

Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja

Benintende, S.; W. Urich, M. Herrera, F. Gangge, M. Sterren y M. Benintende.

RESUMEN

El objetivo fue comparar la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* con relación a la inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja y su rendimiento. Se realizaron dos experimentos en lotes en los que nunca se cultivó soja en años con diferentes condiciones hídricas. Los tratamientos fueron: testigo (sin inoculación), coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum*. La nodulación en ambos experimentos fue superior en la coinoculación, aunque hubo diferencias significativas en el experimento con déficit hídrico. Los rendimientos, en ambos experimentos, presentaron valores medios superiores en la coinoculación, aunque sin diferencias significativas. La acumulación de biomasa aérea y N fue mayor en el año húmedo. El porcentaje de N derivado de la fijación biológica de N en el cultivo en el año seco fue de 26% para la inoculación simple y de 30% en la coinoculación, mientras que en el año húmedo este porcentaje fue de 41 y 47% respectivamente. A partir de estos resultados se concluye que existe un efecto de estimulación del crecimiento del cultivo de soja por la coinoculación. Sin embargo, es necesario continuar con estudios sobre este tema.

Palabras clave: coinoculación, soja, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*

Benintende, S.; W. Urich, M. Herrera, F. Gangge, M. Sterren y M. Benintende, 2010. Comparison of coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* with inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on nodulation, growth, and N accumulation in the soybean crop . Agriscientia XXVII (2): 71-77

SUMMARY

The aim of this study was to compare coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* with inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on nodulation, growth, and N accumulation in the soybean crop in field conditions. Two field tests were carried out for two years with different hydric conditions in areas not previously cultivated with soybean. The treatments were: control, coinoculation using *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasilense* and inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. Nodulation in both experiments was increased by dual inoculation, although significant differences were registered in the experiment with water deficiency. In both experiments, in coinoculation treatments yield mean values were higher than other treatment, although no significant differences were found. Biomass and N accumulation by the crop was higher in the coinoculated treatment than in the simple inoculation in the wet year. In the dry-condition year, N derived from the biological fixation was 26% in the simple application and 30% in the coinoculation treatment and in the year without water deficit, these percentages were 41 and 47 % respectively. From these results we conclude that coinoculation has a positive effect of growth stimulation in soybean crops. However, we believe it is necessary to continue studying this subject further.

Key words: coinoculation, soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*.

S. Benintende, W. Uhrich, M. Herrera, F. Gangge, M. Sterren y M. Benintende. Laboratorio de Análisis Microbiológico, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta 11 km 10, Oro Verde (CP 3100) Entre Ríos, Argentina. Correspondencia a S. Benintende: silviab@fca.uner.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La aplicación de bacterias nodulantes en cultivos de leguminosas es una práctica agronómica conocida y de probada eficacia desde hace años y adoptada por la mayoría de los agricultores argentinos. Al respecto, González (2006) cita que el 90% de la soja que se siembra se inocula. Los incrementos en los rendimientos asociados a la inoculación en los cultivos de soja son variables y dependientes del suelo, por su capacidad de suministro de N por mineralización y de la presencia o no de bacterias capaces de fijar N_2 proveniente de cultivos anteriores. Para el sudeste la provincia de Buenos Aires (Argentina) se citan diferencias de 500 a 1000 kg de grano por hectárea por fallas en nodulación en lotes en los que nunca se cultivó soja (Calviño, 2004). En trabajos realizados en la provincia de Entre Ríos (Argentina), se han encontrado incrementos que van desde alrededor de 100 a 300 kg (en lotes en los que se ha realizado cultivo de soja con anterioridad) hasta 1400 kg por hectárea en lotes de bajos contenidos de materia orgánica y en los que nunca se cultivó soja. Los aumentos en los rendimientos están asociados a una mayor disponibilidad de N para el cultivo debido

al aporte de este elemento que brinda esta asociación, si bien las plantas noduladas consumen parte de los fotosintatos que producen para mantener la bacteria asociada simbióticamente. El N que aportan al cultivo estas bacterias está relacionado a la masa nodular formada por la asociación (Benintende *et al.*, 1997).

