

**CO-INOCULACION EN SOJA (Glicyne max) CON
BRADYRHIZOBIUM japonicum Y AZOSPIRILLUM brasilense**

Autor

Ing. Agrónomo : Ferlini, Hugo A.

Lugar de trabajo

Santa Clara de Saguier - (Departamento Castellanos- Pcia. de Santa Fe)

Dirección - Código Postal - Ciudad - País

Mariano Moreno 350 - (2405) Santa Clara de Saguier
Santa Fe – Argentina

Teléfono / Fax / E-Mail

03492-490444 / 15668255

hferlini@hotmail.com

-Abstract

The legumes species co-inoculation with bacteria of the kind Rhizobium and Azospirillum, produces an important increase in the nodulación and in its development radicular that, impacts directly in a greater absorption of water and nutrients, this impacts in a benefit of performance. In this work they apply different combinations of both bacteria, like inoculantes, to the seeds of soy (Glycine max), being established in flowerpots, taking as reference a witness that was not inoculated, to determine a relation among the dose applied and the following variables: velocity of emergency, weight radicular, weight of air part of the plant, number of early, number of grains by early and weight of the grains obtained In those plants. The systematic observation and the relevamiento of data conduct to interesting conclusions as for the adequate dose to achieve the maximum performance, that permit to confirm the hypothesis of work.

La co-inoculación de especies leguminosas con bacterias del género Rhizobium y Azospirillum, produce un aumento importante en la nodulación y en su desarrollo radicular que, incide directamente en una mayor absorción de agua y nutrientes, esto redundando en un beneficio de rendimiento. En este trabajo se aplican diferentes combinaciones de ambas bacterias, como inoculantes, a la semillas de soja (Glycine max), implantándose en macetas, tomando como referencia un testigo que no fue inoculado, para determinar una relación entre las dosis aplicadas y las siguientes variables : velocidad de emergencia, peso radicular, peso de parte aérea de la planta , número de chauchas, número de granos por chaucha y peso de los granos obtenidos en esas plantas. La observación sistemática y el relevamiento de datos conducen a conclusiones interesantes en cuanto a las dosis adecuadas para lograr el máximo rendimiento, que permiten confirmar las hipótesis de trabajo

- Marco Teórico / Fundamentación

Las bacterias simbióticas y asimbióticas en la producción vegetal, han sido estudiadas intensamente, desde los años '70. Una amplia revisión sobre los resultados de los experimentos desarrollados entre los años 1974-1994 fue realizada por Okon y Labandera que reveló que, el éxito de la inoculación fue en el rango del 60 al 70% de los experimentos realizados en suelos y regiones climáticas diferentes, con incrementos significativos, generalmente en el rango del 10 al 30%, en el rendimiento de los cultivos. (Caballero Mellado, 1997).

Considerando la cantidad de variedades, cultivos, suelos y condiciones climáticas evaluadas, los resultados de la inoculación con Azospirillum reflejan claramente la capacidad de la bacteria para promover el desarrollo de las plantas y el impacto positivo sobre el rendimiento de los cultivos de grano. (Caballero Mellado, 1997).

El desarrollo de esta práctica dio inicio a la era de la BIOFERTILIZACIÓN que, "es la manera de suministrar a las plantas algún nutriente que ellas necesitan para su crecimiento, mediante un proceso biológico en el que intervienen diferentes microorganismos"

La inoculación mixta de leguminosas con bacteria simbióticas y asimbióticas, representa la utilización de combinaciones de diferentes microorganismos, los cuales producen un efecto sinérgico, en el cual se superan los resultados productivos obtenidos con los mismos, en forma independiente.

Las interacciones biológicas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con otras bacterias del suelo, han sido objeto de interés, dada su evidente repercusión económica. Esto es consecuencia de la potenciación de la nodulación y del mayor crecimiento que experimentan las leguminosas forrajeras y de grano, en respuesta a la interacción positiva entre las bacterias simbióticas y las bacterias diazótroficas del suelo y la rizósfera, en especial las pertenecientes al género *Azospirillum*.

Estas combinaciones de bacterias aplicadas a las semillas de los cultivos, han redundado en mayor producción vegetal, lo cual se asociaba en forma directa a la mayor fijación de N₂ que, estos microorganismos producen. En los casos donde se ha utilizado *Azospirillum brasilense*, está demostrado que el efecto beneficioso de la asociación, se debe mayoritariamente a la capacidad que posee la bacteria de producir fitohormonas que determinan un mayor desarrollo del sistema radical, y por lo tanto, la posibilidad de explorar un volumen más amplio de suelo.

El género *Azospirillum* está incluido dentro del grupo de bacterias PGPRs (Plant Growth Promoting Rizobacterias), bacterias promotoras del desarrollo vegetal. Burdmann et.al.(2000), manifiesta que la estimulación de la nodulación posterior a la inoculación, de leguminosas, con *Azospirillum brasilense* puede estar dada por el incremento en la inducción de la producción de genes Nod, de raíces laterales, de la densidad de los pelos radicales y las ramificaciones de dicho pelos.

De este modo la inoculación combinada de *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*, incrementa los rendimientos de las leguminosas, también bajo condiciones limitadas de agua y de nitrógeno.

Burdmann (1999-2000) experimentando a campo con *Azospirillum brasilense*, ha demostrado un incremento en los rendimientos de las leguminosas con inoculación mixta, obteniendo rindes superiores a los obtenidos con la inoculación de *Rhizobium/Bradyrhizobium* solos. Estos resultados coinciden con los citados por Okon y Vanderleyden (1997), los cuales reportan un efecto positivo para diversos tipos de leguminosas.

Otros autores mencionan que, los organismos rizosféricos juegan un papel importante en la agricultura, ya que poseen la capacidad de descomponer y reciclar elementos que son inutilizables en su estado natural e incluso establecer entre sí relaciones que pueden conducir a la protección contra patógenos. Estos organismos son capaces de influir positivamente sobre la germinación de semillas y en el desarrollo posterior de las raíces.

