

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Azospirillum* EN GRAMÍNEAS PROMISORIAS BAJO CONDICIONES DE CASA DE CRISTAL

Madeline Pereira, R. Rolo, O. Rodríguez y Vivian Ávila

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

Se realizó un estudio en macetas con suelo Ferralítico Rojo bajo condiciones de casa de cristal, con el objetivo de seleccionar cepas de *Azospirillum* que permitan incrementar los rendimientos y el contenido de nitrógeno en dos gramíneas promisorias: *Panicum maximum* cv. Likoni y *Chloris gayana* cv. Callide. Ambas especies fueron inoculadas con cinco cepas de *Azospirillum* y se empleó un control sin fertilizar. Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con cinco réplicas. Fueron estudiadas cuatro variables: peso seco foliar, peso seco de la raíz, altura y contenido de nitrógeno y se calcularon los índices de efectividad y respuesta a la inoculación. La cepa K-19 resultó la más efectiva para el rhodes al producir un incremento en el rendimiento de un 36% y de un 134% en el contenido de nitrógeno. En la guinea se seleccionaron las cepas K-19 y Br-17, que produjeron incrementos en los rendimientos de un 95 y 120% respectivamente y para el contenido de nitrógeno de 39 y 22% respectivamente. Se recomienda estudiar una dosis de inoculación más baja en la guinea y continuar estos estudios en condiciones de campo.

Palabras claves: *Cepas, Azospirillum, Panicum maximum* cv. Likoni, *Chloris gayana* cv. Callide, inoculación, efectividad

A pot experiment was conducted in a Red Ferralitic soil in order to select *Azospirillum* strains to increase DM yield and N content in two grasses: *Panicum maximum* cv. Likoni and *Chloris gayana* cv. Callide. Five *Azospirillum* strains were inoculated in both species; a control without fertilizer was employed in a total randomized block design and five replications. Dry matter yield, root dry weight, plant height, N content, effectiveness and response inoculation index were determined. K-19 strain was the most outstanding for rhodes grass and produced an increase of 36 and 134% in the yield and N content respectively. K-19 and Br-17 strains were selected for guineagrass. These strains produced increments in dry matter yield (95 and 120%) and in N content (39 and 22%). It is recommended to study a lower inoculation rate in guineagrass and to continue these experiments under field conditions.

Additional index words: *Strains, Azospirillum, Panicum maximum* cv. Likoni, *Chloris gayana* cv. Callide, inoculation, effectiveness

Panicum maximum y *Chloris gayana* son gramíneas originarias de África tropical, subtropical y del Sur respectivamente, la primera naturalizada y cultivada en todo el trópico por su gran adaptabilidad a una amplia gama de suelos; la segunda, aunque más selectiva en cuanto a características del suelo, es también cultivada en muchos países como Australia, América del Sur y Central, Italia, Estados Unidos y el Caribe.

Teniendo en cuenta la gran limitación en el empleo de fertilizantes, este trabajo tuvo como objetivo la selección de cepas de un

microorganismo biofertilizante (*Azospirillum*) capaz de suplir en alguna medida la aplicación de fertilizantes químicos. A estas bacterias se les atribuyen dos efectos fundamentales: nitrofixador, pues son capaces de fijar el dinitrógeno atmosférico, y bioestimulador del crecimiento y desarrollo de las plantas. La inoculación de cepas eficientes de *Azospirillum* permite que las gramíneas puedan expresar, si no al máximo, de manera considerable su potencial de rendimiento, y por supuesto se dispondrá de un pasto de mayor calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se determinó bajo condiciones de casa de cristal la efectividad de cinco cepas de *Azospirillum* (K-3, K-19, Br-17, Sp-7 y G-4 nd) para dos especies de gramíneas: *P. maximum* cv. Likoni y *Ch. gayana* cv. Callide.

Suelo. El bioensayo se realizó en macetas sobre un suelo Ferralítico Rojo (Academia de Ciencias de Cuba, 1979) de la EEPF "Indio Hatuey", cuyas características químicas fueron descritas por Hernández (1985).

Tratamientos y diseño. Se empleó un diseño totalmente aleatorizado con seis tratamientos y cinco réplicas. Los tratamientos incluyeron las cinco cepas del microorganismo y un control sin inocular.

Preparación del inóculo. Inicialmente se preparó un preinóculo constituido por 100 ml de medio de crecimiento (Okon, Albrecht y Burris, 1977), en el cual se sembraron 2 azadas del microorganismo y se incubó a una temperatura de 35°C a 180 r/min durante 48 h; después se tomó 10 ml de este y se sembró en 90 ml del mismo medio incubándose a iguales condiciones durante 24 h.

