rendimiento y estabilidad ecológica.

García de Salamone, Dobereiner (1993) analizaron la información disponible de la respuesta a la inoculación en la asociación *Azospirillum*-maíz y la consistencia de los resultados en distintas condiciones ambientales. El análisis de varianza de “ensayo x año” reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) a favor de la inoculación con *Azospirillum* respecto a los testigos independientemente del ensayo que se trate (García de Salamone, Monzón de Asconegui, 2008).

ENSAYOS DE ARROZ

El arroz es un alimento básico para una gran proporción de la población mundial que debe enmarcarse en programas de agricultura sustentable. Dos experimentos sembrados en las campañas 2006/2007 y 2008/2009 en la zona arrocera de la provincia de Entre Ríos, del NE de Argentina permitieron evaluar la respuesta de dos tratamientos de inoculación con *Azospirillum brasilense*, sobre la producción de biomasa y rendimiento del cultivo de arroz (García de Salamone et al., 2007, 2010; Gatica et al.,

2009). Los inoculantes contenían dos cepas de *A. brasilense* y se analizó la microflora rizosférica con potencialidad de fijar nitrógeno (N). La dosis para 50 Kg de semilla fue 300 ml de producto con 10^9 ufc ml^{-1} . El número más probable (NMP) de diazotrofos rizosféricos disminuyó entre macollaje y llenado de granos. La capacidad de utilizar fuentes carbonadas por las comunidades microbianas presentes en la rizosfera fue distinta entre tratamientos. La biomasa aérea del control fue 7256 y 15183 $kg\ ha^{-1}$ en macollaje y llenado, respectivamente. Los tratamientos con *A. brasilense* incrementaron significativamente esos valores en 15 y 35% para macollaje y 28 y 50% para llenado de granos. El control rindió 8370 $kg\ ha^{-1}$ y la inoculación incrementó ese valor en 7.5%. Los resultados de este trabajo están indicando el alto potencial que tiene la práctica de inoculación con *Azospirillum* para este cultivo.

ESTIMACIONES DE FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

Se ha demostrado que la inoculación con ciertas combinaciones bacteria-planta, tales como *Azospirillum*-maíz pueden aportar N proveniente de la FBN en niveles equivalentes a 100 $kg\ N\ ha^{-1}$ (García de Salamone et al., 1996). Este aporte de N podría colaborar con la sustentabilidad del agroecosistema pues puede mejorar la calidad de los residuos y posibilitar una reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados. Por otra parte se pudo observar que la inoculación con *A. brasilense* modificó la relación $^{15}N/^{14}N$ tanto de plantas de arroz como de trigo en la etapa de llenado de grano (García de Salamone et al., 2009). Es por ello, que se puede concluir que las plantas de arroz aumentaron la cantidad de N derivado del BNF cuando se aplicó la inoculación con *Azospirillum*. Las malezas y las plantas de trigo mostraron diferencias significativas entre los genotipos entre los valores de la relación $^{15}N/^{14}N$. La gran variabilidad se manifestó en las relaciones $^{15}N/^{14}N$ de las plantas de trigo sin inocular y esto indica la posibilidad de utilizar estos valores para calcular el N derivado del BNF para las plantas de trigo inoculadas. El valor medio de las relaciones $^{15}N/^{14}N$ de malezas en el experimento de trigo fue de 8,64. Las estimaciones de los porcentajes BNF mostraron variabilidad entre los genotipos de la planta como se informó antes con genotipos de maíz (García de Salamone et al., 1996) en asociación con bacterias PGPB. La relación entre los valores de $^{15}N/^{14}N$ entre el tratamiento de control y las plantas inoculadas trigo muestran que en promedio, el rango de porcentaje de N derivado del BNF fue 13-55%. Esto significa que la inoculación con *Azospirillum* puede producir cambios en la fisiología de plantas que pueden estar relacionados con la aparición de BNF. Con el fin de aumentar la precisión, es necesario para obtener una mejor estimación del valor del suelo $^{15}N/^{14}N$ Alves et al., (2008). Los recuentos del número más probable de microorganismos oxidantes del amonio aumentó cuando las semillas de ambos cultivos se inocularon con *Azospirillum brasilense*. Sin embargo nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) mostraron respuestas a la inoculación diferentes para estos dos cultivos. Los valores de NMP para las plantas de arroz fueron significativamente inferiores en el suelo asociado a las plantas inoculadas. Sin embargo, el valor de NPM del suelo asociado a las plantas de trigo sin inocular fue de 5,3 $mg\ de\ N-NH_4\ kg^{-1}$ de suelo, que fue significativamente ($p: 0.05$) menor a 10,3 $mg\ de\ N-NH_4\ kg^{-1}$ de suelo observados para el suelo asociado a las plantas inoculadas.

SÍNTESIS Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de ciertas PGPB de modificar la ecofisiología de los cultivos tales como trigo, maíz y arroz en condiciones de campo. Sin embargo la información disponible estaría indicando que la interacción cepa-planta-ambiente es relevante para los resultados de inoculación que se pueden obtener (García de Salamone, Cassan 2010).