No obstante los resultados obtenidos en la inoculación combinada de leguminosas, dicha respuesta puede tanto estimular como inhibir la formación de nódulos y el crecimiento en un sistema simbiótico

dado, dependiendo del nivel de concentración del inóculo y del engranaje de inoculación. Es preciso efectuar una adecuada selección de las cepas diazótroficas compatibles y aplicarlas en la relación celular óptima. La dirección y magnitud de los efectos están fuertemente influenciados por la elección de las cepas y la densidad molecular (UFC ml⁻¹).

A los fines de determinar la óptima relación de cepas para el cultivo de soja (*Glycine max*), se procedió a evaluar diferentes relaciones y determinar la de mejor eficacia productiva.

Hacen falta, aún, muchos estudios de investigación básica, tanto sobre la bacteria como en su interacción con la planta, para un mejor entendimiento de la asociación *Azospirillum*-planta.

- **Objetivos**

- Probar diferentes relaciones de dosificaciones en la coinoculación de soja (*Glycine max*), evaluando los efectos que las diferentes combinaciones producen en esta leguminosa.
- Verificar, comprobar y medir los efectos de la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y de la co-inoculación con *Azospirillum brasilense* en las leguminosas, en relación a velocidad de emergencia, desarrollo radicular, desarrollo de parte aérea de las plantas y rendimiento (número de chauchas, número de granos y peso).

- **Hipótesis**

- **H1** : Las leguminosas, en este caso soja (*Glycine max*), responden de diferente manera a los diferentes tratamientos de inoculación y co-inoculación.
- **H2** : La co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense*, incrementa la velocidad de emergencia de la soja.
- **H3** : La co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense*, incrementa los rendimientos (5 a 30%) de las leguminosas.
- **H4** : La inoculación con *Azospirillum brasilense* produce un observable aumento en el desarrollo radicular.

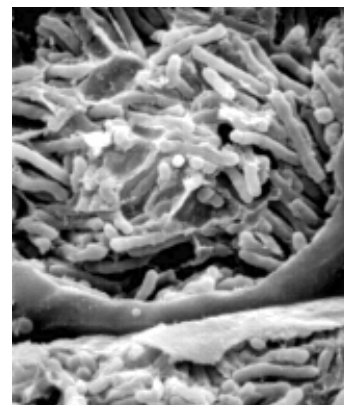
Palabras claves :

Inoculación de semillas : Agregar una sustancia a un organismo determinado con el objetivo de modificar alguna de sus conductas o reacciones. Se trata de una práctica agrícola destinada a incorporar bacterias fijadoras de nitrógeno a las semillas o al suelo en el momento de la siembra con el objeto de proveer una cantidad apropiada de bacterias en la raíz y/o rizósfera de una planta. De esta manera la planta obtendrá de manera simbiótica y/o asimbiótica con las bacterias, los nutrientes necesarios para su desarrollo.

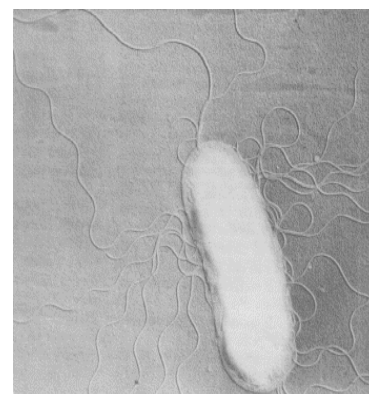
Co-inoculación de semillas : Agregar una combinación de sustancias a un organismo determinado con el objetivo de modificar alguna de sus conductas o reacciones.

Leguminosas : Incluyen unas 18.000 especies distribuidas en aproximadamente 750 géneros entre las que se cuentan la soja (*Glycine max*), la alfalfa (*Medicago sativa*), los tréboles (género *Trifolium* sp, *Melilotus* sp. Etc.) y las que producen las arvejas (*Vicia* sp) o porotos (*Phaseolus* sp). Son esenciales para mantener el balance de nitrógeno del suelo debido a su capacidad de albergar bacteria, fijadoras biológicas de nitrógeno atmosférico.

Rhizobium: El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. De acuerdo con la definición aceptada de especie en bacteriología, cada especie de rizobios consta de un grupo de cepas que comparten características que las distinguen como grupo, de otros grupos de bacterias. Hasta la fecha se han propuesto 6 géneros, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.



Azospirillum: rizobacteria fijadora de N_2 , y promotora del crecimiento vegetal (PGPR) que está presente en el suelo o asociada a raíces de cereales, gramíneas y otras especies cultivadas. El género está compuesto por 5 especies: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopreferans*, *A. irakense* y *A. lipoferum*. Las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*.



Indicadores de variables o parámetros a observar.

- Velocidad de emergencia
- Peso de raíces
- Peso parte aérea
- Rendimiento : determinado a partir de la proyección a ha del N° de chauchas, N° de granos y peso de los 1000 granos.

- *Materiales y Métodos/ Diseño experimental*

- **Metodología empleada** : Ensayo en macetas con observación sistemática permanente.
- **Fecha de siembra** : 04/09/04
- **Variedad utilizada** : A ASGROW 8000 RG - (Grupo VIII)
Destacada adaptación a distintos ambientes.
Tipo de crecimiento : Determinado

- **Dosis de Inoculante y de co-inoculante** : Los diferentes trabajos consultados, sobre el tema, mencionan la importancia de la relación entre la cantidad de *Bradyrhizobium japonicum* y de *Azospirillum brasilense*. Para corroborar o refutar estas afirmaciones se considerarán diferentes combinaciones de bacterias.

