

Evaluación de la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 como biofertilizante para el cultivo de sorgo azucarado

Noel Grellet Naval*, Lucía Vera**, Fernanda Leggio Neme**, Pablo Fernández González**, Agustín Sánchez Ducca**, Juan Fernández de Ullivarri**, Eduardo Raúl Romero** y María Laura Tortora**

RESUMEN

El sorgo azucarado (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es uno de los cultivos bioenergéticos más promisorios en el noroeste argentino y se utiliza actualmente como cultivo complementario a la caña de azúcar. El manejo agronómico del cultivo implica la utilización de fertilizantes sintéticos, principalmente nitrogenados, a fin de suplir sus requerimientos nutricionales y optimizar los rendimientos del cultivo. Sin embargo, teniendo en cuenta el elevado coste energético de estos fertilizantes, su manejo en forma eficiente resulta de fundamental importancia. El uso indiscriminado de ellos no solo ocasiona un deterioro físico, químico y biológico del suelo, sino que además la fertilización nitrogenada es una de las prácticas agrícolas con mayor impacto sobre el calentamiento global debido a su influencia en las emisiones de óxido nitroso (N₂O). Una alternativa ecológica y sustentable para reducir el uso de los fertilizantes nitrogenados es la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), capaces de estimular el crecimiento y desarrollo de los cultivos a través de diferentes mecanismos de acción. *Azospirillum* es uno de los géneros de bacterias PGPB más estudiados, siendo la cepa *A. brasilense* Az39 la más recomendada en nuestro país para la formulación de biofertilizantes en cultivos no leguminosos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la cepa *A. brasilense* Az39 como un potencial biofertilizante para el cultivo de sorgo azucarado. A tal efecto se realizaron bioensayos de inoculación bajo condiciones de invernáculo, en los que se evaluó la capacidad de la cepa Az39 de mejorar la emergencia, como así también de colonizar y promover el desarrollo y crecimiento del cultivo. Los resultados obtenidos demostraron que la inoculación de semillas de sorgo azucarado con la cepa *A. brasilense* Az39 aumenta la emergencia de plántulas y promueve el crecimiento y desarrollo tanto de la parte aérea como del sistema radicular a partir de los 42 DPI. Este efecto promotor del crecimiento estuvo asociado a la presencia de la cepa Az39 colonizando el suelo rizosférico y casi todos los tejidos de las plántulas, tanto de manera endofítica como superficial.

Palabras clave: sustentabilidad, biofertilización, bioenergía.

ABSTRACT

Evaluation of strain *Azospirillum brasilense* Az39 as a biofertilizer for the cultivation of sweet sorghum

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is one of the most promising bioenergy crops in northwestern Argentina, be currently used as a complementary crop to sugar cane. Sweet sorghum agronomic management involves the use of synthetic fertilizers, especially nitrogen, in order to supply nutritional requirements and to optimize crop yields. However, considering the high energy costs of these synthetic nitrogen fertilizers, efficient use is critical. Indiscriminate use of these chemicals not only causes physical, chemical and biological soil degradation, but also contributes to global warming due to its influence on nitrous oxide emissions (N₂O). An ecological and sustainable alternative to reduce nitrogen fertilizers utilization is the use of plant growth promoting bacteria (PGPB), capable of stimulating crop growth and development through different mechanisms. *Azospirillum* is one of the most studied PGPB bacteria, being *A. brasilense* Az39 strain the most recommended in our country for the development of biofertilizers in non-leguminous crops. The aim of this study was to evaluate *A. brasilense* Az39 strain as a potential biofertilizer for sweet sorghum crop. For this, inoculation test were performed under greenhouse conditions, where both the ability of Az39 strain to improve emergency and to colonize and promote crop growth and development were evaluated. Results showed that Az39 strain inoculation increased seedling emergence and promoted growth and development rates of both aerial and root plant system, from 42 DPI. This plant growth promoting effect was associated with endophytic and rhizosphere bacterial plant tissue and soil colonization..

Key words: sustainability, biofertilization, bioenergy.

Artículo recibido: 05/05/14 y Aceptado: 3/04/17.

*Ledesma S.A. A. I.

**Sección Agronomía de la Caña de Azúcar, EEAOC. ngrellet@eeaoc.org.ar.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos energéticos, cuyo objetivo es la producción de biomasa con alto potencial bioenergético, están despertando un gran interés mundial durante los últimos años. Una de las razones principales es que la sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles contribuirá a reducir tanto las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera como el uso de los derivados del petróleo.

El sorgo dulce, azucarado o sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es uno de los cultivos bioenergéticos más promisorios para el noroeste argentino. Es un cultivo multifuncional de alto potencial por su elevada productividad (entre 20 t y 50 t de materia seca/ha) en ciclos cortos de producción (tres a cuatro meses), por la amplia gama de productos industriales que provee y, actualmente, por su elevado potencial para proporcionar productos bioenergéticos (Figura 1). Es un cultivo de valor universal ya que puede cultivarse en regiones tropicales, subtropicales y templadas, y en suelos de mediana y baja aptitud agrícola. Es muy eficiente en la captación de agua del suelo, lo que le permite crecer en regiones con escasa pluviometría y ser tolerante a sequías y elevados niveles de salinidad. Se caracteriza por poseer tallos con jugos ricos en azúcares similares a los de la caña de azúcar, que pueden utilizarse para la producción de bioetanol a partir de su fermentación, y además suministrar bagazo y residuos de cosecha como subproductos fibrosos, útiles para la cogeneración de electricidad (Romero *et al.*, 2010).