Es conocido el efecto positivo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* – PGPR), como *Azospirillum* sp. La estimulación de *Azospirillum* sp. se relaciona con la producción de fitohormonas reguladoras, como auxinas, citocininas y giberelinas (Tien *et al.*, 1979; Bottini *et al.*, 1989). En experimentos en condiciones controladas y a campo se han observado importantes cambios en la morfología del sistema radical (Tien *et al.*, 1979). La inoculación de diferentes cultivos con cepas de *Azospirillum* sp. provoca un aumento en el número y densidad de pelos radicales y un acortamiento en el tiempo de su aparición (Tien *et al.*, 1979; Morgenstern & Okon, 1987; Barbieri & Galli, 1993).

En experimentos a campo de inoculación con *Azospirillum* se citan incrementos en los rendimientos desde 3 a 50% en aproximadamente dos terce-

ras partes de los trabajos (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994; Rodríguez Cáceres *et al.*, 2008). Si bien la mayoría de los estudios con *Azospirillum* sp. se han realizado en gramíneas, existen trabajos donde se reportan efectos positivos en leguminosas y otros cultivos (Okon & Itzigsohn, 1995; Dardanelli *et al.*, 2008).

En cultivo de leguminosas, la aplicación dual de rizobios y azospirilos ha sido señalada como un área de investigación de interés, ya que existen trabajos en los que se han observado efectos positivos en producción de materia seca, en rendimiento en grano y contenido de N en leguminosas en comparación con inoculaciones con rizobios solamente (Burdman *et al.*, 1998; Gonzalez, 2006).

Los resultados positivos de la inoculación dual en leguminosas han sido atribuidos a la ocurrencia de una nodulación más temprana, incremento en el número de nódulos, mayores tasas de fijación de N_2 e incrementos en el desarrollo radical en general. Similar a lo observado en pastos y cereales, se encontró que la inoculación con *A. brasilense* en poroto y alfalfa promovía la formación de pelos radicales. *Rhizobium* sp. forma cordones infectivos en los pelos radicales, y la estimulación de un mayor número de células epidérmicas que se diferencian en pelos radicales susceptibles de infección por *Rhizobium* sp. incrementa el potencial de formación de nódulos (Yahalom *et al.*; 1987). Cassan *et al.* (2009) también encontró que la coinoculación produjo un crecimiento positivo en distintos cultivos, particularmente en los estadios tempranos de desarrollo del vegetal.

Uhrich y Benintende (2005) encontraron en la región noreste argentina que la coinoculación de rizobios y azospirilos en un lote en el que se había realizado cultivo de soja con anterioridad, mostró efectos positivos en las variables peso y número de nódulos en los estadios fenológicos V4 y R4 de la escala desarrollada por Fehr & Caviness (1971).

El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* con relación a la inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja y su rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y experimentos

Se realizaron dos experimentos durante dos años en cultivo de soja, con características climáticas diferentes en relación a la cantidad y distri-

bución de precipitaciones. El área de estudio se localizó en la provincia de Entre Ríos, departamento Paraná, a 32° S y 60° 12' O. El clima del área de estudio es templado húmedo de llanura. La temperatura media diaria anual es de 18,5 °C y varía entre 25 °C en el mes de enero y 12 °C en el mes de julio, con una amplitud térmica de 13 °C. El período medio de heladas extremas es del 30 de mayo al 16 de setiembre (109 días). Durante todo el año la humedad relativa es elevada. El valor medio anual de precipitaciones es de 1000 mm y su distribución presenta un mínimo desde aproximadamente mediados de abril hasta mediados de octubre.

Se registraron los datos pluviométricos en cada año de evaluación y se realizó el balance hídrico durante el ciclo del cultivo. Se consideró una lámina correspondiente a capacidad de campo (cc) de 420 mm, a punto de marchitez permanente (pmp) de 230 mm y a umbral de riego (umbral) de 327 mm.