- **Cepas**: *Azospirillum brasilense* AZ 39 INTA
Bradyrhizobium japonicum (Cepa Comercial)

- **Preparación de las macetas** : Se utilizan 10 (diez) macetas con tierra extraída de un lote con antecedente soja (*Glycine max*) con un año de reposo . En cada maceta se sembraron 4 (cuatro) semillas, con las siguientes variantes:
 1. (T0) - Testigo – Soja sin inoculación
 2. (TB) - Soja con *Bradyrhizobium japonicum* solo (dosis comercial)
 3. (TA) - Soja con *Azospirillum brasilense* solo (dosis personal)
 4. (TBA1)
 5. (TBA2)
 6. (TBA3)
 7. (TBA4)
 8. (TBA5)
 9. (TBA6)
 10. (TBA7)

} Diferentes combinaciones de ambas bacterias con diferentes proporciones

- Resultados y discusión

En la bibliografía consultada, se menciona que durante los primeros estadíos no existen diferencias apreciables, tan solo en el número de raíces secundarias y en el número de raicillas. Luego de los 50 días, recién se empiezan a diferenciar los diferentes tratamientos. El presente trabajo, abarca desde la siembra hasta que el cultivo llegue a su maduración total. La investigación amerita observación sistemática permanente, mediante ficha de seguimiento para cada maceta registrando todo dato que resulte significativo.

- 1 ° Observación/ evaluación

DÍAS DE SIEMBRA A EMERGENCIA

1. (T0) Asomando a los 8 días
2. (TB) Asomando a los 7 días
3. (TA) Asomando a los 5 días
4. (TBA1) Asomando a los 6 días
5. (TBA2) Asomando a los 6 días
6. (TBA3) Asomando a los 6 días
7. (TBA4) Asomando a los 6 días
8. (TBA5) Asomando a los 7 días
9. (TBA6) Asomando a los 6 días
10. (TBA7) Asomando a los 6 días

- 2º Observación/evaluación : determinación de altura de las plántulas (en centímetros) tomada a los 16 días de sembradas. (20/09/2004)

1. (T0)	3.5 - 5.0 - 6.5 -	Promedio : 5.00
2. (TB)	5.7 - 6.5 - 5.6 - 4.0	Promedio : 5.45
3. (TA)	7.9 - 8.0 - 7.5 - 6.5	Promedio : 7.47
4. (TBA1)	7.6 - 7.0 - 7.5 - 7.2	Promedio : 7.32
5. (TBA2)	7.0 - 9.5 - 7.5 - 7.5	Promedio : 7.87
6. (TBA3)	6.8 - 5.6 - 6.2 - 6.3	Promedio : 6.22
7. (TBA4)	7.0 - 5.4 - 4.9 - 5.4	Promedio : 5.67
8. (TBA5)	5.6 - 7.0 - 4.5 - 7.0	Promedio : 6.02
9. (TBA6)	8.0 - 6.7 - 6.5 - 5.7	Promedio : 6.72
10. (TBA7)	7.0 - 5.3 - 5.6 - 6.0	Promedio : 5.97

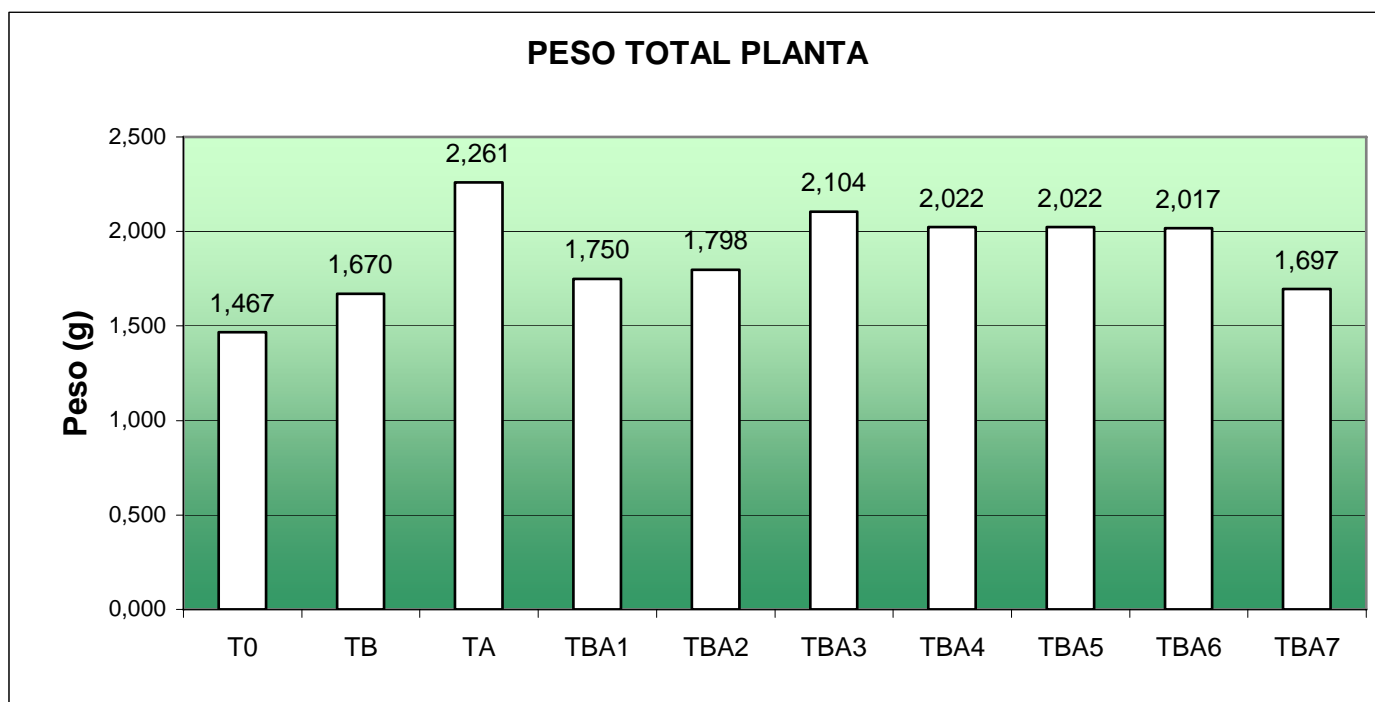
La altura fue tomada con el brote apical extendido - promedio de altura de los tratamientos de inoculación combinada - 6.51 cmts.