Por ser un cultivo C4, el sorgo azucarado presenta una elevada capacidad de producción de biomasa y una eficiente asimilación de nitrógeno. El nitrógeno es esencial para el crecimiento del cultivo y uno de los principales factores que limita su rendimiento. Por esta razón la fertilización nitrogenada constituye una práctica agronómica necesaria para optimizar los rendimientos del cultivo (Almodares *et al.*, 2009). Sin embargo, teniendo en cuenta el elevado coste energético de los fertilizantes nitrogenados, su manejo en forma eficiente resulta de fundamental importancia. El uso indiscriminado de estos fertilizantes no solo ocasiona un deterioro físico, químico y biológico del suelo, sino que además es una de las prácticas agrícolas con mayor impacto sobre el calentamiento global debido a su influencia en las emisiones de óxido nitroso (N_2O) (Bouwman *et al.*, 2002). Durante los últimos años la creciente necesidad de optimizar los balances energéticos y desarrollar una agricultura sustentable y productiva que involucre la protección y mejora de la calidad de los suelos, el agua y la atmósfera, ha llevado a la búsqueda de alternativas para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados. Entre ellas, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es una de las opciones más eficientes para incorporar nitrógeno en el



Figura 1. Aspecto del cultivo de sorgo dulce, azucarado o sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).

ecosistema. Este proceso es realizado por un grupo de microorganismos altamente especializados conocidos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (por sus siglas en inglés "Plant Growth Promoting Bacteria"), entre las cuales se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*. Las bacterias de este género se caracterizan por ser diazotróficas de vida libre, capaces de fijar N_2 en condiciones de microaerofilia. Son nutricionalmente muy versátiles debido a que pueden consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos disponibles en la rizósfera (Parra y Cuevas, 2001). Esta característica nutricional explica la capacidad de *Azospirillum* de colonizar suelos de diferentes regiones agroecológicas y asociarse a las raíces de una gran variedad de especies de plantas, muchas de importancia agrícola como maíz, trigo, mijo, sorgo y leguminosas (Baldani y Döbereiner, 1980; Bashan *et al.*, 2004; Burdman *et al.*, 1997; Pacovsky, 1990).

Azospirillum es uno de los géneros de bacterias PGPB más estudiados a nivel mundial (Bashan *et al.*, 2004) y existen numerosos mecanismos que explican el aumento en el crecimiento y desarrollo que se observa en las plantas después de la inoculación: I) la fijación biológica de nitrógeno; II) la producción y excreción de diferentes fitohormonas; III) la producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas tales como las poliaminas (Thuler *et al.*, 2003); IV) la capacidad para solubilizar fosfatos insolubles (Seshadri *et al.*, 2000); y V) la capacidad para producir sideróforos (Saxena *et al.*, 1986). Estos mecanismos participan de manera simultánea, coordinada y cooperativamente en la asociación planta-bacteria, favoreciendo el crecimiento vegetal bajo condiciones ambientales adecuadas (Bashan and Levanony, 1990).

La cepa Az39 de *A. brasilense*, aislada a partir de raíces de trigo cultivado en suelos de la región de Marcos Juárez, provincia de Córdoba, fue seleccionada en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (Imyza), por

ser una de las rizobacterias más eficientes en promover el crecimiento de las plantas y mejorar la productividad de cultivos no leguminosos. Por esta razón, el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (Senasa), junto con diferentes compañías de inoculantes, han recomendado la cepa Az39 de *A. brasilense* para la formulación de inoculantes para trigo y maíz en Argentina durante más de 30 años. Desde entonces, muchos estudios realizados tanto en invernáculo como en el campo han demostrado la capacidad de esta cepa para incrementar significativamente la productividad de numerosas especies de plantas. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se realizaron principalmente sobre cultivos como maíz y trigo (Díaz-Zorita *et al.*, 2004; Díaz-Zorita y Grove, 2006), dejando de lado otros.

Teniendo en cuenta tales consideraciones, el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de la cepa *A. brasilense* Az39 de mejorar la emergencia de sorgo azucarado, así como también su capacidad para colonizar y promover el desarrollo temprano de las plantas inoculadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados

Se utilizó la cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* provista por la empresa Sotrima SRL, en su presentación como inoculante líquido de concentración 1×10^9 UFC/ml.

Material vegetal

Se trabajó con semillas híbridas de sorgo azucarado Argensil 165 BIO (Argenetics semillas SA), por ser el primer híbrido argentino registrado destinado a la obtención de biocombustible.

