

Estudio de la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 como biofertilizante en caña de azúcar

Lucía Vera*, Noel Grellet Naval**, María de los Ángeles Núñez*, Luis Alonso*, Fernanda Leggio Neme*, Pablo Fernández González, Eduardo R. Romero y María Laura Tortora*

RESUMEN

La cepa *Azospirillum brasilense* Az39 es una de las bacterias más utilizadas para mejorar el crecimiento y la productividad de diferentes cultivos de importancia agrícola, entre ellos la caña de azúcar. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue evaluar, mediante bioensayos realizados bajo condiciones controladas de invernáculo, la capacidad de la cepa Az39 de colonizar el suelo y diferentes tejidos de plantas jóvenes de caña de azúcar, y analizar si esa colonización está asociada a un efecto promotor del crecimiento. Para ello se diseñó un ensayo completamente aleatorizado en el que se inocularon por riego diferentes propágulos de caña de azúcar -yemas aisladas y estacas uni y binodales con los biofertilizantes comerciales Gramen y AZP (Azur Soil SA), que contienen la cepa Az39 en su composición. En diferentes días posteriores a la inoculación se evaluaron diversos parámetros de crecimiento y desarrollo: número de hojas verdes, longitud aérea y radicular y peso fresco aéreo y radicular. Se analizó, además, la presencia de la bacteria en el suelo y su capacidad para colonizar en forma endofítica y superficial los diferentes tejidos de las plantas inoculadas. El mayor crecimiento y desarrollo observado, tanto en la parte aérea como en el sistema radicular de las plantas inoculadas, confirma la capacidad de la cepa Az39 de promover el crecimiento inicial de la caña de azúcar. El efecto promotor del crecimiento inducido por Az39 se observó para todos los propágulos inoculados y estuvo fuertemente asociado a la presencia endofítica y superficial de la bacteria en los diferentes tejidos de las plantas.

Palabras clave: cañaverales, sustentabilidad, biofertilización.

ABSTRACT

Study of *Azospirillum brasilense* Az39 strain as sugar cane biofertilizer

Azospirillum brasilense Az39 strain is one of the bacteria most used for improving growth and productivity of different important crops, such as sugar cane. Thus this work aimed to evaluate the ability of Az39 strain to colonize soil and different young sugar cane tissues under greenhouse conditions, and to analyze if this colonization had a growth promoting effect. For this, a completely randomized design was used in which different sugar cane propagation organs (isolated buds and one and two-node setts) were inoculated by irrigation with commercial biofertilizers AZP and Gramen (Azur Soil SA), which contain Az39 strain. On different post inoculation days, we evaluated some growth and development parameters, namely number of green leaves, aerial stem and root length, and aerial and root fresh weight. We also evaluated the presence of Az39 strain on rhizosphere soil samples, and its ability to endophytically colonize different inoculated sugar cane tissue samples. It was observed that after bacterial inoculation, sugar cane plants showed higher root and aerial development, confirming the ability of Az39 strain to promote early sugar cane growth. This growth promoting effect induced by Az39 strain was observed in all sugar cane propagation organs, and was strongly associated with endophytic and rhizosphere bacterial colonization of different sugar cane tissues.

Key words: sugar cane field, sustainability, biofertilizers.

Artículo recibido: 05/03/14 y Aceptado: 30/06/17.

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

** Ledesma SAAI.

INTRODUCCIÓN

La producción de caña de azúcar es una de las actividades de mayor importancia económica y social en el noroeste argentino, y ese cultivo es la principal fuente para la obtención de azúcar y la materia prima más eficiente para la producción de bioetanol.

Debido a su elevada capacidad de producción de biomasa y a la prolongada duración de su ciclo, la caña de azúcar posee elevados requerimientos tanto de nutrientes como de agua. Entre los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, el nitrógeno (N) es considerado el más importante, ya que forma parte de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes orgánicos. Si bien las plantas superiores pueden asimilar gran parte del nitrógeno presente en el suelo, este elemento no resulta suficiente para satisfacer los requerimientos del cultivo. Por esta razón, la fertilización nitrogenada constituye una práctica agronómica necesaria (Romero *et al.*, 2009).