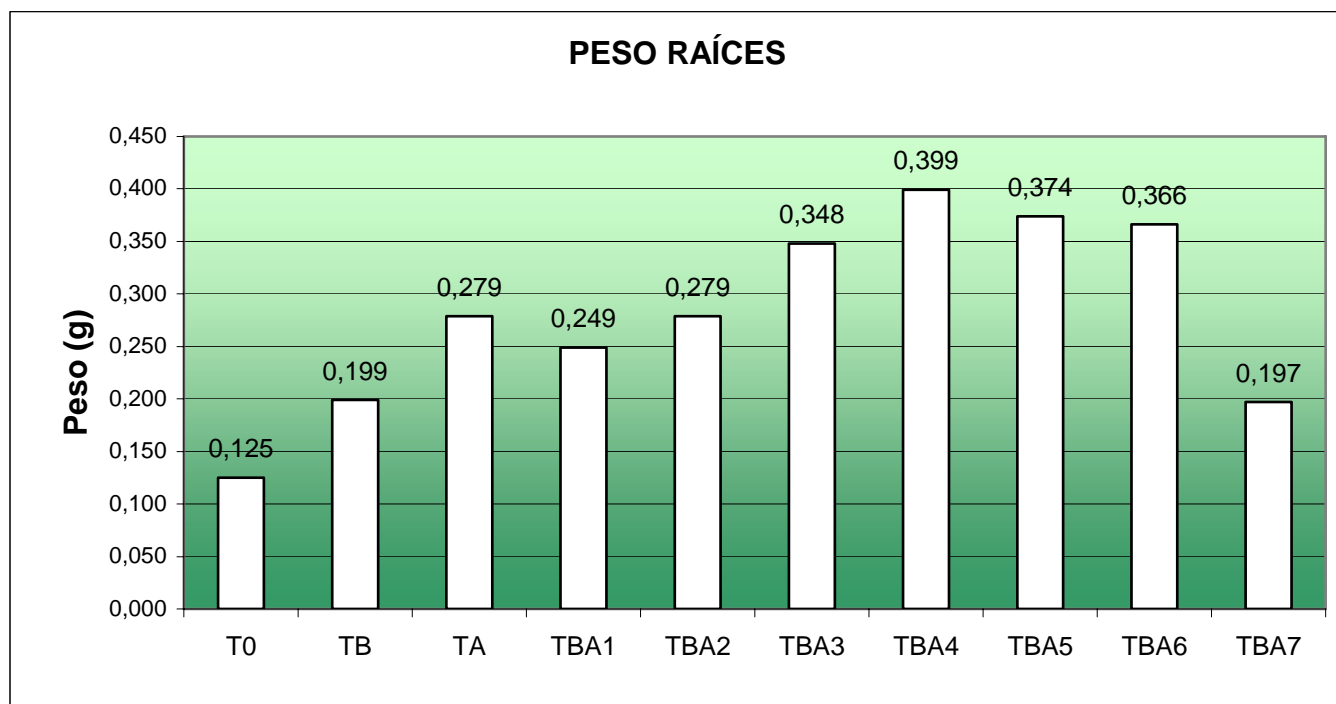
Se extrajo una planta al azar de cada maceta y se tomaron los pesos que se detallan en la siguiente tabla

DETERMINACION DE PESO DE PLANTA ENTERA, PARTE AÉREA Y RAÍCES:

Muestra tomada el día 20/09/2004 a los 16 días de sembrada (muestra con humedad)

TRATAMIENTO	PESO TOTAL PLANTA (g)	PESO PARTE AÉREA (g)	PESO RAÍCES (g)	DIFERENCIA P.AÉREA (%)	DIFERENCIA RAÍCES (%)
T0	1.467	1.342	0.125		
TB	1.670	1.471	0.199	+ 10	+ 59
TA	2.261	1.982	0.279	+ 47	+ 223
TBA1	1.750	1.501	0.249	+ 12	+ 99
TBA2	1.798	1.519	0.279	+ 13	+ 223
TBA3	2.104	1.756	0.348	+ 30	+278
TBA4	2.022	1.623	0.399	+21	+319
TBA5	2.022	1.648	0.374	+ 23	+299
TBA6	2.017	1.651	0.366	+ 23	+293
TBA7	1.697	1.500	0.197	+ 12	+57





Las mediciones se tomaron de los ejemplares recién extraídos (muestra con humedad)

Las diferencias se tomaron en relación al testigo al que se lo consideró como base 100.

Los datos de las muestras T0, TB, TA , TBA1, TBA2, TBA3 TBA5, y TBA7 se tomaron el día 21/09/2004.

Los datos de las muestras TBA4 y TBA6 se tomaron el día 22/09/2004.

En ninguno de los tratamientos se visualizaron nódulos.

Otros registros

22/09/2004

Comienzo del estrés hídrico en las muestras TBA6 y TBA7

26/09/2004

Finalización del estrés hídrico en las muestras TBA6 y TBA7

27/09/2004

Transplante de la totalidad de las muestras a recipientes de mayor volumen de tierra, proveniente del mismo sector de suelo.