Bioensayos sobre semillas:

Inoculación de las semillas

Previo a su comercialización, las semillas fueron tratadas con una cubierta protectora de un fungicida bacteriana de concentración 10^6 UFC/ml (Az), obtenida por dilución de la suspensión comercial. La concentración utilizada corresponde a la concentración óptima reportada para la inoculación de semillas de diferentes cereales con *Azospirillum* (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1989). Como control se utilizaron semillas embebidas en agua destilada estéril durante 60 min (Test).

Previo a la inoculación, se realizaron ensayos preliminares en los que se demostró que la inmersión de las semillas durante 60 min en agua destilada no afectaba el poder germinativo ni el contenido de humedad de las mismas.

Permanencia sobre las semillas inoculadas

Se evaluó la capacidad de la cepa Az39 de

permanecer sobre las semillas luego de la inoculación. Para ello se determinó el número más probable (NMP) de microorganismos por gramo de semilla de acuerdo a Döbereiner *et al.* (1995), utilizando la Tabla de McCrady para tres repeticiones. Los cultivos que presentaron crecimiento bacteriano en forma de una película blanca sub-superficial, típica de *Azospirillum*, fueron repicados en medio de cultivo NFb sólido adicionado con extracto de levadura y Rojo Congo para la identificación de las colonias (Bashan y Levanony, 1985; Rodríguez Cáceres, 1982). A partir del valor obtenido se calculó el porcentaje de recuperación (% Recup), siguiendo la fórmula descrita por Penna *et al.* (2011):

$$\% \text{ Recup} = \frac{R (\log \text{ NMP/g semillas}) \times 100}{I (\log \text{ NM P/g semillas})}$$

R: cantidad de bacterias diazotróficas recuperadas de las semillas inoculadas

I: cantidad de bacterias diazotróficas con la que se inocularon las semillas.

Dinámica de emergencia de las semillas inoculadas

Las semillas inoculadas y sin inocular se sembraron en bandejas de 12 pocillos, colocando una semilla por pocillo, a una profundidad de 2 a 4 cm desde la superficie (Medina *et al.*, 2012). Como sustrato se utilizó una mezcla no estéril de tierra-Perlome 3:1 p/p, y las bandejas se conservaron en el invernáculo de la EEAOC bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. La capacidad de la cepa Az39 de *A. brasilense* para mejorar la emergencia de plántulas de semillas inoculadas se analizó realizando un seguimiento diario de aparición de plántulas, desde el momento de la siembra hasta la estabilización de la población. Los resultados se analizaron utilizando la metodología de ajustes de funciones propuesta por Gan *et al.* (1992) en emergencia de plántulas de trigo, y por Romero (2002) en emergencia y crecimiento inicial en caña de azúcar, utilizando la siguiente fórmula:

$$Y = A * \text{EXP} (-B * \text{EXP} (-C * X))$$

Y: Emergencia (%)

A: Asíntota de la curva

B: Constante

C: Tasa de emergencia

X: Días

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y la Prueba LSD Fisher, con el programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows.

Bioensayos sobre plantas:

Una vez inoculadas, las semillas se sembraron en macetas que contenían como sustrato una mezcla no estéril de tierra y Perlome en proporción 3:1 (p/p). Las macetas se conservaron en el invernáculo de la EEAOC bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

Efecto de la inoculación sobre la flora microbiana de la rizósfera

Antes, y a diferentes días posteriores a la inoculación (DPI) y siembra de las semillas, se tomaron muestras de suelo rizosférico a fin de evaluar modificaciones en algunas poblaciones microbianas. Para ello se utilizó la técnica de difusión en agar que permite cuantificar microorganismos vivos y cultivables en diferentes medios de cultivos: Luria Bertani (LB) para el recuento de mesófilos aerobios totales, Agar Papa Glucosado (APG) para el recuento de hongos y levaduras, Agar Cetrimida (AC) para bacterias del género *Pseudomonas*, y medio malato libre de nitrógeno (NFb) para los fijadores de nitrógeno microaerófilos.

Efecto promotor del crecimiento

A los 14, 28, 42, 56 y 70 DPI se evaluaron algunos parámetros de crecimiento, desarrollo y estado fenológico de las plantas inoculadas y sin inocular, entre ellos:

Peso fresco y longitud de la parte aérea y radicular: las muestras se lavaron con agua corriente, luego con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Con ayuda de un bisturí estéril se separó cuidadosamente la porción aérea de la radicular y se determinó peso fresco y longitud.

Desarrollo de pelos radiculares y raíces secundarias: las muestras se lavaron tres veces con agua destilada, se sumergieron en una solución de cristal violeta (Britania) al 1% (p/v) durante 5 min, y se lavaron nuevamente con agua destilada hasta eliminar completamente restos del colorante. Las raíces teñidas se montaron sobre una placa de Petri conteniendo agua y se observaron utilizando una lupa.

Estado fenológico: el estado fenológico de las plantas inoculadas se evaluó por determinación del número de hojas verdes.

Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento y los datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (Anova) y la Prueba Tukey con el programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows.