En Tucumán, la fertilización nitrogenada de la caña de azúcar se lleva a cabo principalmente mediante el uso de fertilizantes químicos, entre los cuales el más utilizado es la urea (Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando es aplicada en una cantidad mayor de la que puede absorber el cultivo, el resto no asimilado se pierde por lixiviación, desnitrificación y/o volatilización. Las pérdidas por lixiviación implican la filtración del nitrógeno a través del suelo en forma de nitratos solubles en agua que contaminan aguas subterráneas y superficiales produciendo eutrofización. Las pérdidas de nitrógeno en forma gaseosa pueden darse por volatilización en forma de amoníaco (Scandaliaris *et al.*, 2000) o por desnitrificación, proceso microbiológico que se produce en suelos compactados, con baja permeabilidad y falta de oxígeno, donde los microorganismos transforman el nitrógeno proveniente de los fertilizantes en óxido nitroso (N_2O). Este compuesto es uno de los gases de efecto invernadero responsable de la destrucción de la capa de ozono (Moreno Seceña, 2010). Desde el punto de vista microbiológico, el uso excesivo e inadecuado de fertilizantes nitrogenados produce modificaciones indeseables en la composición de las poblaciones microbianas del suelo y de la caña, afectando el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Bueno dos Reis Jr. *et al.*, 2000; Anitha y Thangaraju, 2010).

Durante los últimos años, la creciente necesidad de implementar sistemas sustentables en el manejo de los cañaverales ha llevado a la utilización de los biofertilizantes como alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos. Los biofertilizantes están constituidos por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas o bacterias PGPB (siglas en inglés de "plant growth promoting bacteria"), capaces de mejorar la

nutrición, la sanidad y el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos tales como la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas y la solubilización de fosfatos (Saharan and Nehra, 2011).

Azospirillum es uno de los géneros de bacterias PGPB más estudiados debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola (Bashan *et al.*, 2004). En particular, la cepa *A. brasilense* Az39 fue seleccionada en nuestro país por ser una de las rizobacterias más eficientes en mejorar la productividad de cultivos de interés agrícola y especialmente en promover el crecimiento de gramíneas (Díaz Zorita *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, mediante bioensayos realizados en condiciones controladas de invernáculo, la capacidad de la cepa *A. brasilense* Az39 para colonizar tanto el suelo como los diferentes tejidos de plantas jóvenes de caña de azúcar, y analizar si la colonización está asociada a un efecto promotor del crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con la variedad de caña de azúcar LCP 85-384, por ser la más difundida en nuestra provincia (Ostengo *et al.*, 2012). Como material vegetal se utilizaron yemas aisladas, estacas uninodales y estacas binodales, ya que constituyen propágulos de uso frecuente en la multiplicación agámica de la caña de azúcar, con dinámicas y características de crecimiento diferentes. Bajo condiciones apropiadas de crecimiento las yemas aisladas presentan una rápida velocidad de brotación, a diferencia de las estacas.

Las yemas que contenían una pequeña porción de tejido caulinar fueron extraídas a partir de la porción central de los tallos, con ayuda de una pinza sacabocado (Figura 1).

Para la obtención de las estacas uninodales (Figura 2a) y binodales (Figura 2b), la porción central de los tallos se cortó con ayuda de un machete previamente desinfectado en trozos que contenían una o dos yemas, respectivamente.

Biofertilizantes

Se evaluaron diferentes biofertilizantes comerciales provistos por la empresa Azur Soil SA, cuya composición se detalla a continuación:

- **AZP:** biofertilizante a base de *Az39 A. brasilense* (1×10^9 UFC/ml)

- **Gramen:** inoculante líquido para gramíneas, formulado a partir de la mezcla de "starter" con la cepa *A. brasilense* Az39, en una proporción 3:1 (v/v), respectivamente. El "starter" es una formulación líquida a base de microorganismos seleccionados:



Figura 1. Esquema del proceso de extracción de las yemas: a) y b) pinza utilizada para la extracción de las yemas; c) yemas utilizadas en los bioensayos.



Figura 2. Material vegetal utilizado en los bioensayos: a) estacas uninodales y b) estacas binodales.

- Aerobios mesófilos totales ($2,3 \cdot 10^6$ UFC/ml)
- Hongos y levaduras ($2,0 \cdot 10^3$ UFC/ml)
- Organismos celulolíticos ($2,5 \cdot 10^5$ UFC/ml)
- Organismos amonificadores ($2,5 \cdot 10^7$ UFC/ml)
- Organismos nitrificadores ($5,0 \cdot 10^1$ UFC/ml)
- Macroelementos (NO₃, P, K)
- Microelementos (B, Ca, Mg)

Previo a la inoculación del material vegetal, los biofertilizantes comerciales se diluyeron en agua destilada estéril 1/100 (v/v).