Los balances hídricos correspondientes a ambos ensayos se muestran en la Figura 1, donde con línea negra punteada se representa la evolución de la lámina de agua en el experimento 1 (con déficit hídrico-lámina 1) y con línea negra llena en el experimento 2 (sin déficit hídrico-lámina 2).

El suelo en que se realizaron ambos experimentos es un Argiudol y la caracterización química previa a la siembra se presenta en la Tabla 1. La historia cultural de los lotes no incluyó cultivo de soja en los 10 años previos a los experimentos.

La siembra se realizó en un lote de producción con maquinaria propia del establecimiento, por lo que ambos experimentos fueron realizados en franjas. La distancia entre hileras fue de 0,52 m y

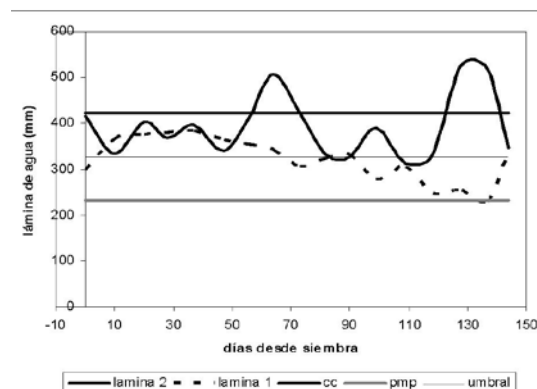


Figura 1. Balance hídrico durante el período de crecimiento del cultivo de soja. Con línea negra punteada se representa la evolución de la lámina de agua en el experimento 1 (lámina 1) y con línea negra llena en el experimento 2 (lámina 2).

Tabla 1. Caracterización química del suelo Argiudol.

Experimento	C org. (g kg ⁻¹)	N total (g kg ⁻¹)	Nitratos (mg kg ⁻¹)	Relación C/N	pH
Experimento 1	24,0	2,56	51,3	9,4	6,8
Experimento 2	24,0	2,37	50,4	10,1	6,1

los tratamientos fueron:

-Testigo

-Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa E 109) + *Azospirillum brasilense* (Cepa Az 39) (Denominado: Br + Azo)

-Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* (Cepa E 109) (Denominado: Br)

Dentro de cada tratamiento se tomaron al azar cuatro repeticiones de material vegetal para evaluación de las variables.

Variables registradas

Nodulación: se determinó sobre muestras compuestas de 10 plantas en dos momentos del ciclo del cultivo: a) estadio vegetativo (V4 en el ensayo 1 y V5 en el ensayo 2) y b) estadio reproductivo (R4 en ambos ensayos). Se determinó peso seco de nódulos en estufa a 70 °C.

Biomasa aérea del cultivo: Se determinó por peso de la materia seca de la biomasa aérea del cultivo correspondiente a un área de 1,04 m². La materia seca se obtuvo por secado en estufa a 70 °C. Los momentos del muestreo correspondieron a V4 – V5, R2, R4 y R6 (7).

Contenido de N de la parte aérea: se determinó

por digestión Kjeldahl (Bremner & Keeney, 1965) del material cosechado, seco y molido.

Rendimiento: por cosecha manual de 1,04 m².

Porcentaje de N derivado de la fijación biológica de N (FBN): se calculó por la diferencia entre el contenido de N en la parte aérea del cultivo entre los tratamientos inoculados (Br y Br+Azo) y el tratamiento testigo en relación al contenido de N del tratamiento inoculado respectivo.

Análisis estadístico

Los tratamientos se compararon por un análisis de varianza univariado y se aplicó un test de LSD ($\alpha = 0,05$) para comparar los rendimientos en función de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La nodulación en estadios vegetativos y reproductivos en ambos experimentos fue superior en el tratamiento Br + Azo con respecto a Br, aunque hubo diferencias significativas solamente en el experimento 1 (Tabla 2).