Se tomó el suelo a una profundidad de 0-20 cm, el cual fu secado al aire, pasado por un tamiz de 0,6 cm y autoclaveado 1 hora a 1 atm, este se distribuyó a razón de 6 kg por maceta. Se sembró un grupo de semillas y cuando las plántulas alcanzaron una altura de 5 cm se raleó, quedando finalmente dos plantas por maceta.

La inoculación de las semillas se efectuó en el momento de la siembra añadiendo 1 ml del inóculo de concentración 10^7 sobre la semilla sembrada. Además se realizó una fertilización de fondo con 75 y 50 kg de fósforo y potasio/ha respectivamente.

Se hicieron mediciones de la altura con una frecuencia semanal. El corte fue realizado a las 9 semanas de haber efectuado la siembra y se extrajo el sistema radical de las plantas para realizar las mediciones correspondientes.

Se analizaron las variables: peso seco foliar (PSF), peso seco de la raíz (PSR), altura y contenido de nitrógeno (N); se utilizó la dódima de comparación múltiple de Dunnett (1955) para comparar los tratamientos con el control y la SNK (Newman-Keuls, 1952) para comparar los tratamientos superiores al control. Se calculó el índice de efectividad de la

inoculación (IEI) que es una expresión del incremento en los rendimientos y el índice de respuesta a la inoculación (IRI) que es una expresión del incremento en el contenido de nitrógeno de la planta.

$$IEI = \frac{R(\text{inoculado}) - R(\text{no inoculado})}{R(\text{no inoculado})} \times 100$$

$$IRI = \frac{N(\text{inoculado}) - N(\text{no inoculado})}{N(\text{no inoculado})} \times 100$$

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el comportamiento de las cinco cepas de *Azospirillum* con respecto al control sin inocular en el rhodes callide. Para la variable peso seco foliar se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos inoculados con las cepas K-3, K-19 y Br-17, para la altura y el contenido de nitrógeno se hallaron diferencias significativas solamente en un tratamiento, los inoculados con las cepas Br-17 y K-19 respectivamente, en la variable peso seco de la raíz se encontraron diferencias significativas para los tratamientos inoculados con las cepas K-19 y Br-17.

En la tabla 2 se observa el comportamiento de la efectividad de las cepas superiores al control, las cuales no difirieron entre sí.

La tabla 3 muestra los índices de efectividad y respuesta a la inoculación para el rhodes. En el primer caso se observó que los por cientos de incrementos en el rendimiento oscilaron entre un 23 y 36%; mientras que los incrementos en el contenido de nitrógeno se encontraron entre un 29 y 134%.

La tabla 4 refleja el comportamiento de las cinco cepas de *Azospirillum* inoculadas en la guinea likoni con respecto al control sin inocular. Se obtuvo diferencias significativas en el peso seco para todos los tratamientos inoculados; en el resto de las variables analizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

La efectividad de las cepas superiores al control sin inocular en el peso seco se muestra en la tabla 5, donde se observaron diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con la cepa Br-17 y los inoculados con las cepas K-3 y G-4 nd.

Tabla 1. Influencia del *Azospirillum* en rhodes cv. Callide.

| Tratamientos | PS (g) | Altura (cm) | N (mg) | PSR (g) |
|--------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Cepa K-3 | 18,00 ⁺ | 41,60 | 315,52 | 22,70 |
| Cepa K-19 | 18,70 ⁺ | 42,80 | 411,54 ⁺ | 34,15 ⁺ |
| Cepa Br-17 | 17,90 ⁺ | 50,40 ⁺ | 227,84 | 35,86 ⁺ |
| Cepa Sp-7 | 16,96 | 35,80 | 283,82 | 30,78 |
| Cepa G-4 nd | 17,56 | 41,80 | 294,44 | 25,26 |
| No inoculado | 13,78 | 38,20 | 175,28 | 24,44 |
| ES ± | 1,42 [*] | 3,89 [*] | 53,05 [*] | 2,80 [*] |

⁺Valores con superíndices difieren del no inoculado a P<0,05(Dunnet, 1955)

* P<0,05

Tabla 2. Efectividad de las cepas superiores al control sin inocular en rhodes.