Inoculación y siembra

La aplicación de los biofertilizantes se realizó por riego sobre el material vegetal. Para ello, las yemas se colocaron en bandejas de 25 celdas, colocándose una yema por celda, mientras que las estacas uninodales y binodales se dispusieron en macetas plásticas de 20 litros, colocándose cuatro estacas uninodales y dos binodales por maceta. Luego se aplicaron 5 ml de los diferentes biofertilizantes sobre las yemas, y 10 ml y 20 ml sobre las estacas uni y binodales, respectivamente. Luego de la inoculación, tanto las yemas como las estacas se cubrieron con sustrato. En todos los casos, como sustrato se utilizó

una mezcla no estéril de tierra y Perlome, en proporción 3:1 (p/p). Como testigo se utilizaron yemas y estacas uni y binodales regadas con agua destilada estéril. Las bandejas y macetas se conservaron en el invernáculo de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) y fueron regadas tres veces por semana. El riego de las bandejas se realizó aplicando 20 ml de agua por celda y 500 ml de agua por maceta.

Diseño experimental

Los tratamientos a evaluar fueron:

- Yemas inoculadas con AZP
- Yemas inoculadas con Gramen
- Yemas testigo sin inocular
- Estacas uninodales inoculadas con AZP
- Estacas uninodales inoculadas con Gramen
- Estacas uninodales testigo sin inocular
- Estacas binodales inoculadas con AZP
- Estacas binodales inoculadas con Gramen
- Estacas binodales testigo sin inocular

El diseño experimental de los ensayos fue completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se utilizó el

programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (Anova), y para el contraste de medias se utilizó la prueba de Tukey.

Evaluaciones

Las evaluaciones del efecto promotor del crecimiento y de la capacidad de colonización de Az39 se realizaron en diferentes días posteriores a la inoculación (DPI), según el material vegetal utilizado. Bajo condiciones apropiadas de crecimiento y desarrollo, los diferentes propágulos evaluados presentan distintas velocidades de brotación. Por esta razón, la evaluación de las yemas se realizó a los 20, 35 y 60 DPI; las estacas uninodales se evaluaron a los 20, 40 y 60 DPI; y las estacas binodales se evaluaron a los 80, 110 y 140 DPI.

Efecto promotor del crecimiento

A diferentes DPI se evaluaron algunos parámetros de crecimiento tales como el peso fresco de la parte aérea y radicular, la longitud de la parte aérea y radicular y el ritmo de desarrollo de las plantas por determinación del número de hojas verdes (hojas totalmente expandidas hasta la hoja +1).

Capacidad de colonización de Az39

A fin de evaluar la capacidad de la cepa Az39 de colonizar y permanecer tanto en el suelo como en los distintos tejidos de las plántulas se tomaron muestras a diferentes DPI. Las muestras se procesaron según se describe a continuación:

Raíces: se lavaron con agua potable y luego con agua destilada estéril, se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente y se transfirieron al medio de cultivo malato libre de nitrógeno NFb semisólido (Döbereiner *et al.*, 1995), cuya composición es: ácido málico 5 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/l; NaCl 0,1 g/l; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,02 g/l; KOH 4,5 g/l; agar 1,75 g/l; pH 6,8, ajustado con KOH 0,1 N. Para evaluar la colonización endofítica, las raíces se lavaron con agua potable y luego con agua destilada estéril; posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 4% (v/v) durante 10 min y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente y se sembraron en medio NFb semisólido.

Hojas: se lavaron con agua potable y luego con agua destilada estéril. Para diferenciar la colonización endofítica de la superficial, algunas hojas se desinfectaron superficialmente pulverizándolas con alcohol etílico 70°. Las distintas partes de las hojas (base, medio y punta) se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm², que se transfirieron al medio de cultivo NFb semisólido.

Tallos: se lavaron con agua potable y luego con agua destilada estéril; posteriormente y con la ayuda de un

bisturí estéril, se pelaron y cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Después, los fragmentos se transfirieron al medio de cultivo NFb semisólido.