Capacidad de colonización

A los 14, 28, 42, 56 y 70 DPI se tomaron muestras de suelo rizosférico y diferentes tejidos (raíz, tallo y hoja) de las plantas inoculadas, que se procesaron según se describe a continuación:

Suelo rizosférico: se pesaron 20 g de la porción del suelo próxima a las raíces de las plantas inoculadas, y se diluyeron en 180 ml de agua destilada estéril (dilución 1:10). Después de homogeneizar las muestras se sembraron 0,1 ml en frascos de penicilina conteniendo el medio de cultivo NFb semisólido, y se incubaron a 30°C durante 72 h.

Raíces: las raíces de las plantas inoculadas se lavaron con agua potable, luego con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. La colonización superficial se evaluó sobre raíces lavadas, que se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente y se sembraron en medio NFb semisólido. A fin de evaluar la colonización endofítica, las raíces se cortaron en fragmentos de aproximadamente 8 cm que se sellaron en sus extremos con parafina fundida y se sumergieron en alcohol 70° durante 1 min, luego en hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 2 min y se lavaron dos veces con agua destilada estéril durante 10 min (Cárdenas *et al.*, 2010). Las raíces desinfectadas superficialmente se cortaron nuevamente en fragmentos de 1 cm que se sembraron en medio NFb semisólido y se incubaron a 30°C durante 72 h.

Tallos: los tallos de las plantas inoculadas se lavaron con agua potable, luego con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Con ayuda de un bisturí estéril, los tallos se pelaron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Se transfirieron al medio de cultivo NFb semisólido y se incubaron a 30°C durante 72 h.

Hojas: las diferentes partes de las hojas (base, medio, punta) de las plantas inoculadas se lavaron con agua potable, luego con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Para diferenciar la colonización endofítica de la superficial, las hojas se desinfectaron superficialmente pulverizándolas con alcohol 70°, y luego se lavaron sumergiéndolas en agua destilada estéril. Las distintas partes de las hojas se cortaron cuidadosamente en segmentos de 1 cm² aproximadamente, se transfirieron al medio de cultivo NFb semisólido y se incubaron a 30°C durante 72 h.

Los cultivos que presentaron crecimiento bacteriano en forma de una película blanca sub-superficial fueron observados en el microscopio y repicados en el medio de cultivo NFb sólido adicionado con extracto de levadura y Rojo Congo, para la identificación de las colonias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos sobre semillas:

Permanencia sobre las semillas inoculadas

Al realizar el recuento de las bacterias inmediatamente después de la inoculación de las semillas (T0), se observó que el porcentaje de recuperación fue de 26,70%. A los 4 DPI (T4), el porcentaje de recuperación

disminuyó a 11,60%; mientras que a los 7 DPI (T7) no se observó presencia de las bacterias inoculadas sobre las semillas (Tabla 1). Por lo tanto y teniendo en cuenta que el número de bacterias disminuye rápidamente luego de la inoculación, es recomendable que la siembra de las semillas inoculadas se realice inmediatamente después de la inoculación.

Tabla 1. Capacidad de *A. brasilense* Az39 de permanecer sobre las semillas de sorgo inoculadas.

Tiempo (DPI)	Porcentaje de Recuperación (%)
T ₀	26,7
T ₄	11,6
T ₇	0,0

Dinámica de la emergencia de las semillas inoculadas

La Figura 2 muestra el efecto de la inoculación con *A. brasilense* Az39 sobre la dinámica de la emergencia de plántulas de sorgo.

La emergencia de las plántulas inoculadas se inició a los 5 DPI, mientras que las plántulas sin inocular emergieron recién a los 6 DPI. Además, la dinámica de emergencia de las plántulas inoculadas resultó mayor en comparación con las plántulas testigo, alcanzando a los 17 DPI un porcentaje de emergencia final del 72,30%, mientras que el número de plántulas testigo no superó el 50%.

Estos resultados coinciden con los reportados por Cassán *et al.* (2009), quienes demostraron que la cepa Az39 de *A. brasilense* es capaz de mejorar el poder germinativo de semillas de soja y maíz inoculadas, como así también el desarrollo temprano de las plántulas. Además, Rivas *et al.* (2009) comprobaron que la inoculación de semillas de trigo, maíz y soja con *A. brasilense* Az39 promueve la germinación de las semillas y modifica significativamente el crecimiento post-germinativo tanto aéreo como radicular de las plántulas.

Bioensayos sobre plantas:

Efecto de la inoculación sobre la flora microbiana de la rizósfera

En general, se observó que el sustrato de las plantas inoculadas presentó un aumento significativo en la cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno en comparación con el sustrato de las plantas sin inocular. A los 42 DPI también se observó un aumento en el número de microorganismos mesófilos aerobios totales, mientras que la cantidad de bacterias del género *Pseudomonas* y de hongos y levaduras prácticamente no se modificó durante los tiempos evaluados (Figura 3).