11/10/2004

Aparecen las primeras flores en TB y TA

16/10/2004

Se advierten las primeras chauchas en TB, TA y TBA3

3º Observación / evaluación : determinación de altura de las plantas (en centímetros) tomada a los 30 días de sembradas. (04/10/2004)

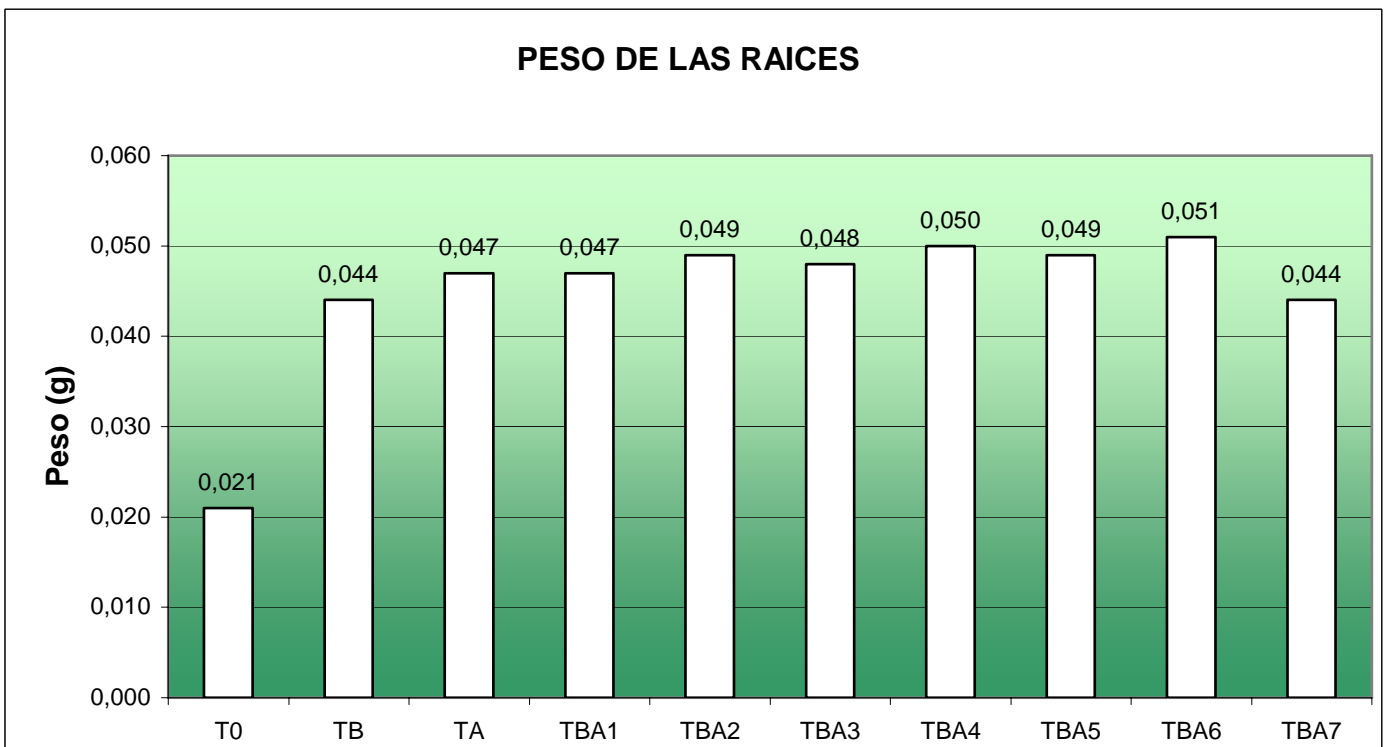
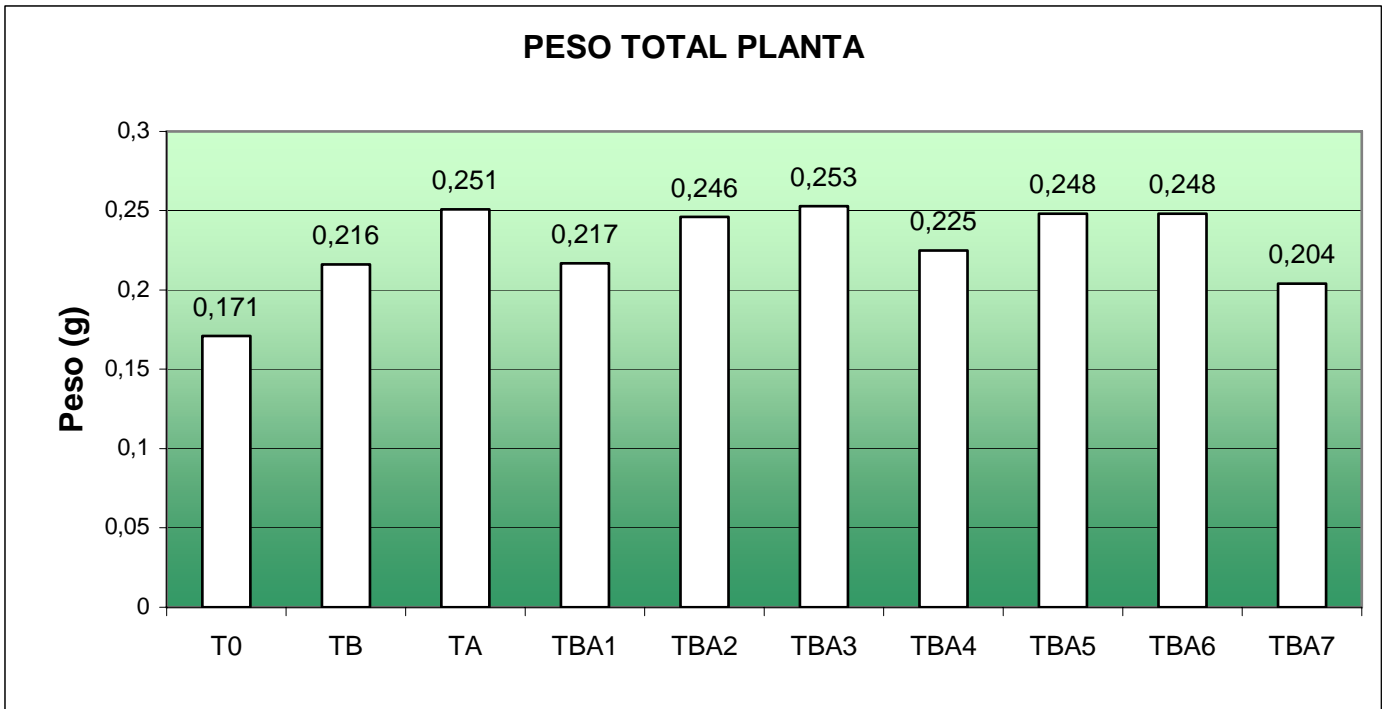
1.	(T0)	9.5 - 10.5	Promedio : 10.00
2.	(TB)	15.0 - 10.0 - 10.0	Promedio : 11.70
3.	(TA)	14.3 - 14.0 - 14.5	Promedio : 14.30
4.	(TBA1)	14.9 - 14.4 - 15.5	Promedio : 14.80
5.	(TBA2)	14.8 - 13.0 - 15.5	Promedio : 14.40
6.	(TBA3)	13.5 - 13.2 - 14.5	Promedio : 13.80
7.	(TBA4)	13.3 - 11.5	Promedio : 12.40
8.	(TBA5)	12.3 - 15.0 -13.5	Promedio : 13.60
9.	(TBA6)	11.5 - 11.1 -12.1	Promedio : 11.60
10.	(TBA7)	10.3 - 8	Promedio : 9.15