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. Después de homogeneizar cada una de las muestras, se tomaron 0,1 ml y se sembraron en frascos conteniendo el medio NFb semisólido.

Estacas: se lavaron con agua potable y luego con agua destilada estéril; posteriormente, con la ayuda de un bisturí estéril se eliminaron las capas externas. El tejido interno se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 cm que se sembraron en medio NFb semisólido.

Los frascos de NFb conteniendo las diferentes muestras se incubaron a 30°C durante 72 h. 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 (0,5 g/l) y Rojo Congo (15 ml/l de una solución acuosa 1:400 [p/v]). Las placas se incubaron a 30°C durante 72 h. Las colonias de *Azospirillum* se caracterizan por ser pequeñas, secas y de color rojo escarlata (Rodríguez Cáceres, 1982; Bashan and Levanony, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Yemas aisladas:

Evaluación del efecto promotor del crecimiento

Los resultados correspondientes al desarrollo de la parte aérea y radicular de las plántulas crecidas a partir de yemas se muestran en la Figura 3. De manera general, se puede observar que las plantas inoculadas con los biofertilizantes AZP y Gramen presentaron un mayor crecimiento y desarrollo en comparación con las plantas testigo sin inocular.

Las plantas del tratamiento AZP presentaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo del sistema aéreo y radicular con respecto a las plantas testigo para todos los tiempos evaluados. A los 20 y 35 DPI, el desarrollo del sistema aéreo de las plántulas crecidas a partir de yemas inoculadas con AZP superó al testigo en 7 cm de altura y 0,6 g de peso (Figura 4). En este sentido, es importante destacar que el rápido establecimiento de la plántula es un factor de fundamental importancia, teniendo en cuenta que cuando las yemas se siembran en un sustrato no estéril y se colocan bajo condiciones de invernáculo son muy susceptibles a la deshidratación y al posible ataque por parte de hongos fitopatógenos.

Cabe destacar el aumento significativo observado en el peso del sistema radicular que presentaron las plántulas inoculadas con AZP para todos los tiempos