Evaluación de la capacidad de colonización y estudio del efecto promotor del crecimiento

Teniendo en cuenta que algunos autores han reportado que para que exista un efecto promotor del crecimiento en plantas de sorgo por *Azospirillum* es necesario que la bacteria sea capaz de colonizar los

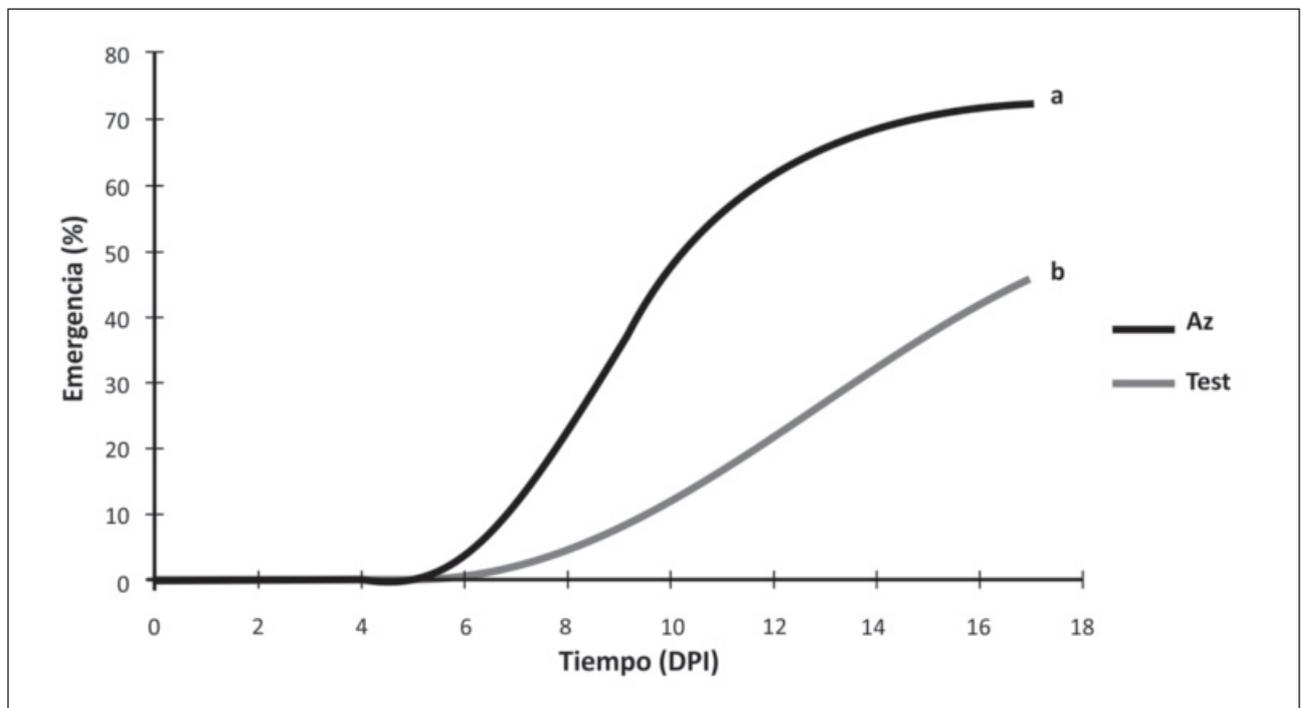


Figura 2. Dinámica de la emergencia de las plántulas de sorgo cuyas semillas fueron inoculadas por inmersión en la suspensión bacteriana durante 60 min (Az) con respecto a las plántulas sin inocular (Test). Valores de Emergencia (%) con diferentes letras, representan valores estadísticamente diferentes (Análisis de ANOVA con la Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