La altura fue tomada con el brote apical extendido - promedio de altura de los tratamientos de inoculación combinada = 12.82 cm

DETERMINACION DE PESO DE PLANTA ENTERA, PARTE AÉREA Y RAÍCES:

Muestra tomada el día 20/09/2004 a los 16 días de sembrada (muestra seca)

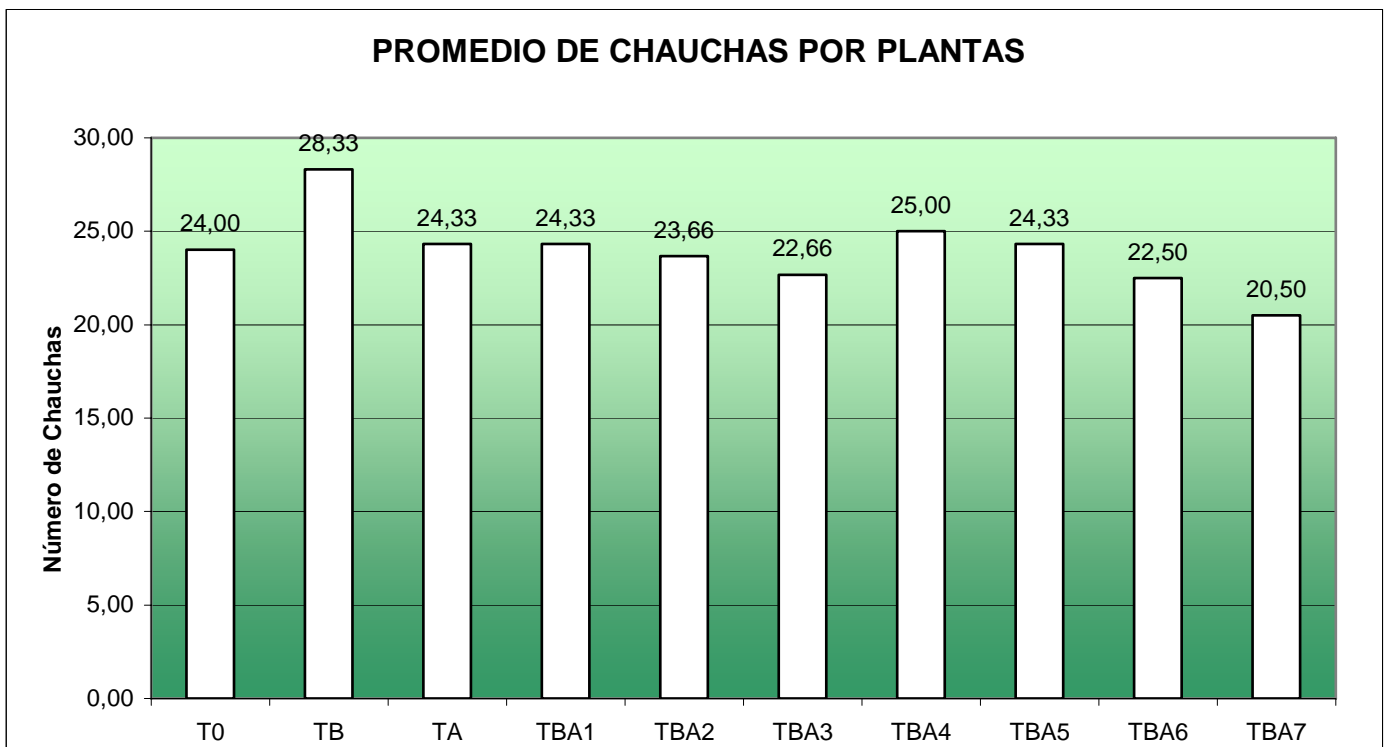
TRATAMIENTO	PESO TOTAL PLANTA (g)	PESO PARTE AÉREA (g)	PESO RAÍCES (g)	DIFERENCIA P.AÉREA (%)	DIFERENCIA RAÍCES (%)
T0	0.171	0.147	0.021		
TB	0.216	0.173	0.044	+18	+209
TA	0.251	0.204	0.047	+39	+224
TBA1	0.217	0.156	0.047	+6	+224
TBA2	0.246	0.194	0.049	+32	+233
TBA3	0.253	0.201	0.048	+37	+229
TBA4	0.225	0.173	0.050	+18	+238
TBA5	0.248	0.203	0.049	+38	+233
TRA6	0.248	0.197	0.051	+34	+243
TRA7	0.204	0.173	0.044	+18	+209