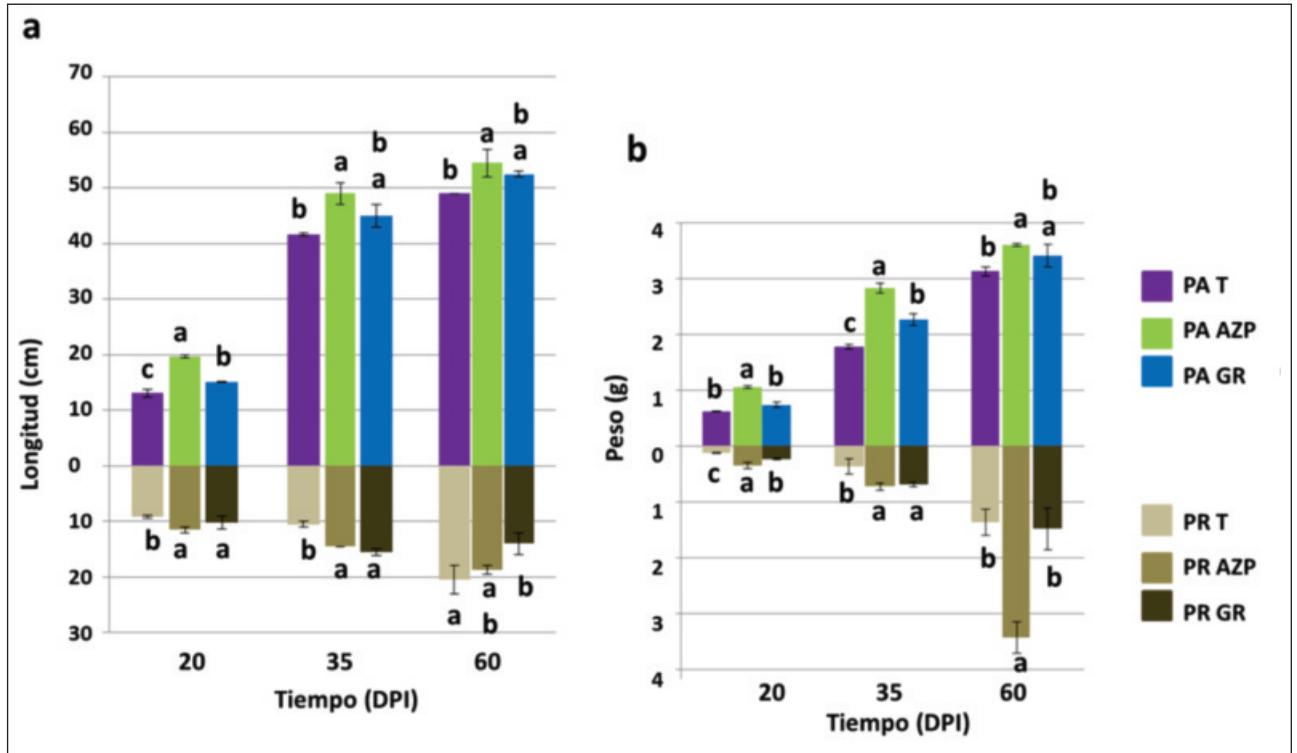


Figura 3. (a) Longitud y (b) peso fresco de la parte aérea (PA) y radicular (PR) de las plantas inoculadas mediante riego de yemas con: AZP (AZP), Gramen (GR) y agua destilada (T). Los datos obtenidos corresponden al valor promedio de tres repeticiones, y las barras a la desviación estándar. Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes para cada tiempo evaluado (análisis de Anova con la prueba de Tukey, $p < 0,05$).

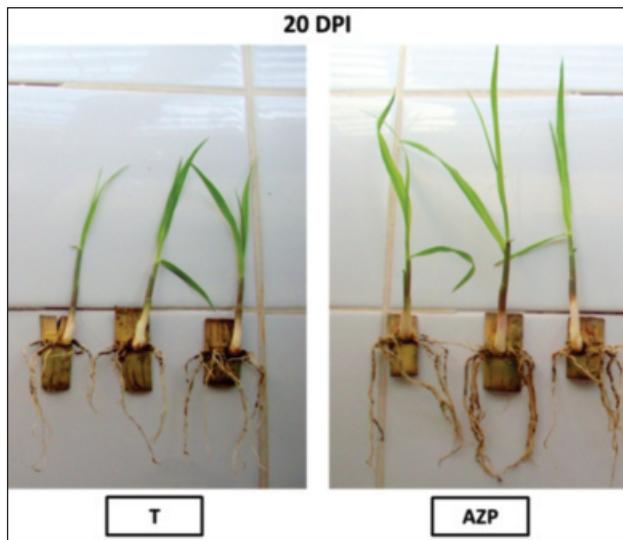


Figura 4. Aspecto de las plantas de caña de azúcar inoculadas mediante riego de yemas con AZP, en comparación con las plantas testigo sin inocular. Evaluación a los 20 DPI.

evaluados en comparación a las plantas testigo. Principalmente a los 60 DPI, donde el peso de las raíces del tratamiento AZP fue aproximadamente 2 g superior al de las plantas testigo. Este gran incremento estuvo asociado a un mayor número de raíces por planta, un aumento en el número y longitud de las raíces secundarias

y un mayor desarrollo de pelos radicales. Esto podría explicarse teniendo en cuenta la gran capacidad de producción y excreción de indoles que presenta la cepa *A. brasilense* Az39 (Perrig *et al.*, 2007). Si bien la producción de ácido indol acético (AIA) por *Azospirillum* ha sido correlacionada con la inducción de diferentes procesos fisiológicos en las plantas, se ha demostrado que estimula principalmente el crecimiento y desarrollo del sistema radicular (Kolb and Martin, 1985).

Al analizar el ritmo de desarrollo de las plántulas de los diferentes tratamientos, en general no se observaron diferencias en el número de hojas verdes entre las plantas inoculadas y las plantas testigo sin inocular. Las plantas inoculadas con Gramen presentaron un mayor número de hojas expandidas solamente a los 60 DPI (Tabla 1).

Evaluación de la capacidad de colonización de Az39

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. La cepa Az39 de *A. brasilense*, presente tanto en el biofertilizante AZP como en Gramen, fue capaz de colonizar el suelo rizosférico y traslocarse desde el sitio de inoculación hacia los diferentes tejidos de las plántulas. Sin embargo, solo cuando las plantas se inocularon con AZP se observó la presencia endofítica de la bacteria colonizando el interior de las raíces y de las hojas.

En este sentido, algunos autores han reportado

Tabla 1. Ritmo de desarrollo de las plantas de caña de azúcar inoculadas mediante riego de yemas, en comparación con las plantas sin inocular (n=3).