En ambos experimentos, los rendimientos de los tratamientos Br + Azo presentaron valores medios superiores comparados con Br, aunque estas dife-

Tabla 2. Peso de nódulos en estadios vegetativo y reproductivo y rendimientos de los tratamientos: Testigo, Br y Br+Azo en el experimento 1 (a) y en el experimento 2 (b)

(a)

Tratamientos	Peso nódulos(g) Estadio vegetativo	Peso nódulos(g) Estadio reproductivo	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Testigo	0,0043 c	0,0703 c	1912 b
Br ⁽²⁾	0,0941 b	1,5837 b	2320 ab
Br+Azo ⁽³⁾	0,1637 a	2,2567 a	2438 a

(b)

Tratamientos	Peso nódulos(g) Estadio vegetativo	Peso nódulos(g) Estadio reproductivo	Rendimiento (kg ha ⁻¹)
Testigo	0,0460 b	1,6500 b	2408 b
Br ⁽²⁾	0,7613 a	5,4495 a	2946 a
Br+Azo ⁽³⁾	1,0476 a	6,0623 a	3205 a

⁽¹⁾ Letras distintas indican diferencias significativas ($\alpha = 0,05$)

⁽²⁾ Br: *Bradyrhizobium japonicum*

⁽³⁾ Br + Azo: *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*

rencias no fueron significativas en ninguno de los dos años evaluados (Tabla 2).

En la comparación de ambos ensayos puede observarse que las variables peso de nódulos y de rendimientos alcanzados fueron menores en el año en el que el cultivo presentó déficit hídrico, pero en ambas condiciones hídricas se presentó una tendencia de incremento de estas variables en la coinoculación respecto a la inoculación simple. El incremento en nodulación concordó con lo observado en otros cultivos de leguminosas (Yahalom *et al.*, 1987). Cassan *et al.* (2009) encontraron que la coinoculación con Az39 y E109 en el cultivo de soja incrementó el número de nódulos por plantas y el porcentaje de plantas noduladas comparadas con la simple inoculación con E109.

Las diferencias en la nodulación entre los dos años evaluados se relacionan al déficit hídrico que presentó el cultivo en el experimento 1 (línea punteada de la Figura 1). Esta menor nodulación en situación de estrés hídrico es explicada por Racca (2003), quien señala que esta condición provoca la autorregulación de la planta evitando la formación de nódulos.

Los incrementos de rendimiento, aunque no estadísticamente significativos, en el tratamiento Br + Azo respecto de Br fueron de 118 kg ha⁻¹ para el año con déficit hídrico, y 259 kg ha⁻¹ para el año sin déficit hídrico.

La biomasa aérea acumulada en los dos años evaluados en el tratamiento testigo, inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* e inoculación dual con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum*

brasilense se muestra en la Figura 2, donde con línea punteada se representa la acumulación de materia seca de los tratamientos en el experimento 1 (con déficit hídrico) y con línea llena en el experimento 2 (sin déficit hídrico).

La curva de acumulación de materia seca en el testigo se ubicó por debajo de las de los dos tratamientos inoculados. La acumulación de materia seca en el tratamiento de coinoculación fue mayor que en el tratamiento de inoculación simple en los dos años. En el año sin déficit hídrico se observó que en la coinoculación hubo un incremento en la acumulación de biomasa aérea entre 9 y 15% en relación a la inoculación simple. Mientras que durante el año con déficit hídrico este incremento sólo fue de 2,5 a 3,5%. Groppa *et al.* (1998), trabajando en experimentos en macetas, encontraron incrementos de 23% en la producción de materia seca debido a la coinoculación respecto de la inoculación simple, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo.

En el ensayo sin déficit hídrico hubo una mayor acumulación de N en la biomasa aérea del cultivo (Figura 3) en el tratamiento dual respecto de la inoculación simple, mientras que las curvas de ambos tratamientos se mostraron más cercanas en el experimento 1. Groppa *et al.* (1998) encontraron que el contenido de N en plantas coinoculadas fue 22,6% más que en las plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium japonicum*.