| Cepas | PS (g) | Altura (cm) | N (mg) | PSR (g) |
|-------|--------------------|----------------|-----------|--------------------|
| K-3 | 18,00 ^a | - | - | - |
| K-19 | 18,70 ^a | - | 411,54 | 34,15 ^a |
| Br-17 | 17,90 ^a | 50,40 | - | 35,86 ^a |
| ES ± | 1,00 | 2,75 | 37,51 | 1,98 |

^a Valores con iguales superíndices no difieren entre sí a P<0,05 (Newman-Keuls, 1952)

Tabla 3. Índices de efectividad y respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en rhodes.

| Parámetros | Cepas | | | | |
|------------|-------|------|-------|------|--------|
| | K-3 | K-19 | Br-17 | Sp-7 | G-4 nd |
| IEI (%) | 31 | 36 | 30 | 23 | 27 |
| IRI (%) | 80 | 134 | 29 | 61 | 68 |

Tabla 4. Influencia de *Azospirillum* en guinea cv. Likoni.

| Tratamientos | PS (g) | Altura (cm) | N (mg) | PSR (g) |
|--------------|--------------------|----------------|-----------|------------|
| Cepa K-3 | 11,68 ⁺ | 52,80 | 235,62 | 23,76 |
| Cepa K-19 | 14,68 ⁺ | 53,20 | 296,44 | 25,60 |
| Cepa Br-17 | 16,58 ⁺ | 55,80 | 260,24 | 28,24 |
| Cepa Sp-7 | 14,60 ⁺ | 53,80 | 262,28 | 23,96 |
| Cepa G-4 nd | 12,80 ⁺ | 50,60 | 225,36 | 28,76 |
| No inoculado | 7,54 | 46,40 | 213,78 | 34,00 |
| ES ± | 1,36 [*] | 5,05 | 43,77 | 4,55 |

⁺Valores con superíndices difieren del no inoculado a P<0,05(Dunnet, 1955)

* P<0,05

Tabla 5. Efectividad de las cepas superiores al control sin inocular en guinea.

| Variable | Cepas | | | | | ES \pm |
|----------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| | K-3 | K-19 | Br-17 | Sp-7 | G-4 nd | |
| PS | 11,68 ^b | 14,68 ^{ab} | 16,58 ^a | 14,60 ^{ab} | 12,80 ^b | 0,96 [*] |

^{a,b} Valores con iguales superíndices no difieren entre sí a $P < 0,05$ (Newman-Keuls, 1952)

* $P < 0,05$

Los índices de efectividad y respuesta a la inoculación en guinea se muestran en la tabla 6, donde se observaron incrementos en los

rendimientos desde un 55 hasta un 120%. Los incrementos en el contenido de nitrógeno oscilaron entre un 5 y un 39%.

Tabla 6. Índice de efectividad y respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en guinea.

| Parametro | Cepas | | | | |
|-----------|-------|------|-------|------|--------|
| | K-3 | K-19 | Br-17 | Sp-7 | G-4 nd |
| IEI (%) | 55 | 95 | 120 | 94 | 70 |
| IRI (%) | 10 | 39 | 22 | 23 | 5 |

DISCUSIÓN

El trabajo de selección de cepas eficientes se ha estructurado desde varios puntos de vista, puesto que garantizar la efectividad de un biofertilizante para determinada especie requiere de un riguroso estudio de seguimiento de, al menos, los factores y parámetros controlables.

En el rhodes se obtuvo una respuesta considerable para los rendimientos foliares con las cepas K-3, K-19 y Br-17, que produjeron incrementos de un 31, 36 y 30% respectivamente, lo cual se corresponde con lo planteado en la literatura mundial en relación con el efecto de la bacteria *Azospirillum* sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, debido a su capacidad de producir hormonas y otras sustancias biológicamente activas capaces de estimular fisiológica y bioquímicamente estos procesos (Pedrosa; 1988; Sumner, 1990).

La altura de las plantas se comportó superior al control sin inocular, excepto en el tratamiento inoculado con la cepa Sp-7, que produjo una disminución de la misma aunque

no estadísticamente significativa. Esto pudiera estar relacionado con la interacción genotípica entre esta especie de gramínea y la cepa, puesto que la Sp-7 fue aislada e inoculada en caña de azúcar en Brasil, y se obtuvieron incrementos notables de la altura en esta gramínea forrajera (Neyra y Dobereiner, 1977).