Tratamientos	N° Hojas Verdes		
	20 DPI	35 DPI	60 DPI
T	3	4	4
Azp	3	4	4
Gr	3	4	5

Tabla 2. Capacidad de *A. brasilense* Az39 de colonizar el suelo rizosférico y diferentes tejidos de las plantas de caña de azúcar inoculadas mediante riego de yemas.

AZP										
Tiempo DPI	Tejidos									
	RSE	RE	TALLO	HSDB	HSDM	HSDP	HDB	HDM	HDP	Suelo
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
35	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
60	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
GR										
Tiempo DPI	Tejidos									
	RSE	RE	TALLO	HSDB	HSDM	HSDP	HDB	HDM	HDP	Suelo
20	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
60	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
T										
Tiempo DPI	Tejidos									
	RSE	RE	TALLO	HSDB	HSDM	HSDP	HDB	HDM	HDP	Suelo
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RE y RSE: raíces estériles y sin esterilizar, respectivamente; HD y HSD: hojas desinfectadas y sin desinfectar, respectivamente; y B, M y P: diferentes porciones de las hojas (base, medio y punta). Los signos (+) y (-) indican presencia y ausencia de *Azospirillum*, respectivamente.

que para que exista un efecto promotor del crecimiento por *Azospirillum* es necesario que la bacteria sea capaz de colonizar los tejidos en forma endofítica (Pacovsky, 1990). Es importante destacar que el interior de las plantas proporciona un ambiente uniforme y protegido (Chen *et al.*, 1999), además de diferentes nutrientes que sirven como fuente de energía para el desarrollo de los distintos mecanismos de promoción de crecimiento, tales como la fijación biológica de nitrógeno y la producción de compuestos reguladores del crecimiento (Christiansen-Weniger, 1998). Por esta razón, la presencia de la bacteria en el interior de los tejidos podría explicar, al menos en parte, el mayor crecimiento aéreo y radicular de las plantas del tratamiento AZP en comparación con el resto

de los tratamientos evaluados.

Como era de esperar, en las plantas testigo no se observó la presencia de *Azospirillum* en el suelo ni en los diferentes tejidos evaluados.

Estacas uni y binodales

Evaluación del efecto promotor del crecimiento

Los resultados correspondientes al crecimiento y desarrollo inicial de la parte aérea y radicular de las plantas cuyas estacas fueron inoculadas por riego se muestran en la Figura 5.

En el caso de las estacas uninodales, se observó que a partir de los 40 DPI y hasta los 60 DPI, tanto la longitud como el peso de la parte aérea de las plantas inoculadas con AZP superaron significativamente al testigo sin inocular por aproximadamente 10 cm de altura y 0,8 g de peso. En cambio, las plantas inoculadas con Gramen generalmente no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo. Solo se pudo observar un mayor peso de la parte aérea, en comparación al del testigo, a los 40 DPI y 60 DPI que fue de 0,2 y 0,4 g, respectivamente (Figura 5 a y b).

En cuanto a las estacas binodales, evaluadas a partir de los 80 DPI, se puede observar que las plantas inoculadas con los diferentes biofertilizantes se