Para el experimento 1 el N derivado de la FBN fue de 26% para la inoculación simple (Br) y de 30% en la inoculación dual (Br+Azo), mientras que

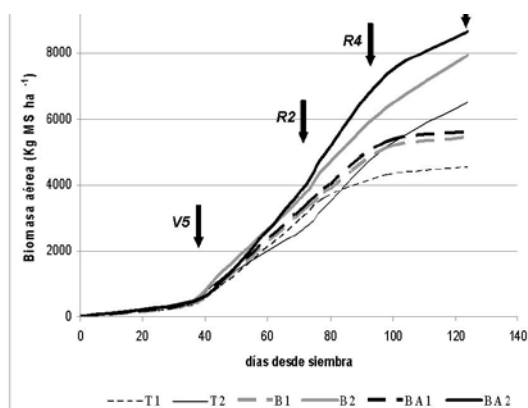


Figura 2. Biomasa aérea acumulada por el cultivo de soja en tratamientos: testigo (línea negra fina), Br (línea gris) y Br + Azo (línea negra gruesa) en el ensayo 1 (líneas punteadas) y ensayo 2 (líneas llenas). Con línea punteada se representa la acumulación de materia seca de los tratamientos en el experimento 1 (con déficit hídrico) y con línea llena en el experimento 2 (sin déficit hídrico).

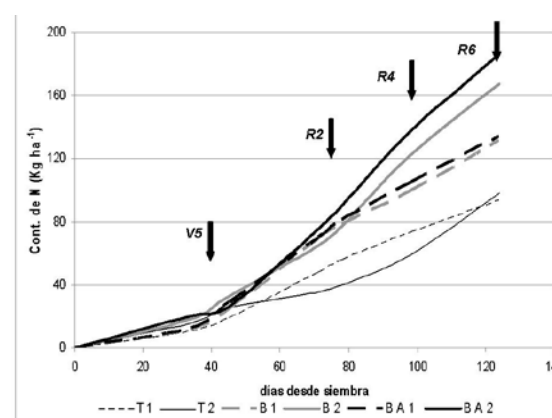


Figura 3. Acumulación de nitrógeno por el cultivo de soja en tratamientos: testigo (línea negra fina), Br (línea gris) y Br + Azo (línea negra gruesa) en el experimento 1 (líneas punteadas) y experimento 2 (líneas llenas).

en el experimento 2 fueron de 41 y 47% respectivamente. En estudios realizados en el sureste de la provincia de Buenos Aires, donde el nivel de materia orgánica es mayor al del suelo sobre el que se instalaron los ensayos, González *et al.* (1997) calcularon que para cultivos de soja de rendimientos de aproximadamente 5000 kg la proporción de N derivado de la fijación biológica alcanza el 30%.

Las proporciones de N derivadas de la FBN en los ensayos estuvieron comprendidas en el rango de los reportados por Racca (comunicación personal) quien señala que éstas oscilan alrededor de 22 a 52% para años con y sin déficit hídricos respectivamente.

Finalmente, se observó que las curvas de acumulación de N de los tratamientos inoculados no se separaron de la correspondiente al testigo hasta V5. Pero sí lo hicieron a partir de esta etapa, lo que constituye una diferencia con los resultados informados por González *et al.* (1997), quienes plantean que el aporte por fijación al cultivo de soja recién produce diferencias en la acumulación de N a partir de R3 hasta R6. Estas diferencias en el patrón de acumulación de N pueden relacionarse a los niveles de N que se mineralizan en el suelo, derivado de los menores contenidos de N orgánico presentes en Entre Ríos, en contraposición a los niveles característicos de los suelos del sureste bonaerense.