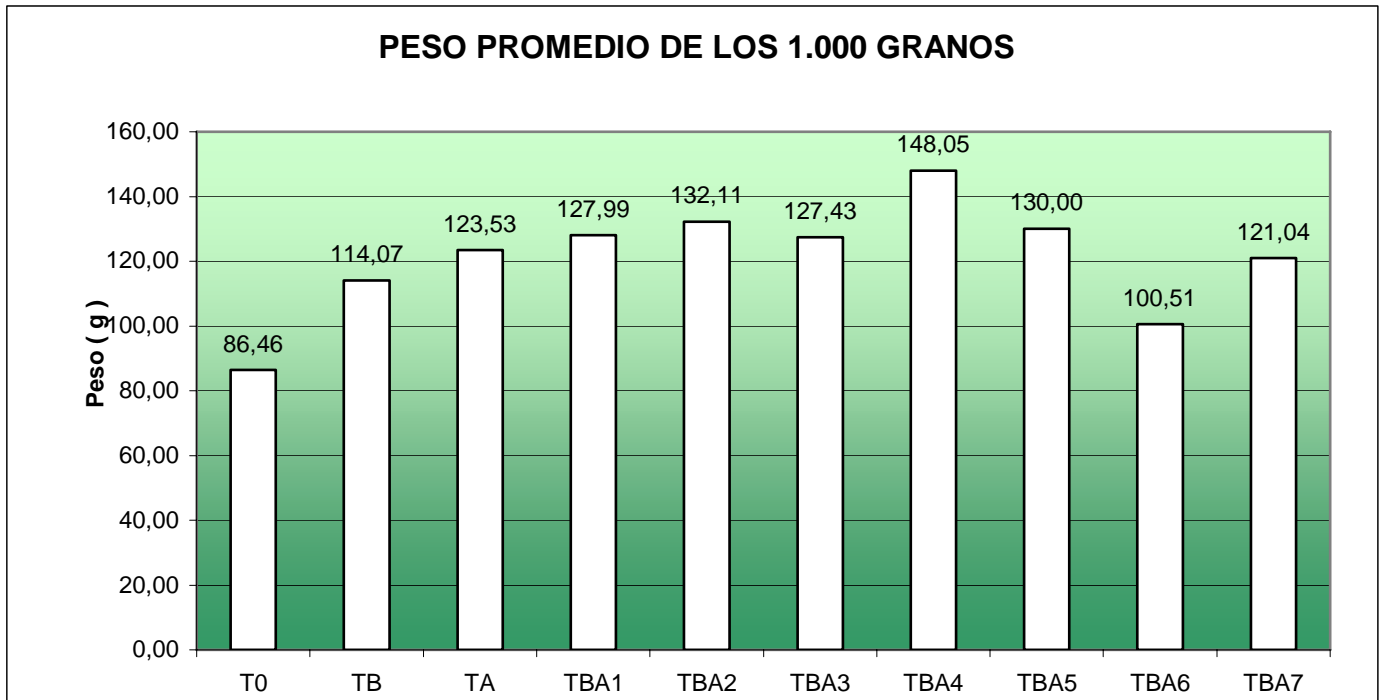


4º Observación/ evaluación

El 26/12/2004 se procedió a cosechar en forma manual todas las plantas que quedaban en las macetas, determinándose los siguientes resultados.

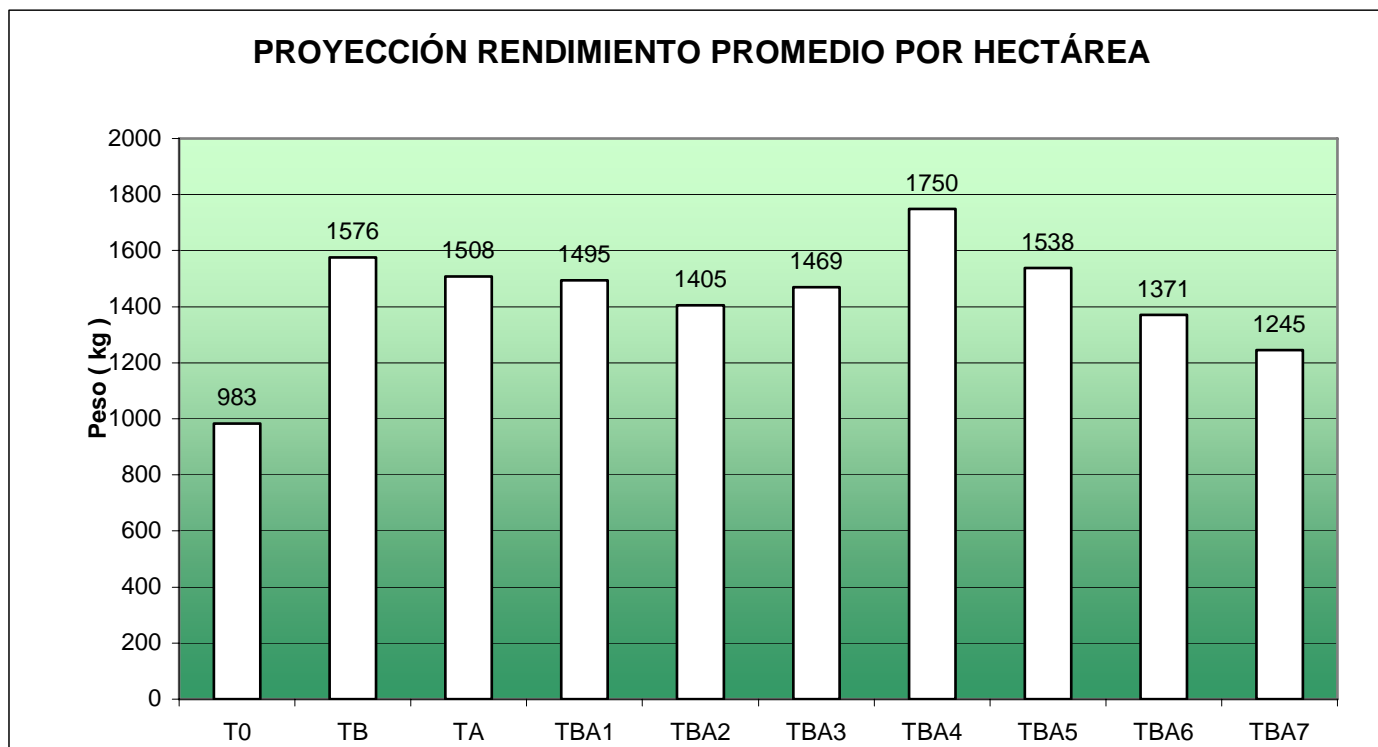
TRATAMIENTO	Nº de plantas	Nº de total de chauchas	Promedio de chauchas p/planta	Nº de Total Granos	Promedio de granos p/chaucha	Peso de 1000 granos (gramos)
T0	2	48	24.00	74	1.54	86.46
TB	3	85	28.33	135	1.58	114.07
TA	3	73	24.33	116	1.58	123.53
TRA1	3	73	24.33	115	1.57	127.39
TRA2	3	71	23.66	104	1.46	132.11
TRA3	3	68	22.66	113	1.66	127.43
TRA4	2	50	25	77	1.54	148.05
TRA5	3	73	24.33	102	1.39	130.00
TRA6	2	45	22.50	77	1.71	100.51
TRA7	2	41	20.50	67	1.63	121.04