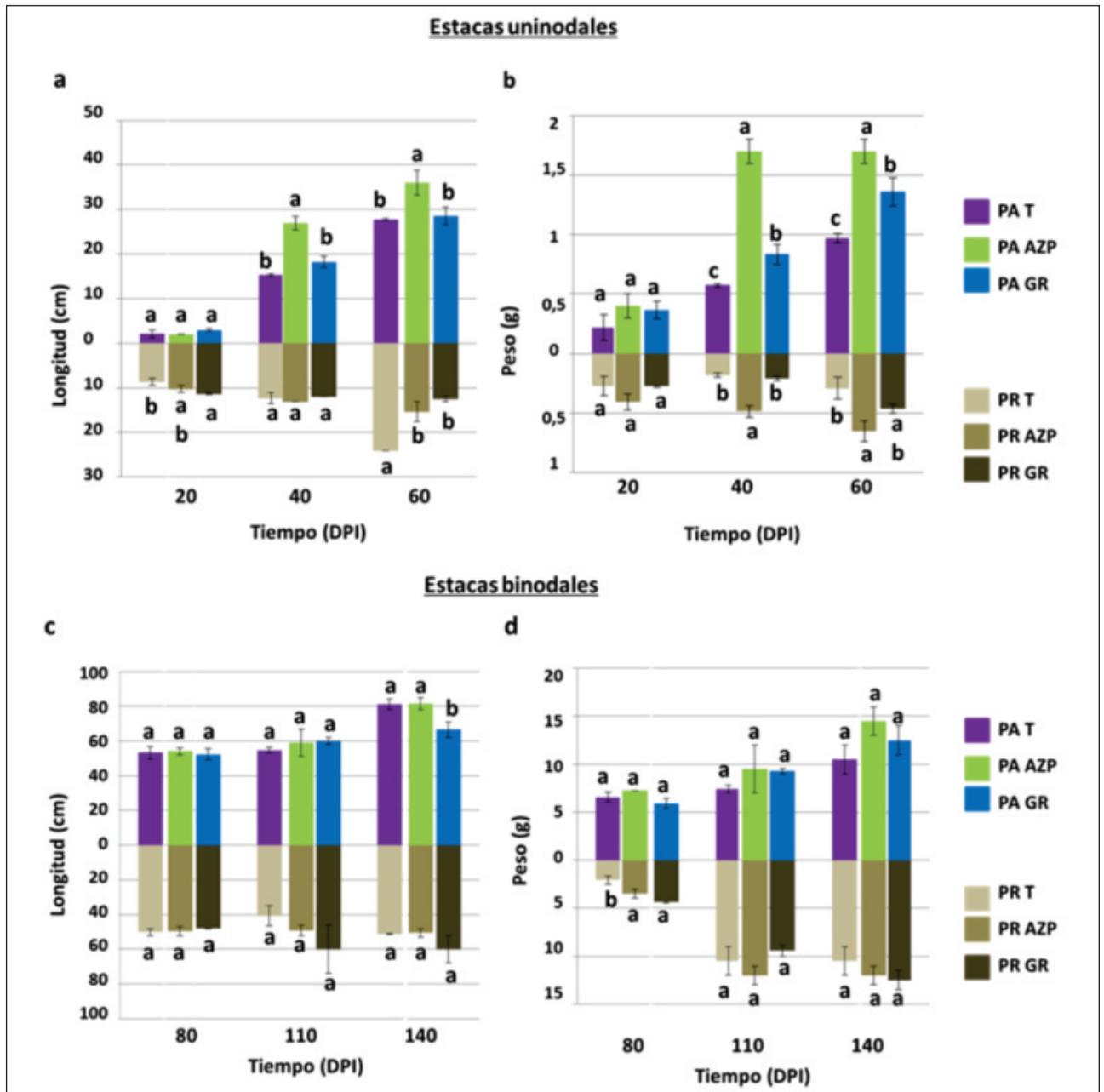


Figura 5. Longitud y peso fresco de la parte aérea (PA) y radicular (PR) de las plantas inoculadas por riego: a y b) estacas uninodales; c y d) estacas binodales.

Los datos obtenidos corresponden al valor promedio de tres repeticiones, y las barras a la desviación estándar. Letras distintas representan valores estadísticamente diferentes para cada tiempo evaluado (análisis de ANOVA con la prueba de Tukey, $p < 0,05$).

comportaron de manera similar a las plantas testigo durante todos los tiempos evaluados. Sólo a los 80 DPI pudo observarse un aumento en el peso fresco de las raíces de las plantas inoculadas con los biofertilizantes, en comparación con las plantas sin inocular. Este aumento fue de aproximadamente 2 g (Figura 5 c y d).

En la Figura 6 se muestra el aspecto de las plantas crecidas a partir de estacas uninodales inoculadas por riego a los 40 DPI y el de las plantas crecidas a partir de estacas binodales a los 140 DPI.

Al analizar el ritmo de crecimiento de las plantas crecidas a partir de estacas uninodales, en general no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas con los biofertilizantes y las plantas testigo. Solo se observó, a los 60 DPI, un aumento en el número de hojas verdes en las que fueron inoculadas con Gramen, similar a lo observado en el caso de las yemas (Tabla 3a).