A partir de los resultados encontrados en estos experimentos se deduce un efecto de estimulación del crecimiento del cultivo de soja por la aplicación de *Azospirillum brasilense* junto al *Bradyrhizobium japonicum*, aunque es necesario continuar con estudios a campo sobre esta asociación.

BIBLIOGRAFIA

- Barbieri, P. and E. Galli, 1993. Effect on wheat root development of inoculation with *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144:69-75
- Benintende, S.; C. Sanchez, A.; Barbabianca, J.; Pacheco Basurco y A. Peticari, 1997. Ensayos de campo de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* de eficiente comportamiento en Argiudoles vérticos de Entre Ríos. *Revista Científica Agropecuaria* 1: 9-14.
- Bottini, R.; M. Fulchieri, D.; Pearce and R. Pharis, 1989. Identifications of gibberellins A₁, A₃ and iso A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90:45-47.
- Bremner, J. and D. Keeney, 1965. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Annal. Chem. Acta* 32: 485-495.
- Burdman, S.; D. Vedder; M. German; R. Itzigshon; J. Kigel; E. Jurkevitch and Y. Okon, 1998. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. En: *Biological Nitrogen Fixation for the 21st. Century*, Elmerich, C, Kondorosi, A. & Newton W, Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 609-612.
- Calviño, P., 2004. Modelo de producción de soja en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires. En: *Manual práctico para la producción de soja*. Díaz Zorrita M. & Duarte G, ed. Hemisferio Sur. Bs As. p. 256.
- Cassan, F.; Perrig, D.; Sgroy, V.; Masciarelli, O.; Penna, C. y V. Luna, 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil Biology* 45: 28-35.
- Dardanelli, M.; D. Rodriguez Navarro; M. Megías Guijo and Y. Okon, 2008. Influencia de la co inoculación *Azospirillum*- rizobios sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno de leguminosas de interés agronómico. En: Cassan & Garcia de Salamone, editores. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic reserch in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, pp. 143 – 153.
- Fehr W.R. and C.E. Caviness, 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, Vol. 11 (6):929-931.
- Gonzalez N., 2006. Fijación de nitrógeno en soja. Situación actual y perspectivas en la Argentina. En: 3^o Congreso de Soja del Mercosur, Conferencia Plenaria, Rosario, Argentina. 376 pp.
- Gonzalez, N., A. Peticari, B. Stegman de Gurfinkel y E. Rodriguez Cáceres, 1997. Nutrición nitrogenada. En: *El cultivo de la soja en la Argentina*. Giorda L, Baigorri H, editores. INTA-SAGP yA. Editar, San Juan, Argentina, pp 188-198.
- Groppa, M. D.; Zawoznik, M. S. and M.L. Tomaro, 1998. Effect of Co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. *Soil Biol.* 34(2): 75-80.
- Morgenstern, E. and Y. Okon, 1987. The effect of *Azospirillum brasilense* on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense sudanense*. *Ari. Soil Res. Rehabil.* 1:115-127.
- Okon, Y. and C. Labandera-Gonzalez, 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*. An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Okon, Y. and R. Itzigsohn, 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances* 13 (3): 415-424.

- Racca, R., 2003. Algunos conceptos sobre la fijación biológica en los cultivos. IV Reunión Científico técnica de biología de suelos. IV Encuentro de fijación biológica de nitrógeno, Termas de Río Hondo. Argentina.
- Rodriguez Caceres, E.; C. Di Ciocco y S. Carletti, 2008. 25 años de Investigaciones de *Azospirillum brasilense* AZ39 en Argentina. En: Cassan & Garcia de Salamone, editors. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic reserch in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, pp. 179-188.
- Tien, T.; Gaskins, M. and D. Hubbell, 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum*) Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.
- Uhrich, W. y S. Benintende, 2005. Aplicación de *Azospirillum brasilense* en cultivo de soja en co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. Revista Científica Agropecuaria 9(1): 71-75.
- Yahalom, E.; Y. Okon and A. Dovrat, 1987. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. Can J. Microbiol. 33: 510-514.