Tomando como base, los datos obtenidos permiten proyectar el rendimiento considerando 16 plantas m^{-1} lineal y a una distancia de siembra de 0.52 m de entresurcos.

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO Kg ha^{-1}	RELACIÓN PORCENTUAL RESPECTO DE T0	RELACIÓN PORCENTUAL RESPECTO DE TR
T0	983	100.00	62.37
TB	1576	160.32	100.00
TA	1508	153.40	95.68
TRA1	1495	152.08	94.86
TRA2	1405	142.92	89.14
TRA3	1469	149.44	93.21
TRA4	1750	178.02	111.04
TRA5	1538	156.45	97.58
TRA6	1371	139.47	86.99
TRA7	1245	126.65	78.99



-Conclusiones

Las observaciones confirman que las leguminosas, en este caso soja (*Glycine max*), responden de diversas maneras a las diferentes combinaciones de inoculantes.

La velocidad de emergencia en las plantas coinoculadas es mayor, dado que emergen entre 1 o 2 días antes, lo que significa una diferencia de entre el 25% a 40% superior al testigo, sobre todo en las plantas tratadas con *Azospirillum brasilense*.

Los datos tabulados permiten confirmar el aumento de desarrollo radicular en las plantas co-inoculadas con *Azospirillum brasilense*, que en la mayoría de los casos sobrepasan el 200%.

Se determina además que el mayor desarrollo radicular no siempre significa un mayor rendimiento.

Los datos obtenidos en el presente ensayo, confirman la importancia de las proporciones en la combinación de bacteria simbióticas y asimbióticas en la inoculación de semillas de soja (*Glycine max*).

Algunas imágenes del ensayo



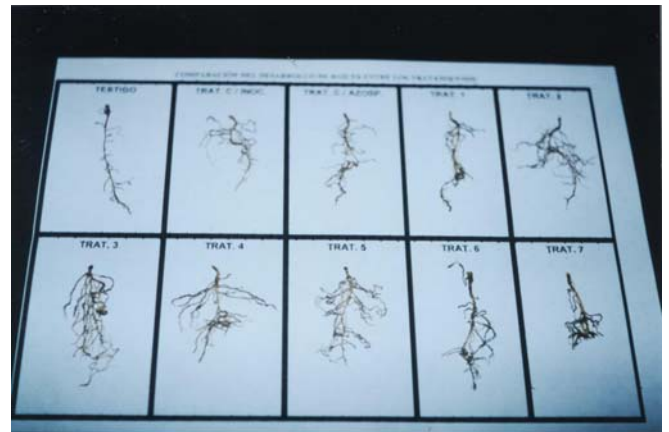
T0 Y TA a los 16 días de implantada. Diferencia visual en el desarrollo de plántulas.



T0 - T1 y T3, diferencia visual en el desarrollo y estructura radicular.



T1 - T2 y TA diferencia visual en el desarrollo y estructura radicular.



Cuadro comparativo de los desarrollos y estructuras radiculares según diferentes combinación de bacterias.

Bibliografía

- Okon, Y y Vanderleyden, J. "Root associated Azospirillum species can stimulate plants". ASM News 63 (7) - 1997: 364-370
- Burdmann, S.; Hamaoui, B. y Okon, Y. - 2000 - " Improvement of legume crop yields by co-inoculation with Azospirillum and Rhizobium". The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel.
- Groppa, MD., Zawoznik, M.S., Tomaro M.L. (1999) " Co-inoculación de plántulas de soja con Bradyrhizobium japonicum y Azospirillum brasilense. Efecto sobre la fijación y asimilación de nitrógeno atmosférico. Acta de la 2ª Reunión Científico Técnica de Biología del Suelo del NOA, 323-325.
- Rotela Daniel A.; Iglesias, María C.; Díaz, Irma.; Micelli, Gabriel E. "Inoculación y co-inoculación con Azospirillum sp en algodón Var. Guazuncho". Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE - Corrientes.
- Rodelas María Belén; González J.; Martínez, M.V.; Pozzo, C. Y Salmerón, V. 1999 - Influence of Rhizobium - Azospirillum and Rhizobium - Azotobacter combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.)
En: (<http://link.springer.ny.com/link/service/journals/00374/bibs/9029002/90290165.htm>)
- Rodelas María Belén - 2001 - Interacción Rhizobium-Azospirillum y Rhizobium-Azotobacter. Efecto sobre la Nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en *Vicia faba*.
En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ecología/Rodelas.htm>)
- Roldán Torres Gutierrez(1), Elena Miguelina Soria Arteaga(1), Carlos Perez Navarro(2), Juliana García Izquierdo(3). Incremento de la fijación biológica de nitrógeno mediante la inoculación combinada de bacteria fijadoras de nitrógeno atmosférico.
- Facultad de Ciencias Agropecuarias UCLV. Carretera a Camajuamí Km 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara. CUBA. CP 54830
- Centro de Investigación Agropecuarias UCLV, Carretera a Camajuamí Km 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara. CUBA. CP 54830
- Centro de Desarrollo Agrícola de las FAR, AGROFAR. Santo Domingo, Villa Clara. CUBA.