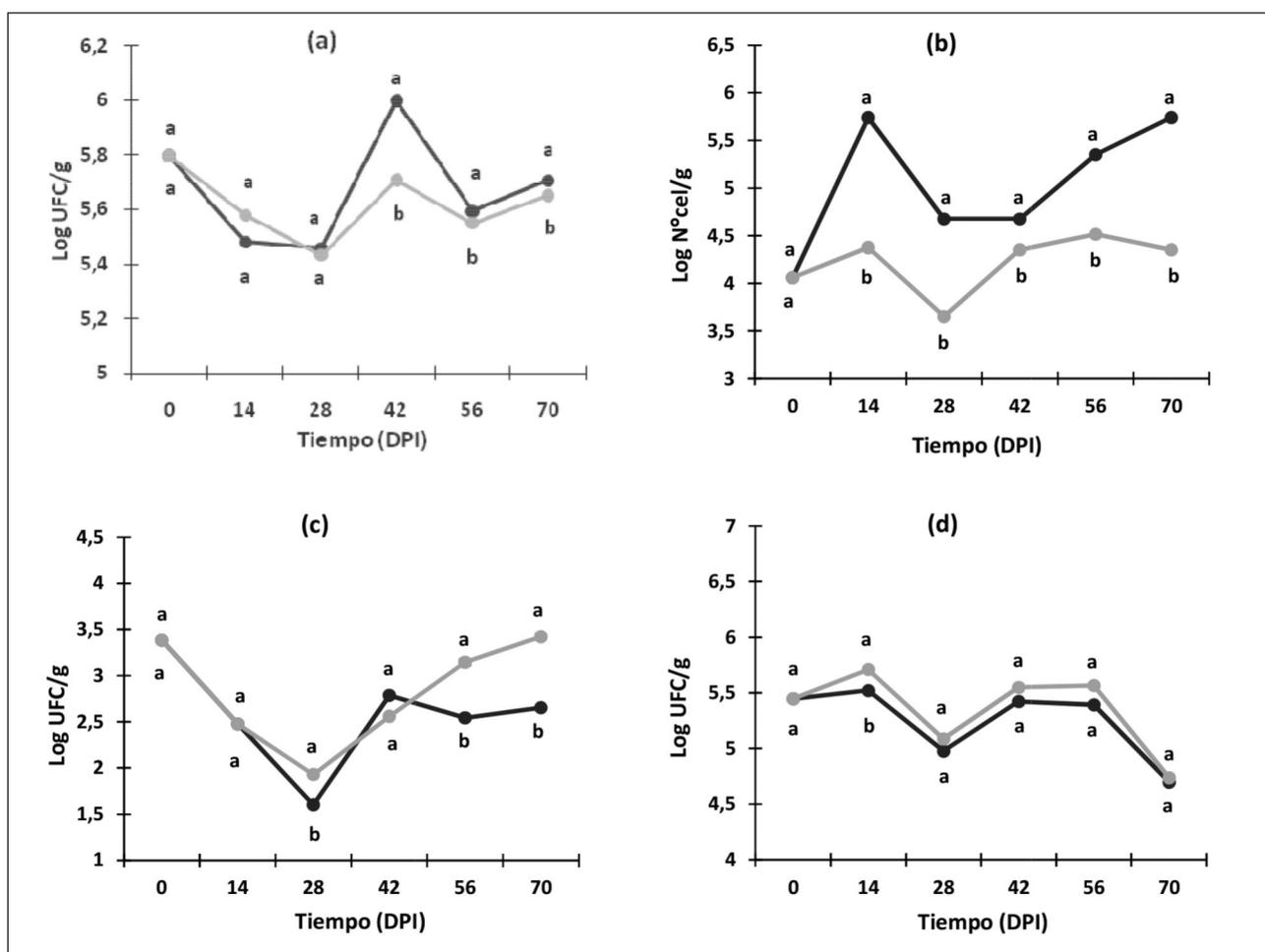


Figura 3. Influencia de la inoculación sobre el desarrollo de diferentes microorganismos: a) mesófilos aerobios totales, b) diazótrofos, c) microorganismos del género *Pseudomonas*, y d) hongos y levaduras, a los 0, 14, 28, 42, 56 y 70 DPI. La línea azul corresponde a la rizósfera de las plántulas inoculadas (Az), y la línea celeste a la rizósfera de las plántulas testigo sin inocular (Test). Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes (Análisis de ANOVA con la Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

tejidos (Pacovsky, 1990), en este trabajo se evaluó de manera conjunta la capacidad de la cepa Az39 de colonizar el suelo rizosférico y los diferentes tejidos de las plantas de inoculadas, y su relación con el efecto promotor del crecimiento.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la colonización de las plantas inoculadas por la cepa Az39.

Como puede observarse, a los 14 DPI *Azospirillum* colonizó la superficie del sistema radicular de las plántulas inoculadas, y a partir de los 28 DPI, la colonización se extendió hacia el interior de los tallos. A los 42 DPI, la bacteria se translocó además hacia el suelo rizosférico colonizando prácticamente todos los tejidos de las plantas, tanto de manera endofítica como superficial.

Tabla 2. Capacidad de *A. brasilense* Az39 de colonizar el suelo rizosférico y diferentes tejidos de las plantas de sorgo inoculadas.

Tiempo (DPI)	Tejido									Suelo rizosférico
	RSE	RE	Tallo	HSD B	HSD M	HSD P	HD B	HD M	HD P	
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La evaluación de los parámetros de crecimiento y desarrollo revelaron que hasta los 42 DPI el crecimiento de las plantas inoculadas fue similar al de las plantas testigo sin inocular (Figura 4).

Sin embargo, a partir de los 56 y hasta los 70 DPI, tanto la longitud como el peso fresco de la parte aérea y radicular de las plantas inoculadas superaron significativamente al de las plantas testigo. Este efecto positivo de la cepa Az39 sobre el peso fresco radicular estuvo asociado también a un mayor desarrollo de pelos

radiculares y de raíces secundarias (Figura 5).

Además, las observaciones fenológicas revelaron que a partir de los 42 DPI las plantas inoculadas presentaron mayor ritmo de desarrollo debido al mayor número de hojas verdes en comparación con las plantas testigo (Tabla 3).