Se observó que la respuesta a la inoculación es variable y que los microorganismos presentes pueden colonizar y permanecer en la rizosfera. Incrementos en rendimiento y producción de biomasa deberían ser considerados de relevancia ecológica y ser estudiados desde el punto de vista de la ecología microbiana. Además se debería estudiar estos aspectos utilizando cepas aisladas con capacidad de fijar nitrógeno en asociación con la planta. Esto podría aumentar el nivel de respuesta y mejorar la eficiencia de uso de los recursos disponibles. La introducción de rizobacterias, podría provocar modificaciones en la actividad microbiana en la rizosfera y por ello deberían ser estudiados (García

de Salamone, Cassan 2010). Es sabido que la diversidad microbiana puede utilizarse como índice de calidad de suelo y que las condiciones de manejo la pueden modificar (García de Salamone et al., 2006; 2007). En relación con esto y sumado a que la práctica de inoculación con *Azospirillum* esta siendo utilizada por un número creciente de productores agropecuarios en diversas areas agrícolas del mundo, se debería aportar conocimiento sobre la ecología microbiana de la rizosfera de los cultivos en condiciones de campo cuando rizobacterias son aplicadas.

Los resultados compilados en esta revisión están en concordancia y pueden ser ampliados con aquellos revisados por Reed, Glick (2004) y Bashan et al., 2004. Toda la información disponible indica que la inoculación con *Azospirillum* debe ser favorecida. Sin embargo, la variabilidad en las capacidades tanto de esta PGPB como aquella de las plantas a las que esta está dirigida deben ser ajustadas y potenciadas incluyendo mecanismos alternativos tales como FBN, producción de fitoreguladores, control biológico entre otros para mejorar así los niveles de respuesta a la inoculación a campo (Cassan y García de Salamone 2008).

En síntesis, los efectos directos de la utilización de PGPB en cultivos de cereales ejercen un rol significativo en procesos fundamentales del ecosistema como la recirculación de C y N. Además, se ha abordado estos problemas con ensayos a campo que constituyen un conjunto de evidencias que nutre la propuesta aquí presentada. La suma de esta experiencia previa y la interacción con miembros del equipo de investigadores, redundará en un aporte significativo para conectar procesos que ocurren en la porción aérea del ecosistema con procesos que ocurren en la porción subterránea.

BIBLIOGRAFIA

- Alves, B.J.R., O.C. Oliveira, R.M. Boddey, y S. Urquiaga. 2008. Métodos isotópicos. In: Gabriel de A. Santos; Leandro S. da Silva; Luciano P. Canellas; Flavio A.O. Camargo. (Org.). Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. 2 ed. : Editora Metrópole, Porto Alegre. pp. 229-242.
- Andrén, O., A. Hansson, C. Végh, y K. Barley. 1993. Nutrient up-take, root growth and depth distribution in two soil types in a rhizotron with vertical and horizontal minirhizotrons. *Swed. J. Agric. Res.*, v. 23, p. 115–126.
- Antoun, H.D., y D. Prevost. 2006. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Z.A. Siddiqui, Editor, *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordrecht, pp. 1–38.
- Baldani, D.V.L., J. Silva Ferreira, K.R. dos Santos Teixeira, J.I. Baldani, y V. Massena Reis. 2008. Inoculants base don nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum* spp. And their application in tropical agriculture. 227-237. En: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Cassan, F D; García de Salamone, IE. Editores. Asociación Argentina de Microbiología, B.A. ISBN: 978-987-98475-8-9.
- Barea, J.M. 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Eds. Monzón de Asconegui, MA; García de Salamone, IE; Miyazaki; SS. Editorial FAUBA. Universidad de Buenos Aires. pp. 7-11.
- Bashan, Y., G. Holguin, y L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577
- Boddey, R.M., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, and J. Dobereiner. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant Soil*, 90: 265-292.
- Cassan, F.D., I.E. García de Salamone. 2008. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Bs.As. ISBN: 978-

987-98475-8-9.

Donald, C.M. 1968. The breeding of crop ideotypes. *Euphytica*, 17: 385-403.

García de Salamone, I.E. 1993. Effects of the inoculation with *Azospirillum* on plant growth and grain production of wheat and corn plants growing in field conditions at several sites of Buenos Aires. Taller sobre *Azospirillum*. Lab. Microbiol. Produccion Inoculantes. Montevideo, Uruguay.

García de Salamone, I.E., y J. Dobereiner. 1993. Asociacion "Azospirillum-maiz": Analisis de consistencia en la respuesta sobre rendimiento y absorción de nitrógeno. (390-391). XX Reunión Arg. Fisiol Veg. SC Bariloche. Rio Negro. SAFV-Universidad Nacional del Sur.

García de Salamone, IE., y J. Dobereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. & Fertil. Soils* 21: 193-196.

García de Salamone, Cassan. 2010. Primer Taller Internacional sobre Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable. 21 y 22 de Octubre, SOMEVE, Buenos Aires, Argentina, DIMAYA-AAM. ISBN. 978-987-9260-78-4.