Se obtuvo una significativa respuesta a la inoculación con la cepa K-19, la cual produjo un incremento en el contenido de nitrógeno de las plantas de un 134%. Aunque para el tratamiento inoculado con la cepa K-3 estadísticamente no se observaron diferencias, es indudable que el incremento de un 80% en el contenido de nitrógeno es un valor considerable. En el análisis del peso seco de la raíz se obtuvieron incrementos significativos en los tratamientos inoculados con las cepas K-19 y Br-17, este desarrollo del sistema radical es también debido a la secreción por parte de estas bacterias de metabolitos estimuladores, que cuando se mantienen en concentraciones

asimilables por la planta (generalmente bajas) causan un efecto estimulador (Hernández, Yolanda, comunicación personal; Elmerich, Bozouklian, Vieille, Fogher, Perroud, Perrin y Vanderleyden, 1987) y cuando por alguna causa se altera el umbral de absorción de la planta en cuestión y son tomados en concentraciones superiores, causan un efecto inhibitorio (Sumner, 1990). Este último aspecto, unido a la interacción genotípicamente favorable que requieren cada uno de estos sistemas de simbiosis asociativas, explica el comportamiento obtenido para el tratamiento inoculado con la cepa K-3, que redujo el peso seco de la raíz con respecto al control sin inocular.

La inoculación de la guinea likoni solamente produjo incrementos significativos en el peso seco, donde se obtuvieron valores para los tratamientos muy superiores a los del control sin inocular; no obstante, la dócima de comparación múltiple SNK (Newman-Keuls, 1952) permitió definir, en primer lugar, como la cepa más eficiente en el incremento de los rendimientos a la Br-17, en segundo las cepas K-19 y Sp-7 y en tercer lugar las cepas K-3 y G-4 nd. En el análisis de la altura de las plantas y el contenido de nitrógeno no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, aunque en todos los tratamientos se alcanzaron valores para las medias superiores al control sin inocular.

La variable peso seco de la raíz mostró valores menores al control sin inocular para todos los tratamientos, aunque estas diferencias no fueron significativas, pero fenotípicamente resultaron apreciables. Dicho comportamiento es típico cuando se inoculan sobredosis del microorganismo (Wani, 1990); al parecer esta especie requiere una dosis de inoculación inferior a la aplicada, que además de incrementar los rendimientos, permita expresar el potencial nitro fijador de estas bacterias, el cual se pone de manifiesto (entre otras condiciones) cuando se establece una

adecuada complementación entre el microorganismo, que utiliza para su actividad metabólica los exudados de ácidos orgánicos de la raíz, y la planta, que a su vez es capaz de asimilar las sustancias biológicamente activas que producen dichas bacterias para desarrollar tanto su raíz como su parte foliar. El cumplimiento de esta premisa es uno de los requisitos más importantes para garantizar la efectividad de la asociación (Madi y Henis, 1989).

El índice de eficiencia a la inoculación reflejó que todas las cepas estudiadas fueron capaces de producir incrementos notables en los rendimientos para esta especie; se destacaron las cepas Br-17, K-19 y Sp-7, que produjeron incrementos de 120, 95 y 94% respectivamente. La respuesta a la inoculación, expresada en incrementos en el contenido nitrógeno, mostró como máximo valor un 39% obtenido para el tratamiento inoculado con la cepa K-19.

Los resultados, del presente trabajo indican que la cepa más eficiente de las cinco estudiadas para la inoculación del rhodes cv Callide en suelo Ferralítico Rojo fue la K-19 y para la guinea likoni las cepas Br-17 y K-19. Considerando los aspectos analizados, se sugiere la aplicación en la guinea de una dosis de inoculación menor en iguales condiciones a las estudiadas.

REFERENCIAS

- ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA. 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba
- ELMERICH, C.; BOZOUKLIAN, H.; VEILLE, C.; FOGHER, C.; PERROUD, B.; PERRIN, A. & VANDERLEYDEN, J. 1987. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 317:183
- HERNÁNDEZ, MARTA. 1985. *Pastos y Forrajes*. 8:257
- MADI, L. & HENÍS, Y. 1989. *Plant and Soil*. 115:89

NEYRA, C.A. & DOBEREINER, J. 1977. Nitrogen fixation in grasses. **Adv. Agron.** 29:1

OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1977. **Appl. Environ. Microbiol.** 33:85

PEDROSA, F.O. 1988. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences.** 6:345

SUMNER, M.E. 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. In: Advances in Soil Science. Vol. 12. Springer-Verlag. New York, Inc. p. 53

WANI, S.P. 1990. **Indian J. Microbiol.** 30:363

Recibido el 18 de marzo de 1993