Como puede observarse, el aumento en el crecimiento y desarrollo de las plantas de sorgo coincide con la presencia endofítica y superficial de la bacteria en los diferentes tejidos de las plantas inoculadas. Es

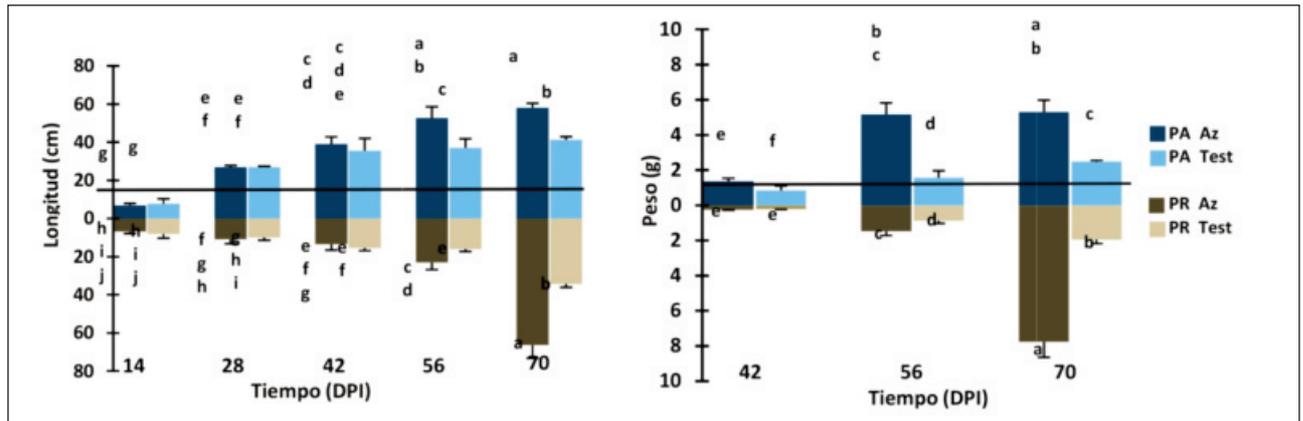


Figura 4. Longitud y peso fresco de la parte aérea y radicular de las plantas crecidas a partir de semillas inoculadas con respecto a las plantas testigo. Las barras en azul corresponden a los valores obtenidos para la parte aérea (PA) y las barras en marrón corresponden a los valores obtenidos para la porción radicular (PR). Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes (Análisis de ANOVA con la Prueba de Tukey, $p < 0,05$).

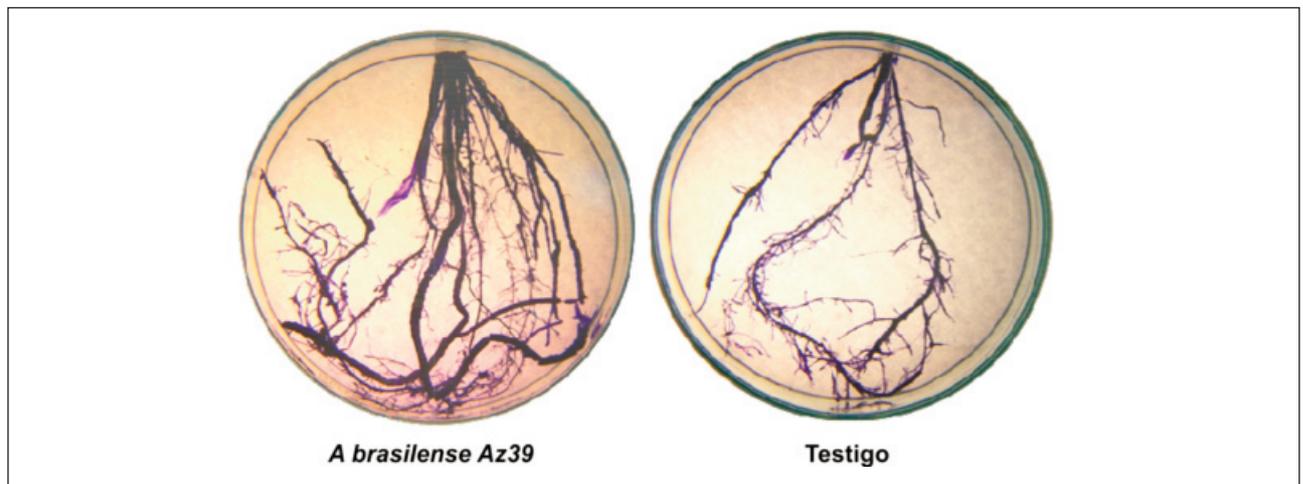


Figura 5. Desarrollo de pelos radiculares y raíces secundarias de las plantas inoculadas (*A brasilense* Az39) en comparación con las plantas control sin inocular (Testigo), evaluado a los 56 DPI.

Tabla 3. Evaluación del estado fenológico de las plantas inoculadas (Az) y sin inocular (Test).

Tratamiento	Número de hojas verdes				
	14 DPI	28 DPI	42 DPI	56 DPI	70 DPI
Az	2	4 ± 1	6 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
Test	2	4 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 1