García de Salamone, IE., y M.A. Monzón de Asconegui. 2008. Ecofisiología de la respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en cultivos de cereales. pp. 209-226. En: *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Editores: F Cassan y IE García de Salamone.

García de Salamone, I.E., M.A. Monzón de Asconegui, M. Zanchetti, J. Ducos, J. Sarandon, y B. Michelini. 1989. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre cultivos de maíz creciendo en la provincia de Buenos Aires. X Reunión Latinoamericana y XVIII Reunión Nac. Fisiol Veg. Puerto Iguazú, Misiones.

García de Salamone, I.E., N. Laballos, y M.A. Monzón de Asconegui. 1990. Respuesta a la Inoculación con *Azospirillum brasilense* de *Triticum aestivum* L. cv. Buck Pucara en condiciones de campo. II Cong. Nac. Trigo I (111-117). Pergamino, BA, 17-19/10. AIANBA.

García de Salamone I.E., M.A. Monzón de Asconegui, M. Zawosnik, y M. Zanchetti. 1992. Respuesta de tres Híbridos Comerciales de Maíz a la Inoculación con *Azospirillum*. *Turrialba* 42:3, 359-364.

García de Salamone, I.E., J. Dobereiner, S. Urquiaga, and R.M. Boddey. 1996. Biological Nitrogen Fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. *Biol. & Fertil. Soils* 23: 249-256.

García de Salamone, I.E., R.K. Hynes, and L.M. Nelson. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47, 404-411.

García de Salamone, I.E., M. Rorig, F. Bordato, y R. Michelena. 2004. Actividad microbiana luego de la aplicación de compactación sobre un suelo Haplustol éntico bajo siembra directa. En: XVI y XII Congresos latinoamericano y colombiano de la ciencia del suelo. Cartagena de Indias. Colombia. (pp.27/9-1/10).

García de Salamone, I.E., F. Bordato, y R. Michelena. 2005. Indicadores microbianos de calidad de suelo luego de la aplicación de compactación sobre un suelo Haplustol éntico bajo siembra directa. V Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y V Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, San Salvador de Jujuy, Argentina. 6-8 de Julio.

García de Salamone, I.E., M. Rorig, L. Di Salvo, y R. Michelena. 2006. Comunidades microbianas en capas superficiales de un suelo Haplustol éntico bajo siembra directa. XX Congreso

Argentino de la Ciencia del Suelo. Salta, Argentina. 19-22 de Setiembre.

- García de Salamone, I.E.; Michelena, R; Rodríguez, A; Montemitoli, I; Gatti, S; Rorig, M. 2006. Ocurrencia de micorrizas vesículo arbusculares en plantas de maíz, soja y trigo en sistemas de siembra directa. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 26 (1): 67-72.
- García de Salamone, I.E., L.P. Di Salvo, J.S. Escobar Ortega, y A.E. Tovagliari. 2007. Respuesta del cultivo de arroz a la inoculación con *Azospirillum* y fisiología de las comunidades bacterianas rizosféricas. VI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y VI Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 4-6 de Julio. ISBN:978-950-665-438-2.
- García de Salamone, I.E., L.P. Di Salvo, J.S. Escobar Ortega, M.P. Boa Sorte, S. Urquiaga, and K.R. Dos Santos Teixeira. 2010. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. Plant and Soil DOI: 10.1007/s11104-010-0487-y.
- García de Salamone, I.E., J.S. Escobar Ortega, M. Gatica, L.P. Di Salvo, M.V. Vilches, M.M. Zubillaga, and S. Urquiaga. 2009. Effect of *Azospirillum* inoculation on N-cycling microorganisms associated with rice and wheat crops. 16th Nitrogen Workshop, <http://www.nitrogenworkshop2009.org/>. Turin, Italy 28/6 al 1/7.
- Gatica, S.M., M.B. Anzovini, L.P. Di Salvo, J.S. Escobar Ortega, y I.E. García de Salamone. 2009. Inoculación de arroz con *Azospirillum brasilense*: Incremento en rendimiento con impacto reversible sobre las comunidades microbianas nativas. VII Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del Suelo y Fijación Biológica del Nitrógeno. San Miguel de Tucumán, Tucumán, 1-3 de Julio. REBIOS.
- Naiman, A.D., A.E. Latronico, I.E. García de Salamone. 2009. Inoculation of Wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. European Journal of Soil Biology 45:44-51. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.11.001. ISSN:1164-5563
- Okon, Y. And C.A. Labandera. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26:1591-1601.
- Reed, M.L.E., and B.R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86:1-25.
- Urquiaga, S. C.P. Jantalia, B.J. R. Alves, R. M. Boddey. 2004. Importancia de la FBN en el secuestro de carbono en el suelo y en la sustentabilidad agrícola. En: Biología del Suelo. Transformación de la materia orgánica. Usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editores: Monzón de Asconegui, M; García de Salamone, I; Miyazaki, S. FAUBA