importante destacar que el interior de las plantas proporciona un ambiente uniforme y protegido (Chen *et al.*, 1994), además de diferentes nutrientes que sirven como fuente de energía para el desarrollo de los distintos mecanismos de promoción de crecimiento, como la FBN, y la producción de compuestos reguladores del crecimiento (Christiansen-Weniger, 1998).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten confirmar que la cepa Az39 de *A. brasilense* es capaz de asociarse y promover el crecimiento y desarrollo de plantas sorgo azucarado, híbrido Argensil 165 BIO, que crecen bajo condiciones controladas de invernáculo, por lo que podría ser utilizada como un potencial biofertilizante para este cultivo. Si bien después de la inoculación el porcentaje de recuperación de *Azospirillum* en semillas inoculadas fue de solo el 26,70%, esta cantidad de bacterias fue suficiente para inducir un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas. La inoculación de las semillas de sorgo azucarado con la cepa Az39 de *A. brasilense* estuvo asociada a un mayor porcentaje de emergencia, un aumento en el peso fresco y en la longitud de la porción aérea y radicular de las plántulas, un mayor desarrollo de pelos radiculares y raíces secundarias y un mayor ritmo de crecimiento y desarrollo por un aumento en el número de hojas verdes. El mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas inoculadas coincide con la presencia endofítica y superficial de la cepa *A. brasilense* Az39 colonizando la rizósfera y los diferentes tejidos de las plántulas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Microbiología de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) por proporcionar los insumos y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo. Se agradece además a los integrantes de la Sección Agronomía de la Caña de Azúcar de la EEAOC por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Almodares, A.; M. Jafarinia and M. R. Hadi. 2009. The effects of nitrogen on chemical composition in corn and sweet sorghum. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 6(4): 441-446.

Baldani, V. L. D. and J. Döbereiner. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12 (4):433-439.

Bashan, Y. 1986. Significance of timing and level of

inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18 (3):297-301.

Bashan, Y.; G. Holguin and L. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, and environmental advances (1997–2003). *Can. J. Microbiol.* 50(8): 521-577.

Bashan, Y. and H. Levanony. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 31: 947-952.

Bashan, Y. and H. Levanony. 1989. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2899-2908.

Bashan, Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.

Bowman, A. F.; L. J. M. Boumans and N. H. Batjes. 2002. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: Summary of available measurement data. *Global Biogeochem. Cycles* 16(4): 1058.

Burdman, S.; J. Kigel and Y. Okon. 1997. Effects of *Azospirillum* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29: 923-929.

Cárdenas, D. M.; M. F. Garrido; R. R. Bonilla y V. L. Baldani. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes.* 33(3):1-1.

Cassán, F.; D. Perrig; V. Sgroj; O. Masciarelli; C. Penna and V. Luna. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Suelo Biol.* 45: 28-35.

Chen, C.; R. R. Belanger; N. Benhamou and T. C. Paulitz. 1994. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 477-486.

Christiansen-Weniger, C. 1998. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 55-76.

Díaz-Zorita, M.; R. M. Baliña; M. V. Fernández-Canigia and A. Peticari. 2004. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) with *Azospirillum brasilense* in the Pampas region, Argentina. RELAR, Rio de Janeiro (Brasil).

Díaz-Zorita, M. and J. H. Grove. 2006. Wheat grain response to nitrogen fertilization and field inoculation with a liquid formulation of *Azospirillum brasilense*. *International Annual Meetings.* 25031.

Döbereiner, J.; V. L. D. Baldani e J. I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de

- plantas não-leguminosas. Brasília-DF: Embrapa-SPI.
- Gan, Y.; E. H. Stobbe and J. Moes. 1992.** Relative date of wheat seedling emergence and its impact on grain yield. *Crop. Sci.* 32: 1275-1281.
- Medina, M.; E. Romero; J. Tonatto; A. Sánchez Ducca; P. Fernández González y S. Casen. 2012.** Efecto de la profundidad de siembra en la dinámica de la emergencia de plántulas del híbrido de sorgo azucarado Argensil 165 BIO. II Simposio de sorgo.
- Pacovsky, R. S. 1990.** Development and growth effects in the sorghum-*Azospirillum* association. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 555-563.
- Parra, Y. y F. Cuevas. 2001.** Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales.* 23 (3): 31-41.
- Penna, C.; R. Massa; F. Olivieri; G. Gutkind and F. Cassán. 2011.** A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express.* 1 (1): 1-10.
- Rivas, A.; D. Torres; C. Penna; V. Luna y F. Cassán. 2009.** Inoculación de semillas de trigo, maíz y soja con cultivos en fase exponencial o estacionaria de *A. brasilense* Az39 y su relación con la producción de fitohormonas y la promoción del crecimiento vegetal. VII Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y Fijación Biológica del Nitrógeno.
- Rodríguez Cáceres, E. A. 1982.** Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (4): 990-991.
- Romero, E. 2002.** Dinámica de la brotación, emergencia y crecimiento inicial de la caña de azúcar. Efecto del genotipo, factores ambientales y manejo. Tesis para optar al grado de Dr. en Agronomía. FAZ. UNT. 203.
- Romero, E. R.; G. Cárdenas; J. Scandaliaris y S. Casen. 2010.** Aprovechamiento bioenergético integral de la caña de azúcar y sorgo azucarado en el NOA. Importancia y perspectivas. *Avance Agroind.* 31 (3): 19-25.
- Saxena, B.; M. Modi and V. V. Modi. 1986.** Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2219-2224.
- Seshadri, S.; R. Muthukumarasamy; C. Lakshinarasimhan and S. Ignacimuthu. 2000.** Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Curr. Sci.* 79: 565-567.
- Thuler, D.; E. Flosch; W. Handro and M. Barbosa. 2003.** Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:174-178.