En cuanto a las plantas crecidas a partir de estacas binodales, las observaciones fenológicas revelaron un mayor desarrollo foliar de las plantas

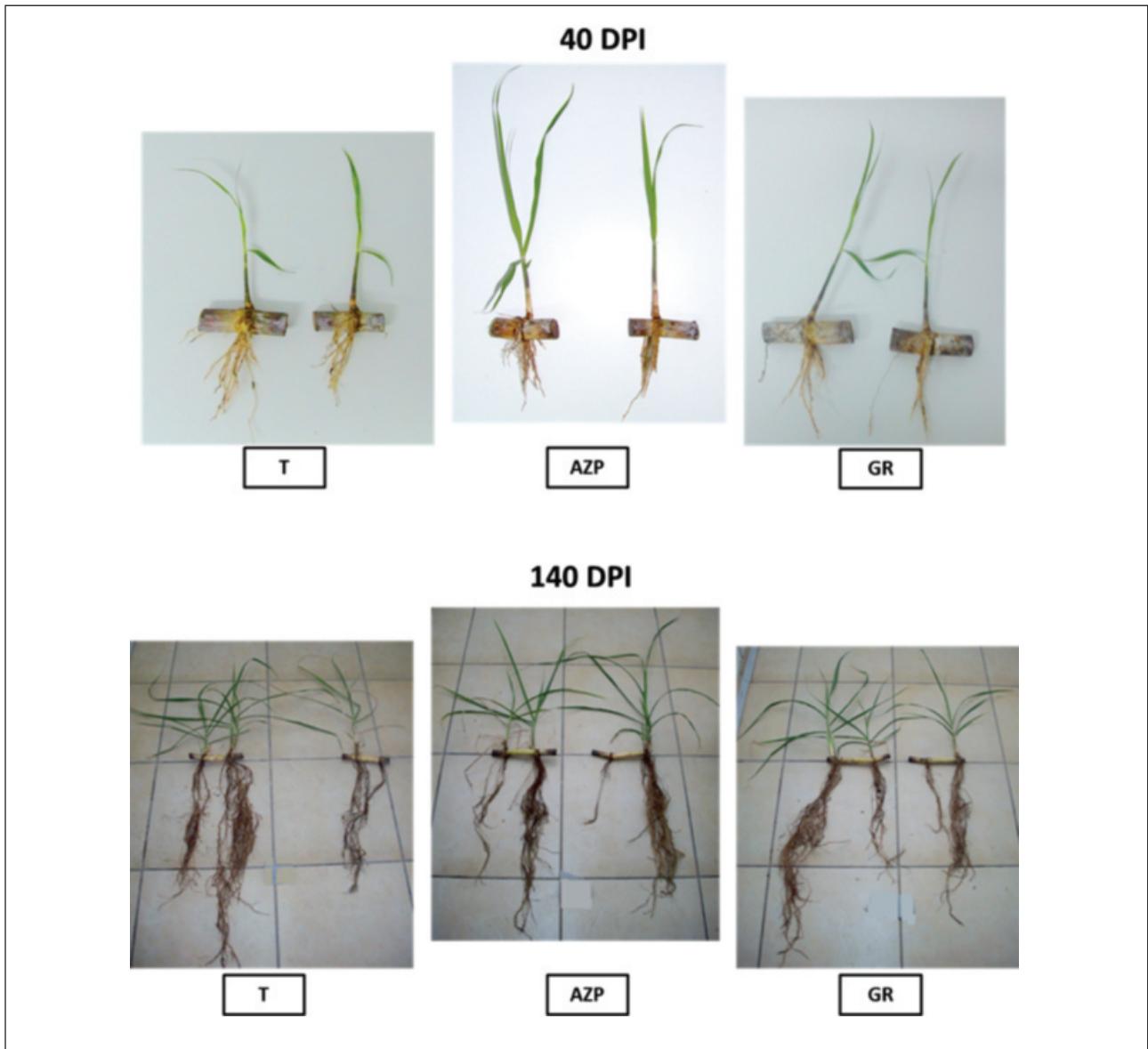


Figura 6. Aspecto de las plantas de caña de azúcar crecidas a partir estacas uni y binodales inoculadas por riego con AZP (A_R) y Gramen (G_R), en comparación con las plantas sin inocular T_R .

Tabla 3. Evaluación del ritmo de desarrollo de las plantas de caña de azúcar inoculadas mediante riego de estacas (a) uni y (b) binodales, en comparación con las plantas sin inocular ($n=3$).

A Tratamientos	N° Hojas Verdes			B Tratamientos	N° Hojas Verdes		
	20 DPI	35 DPI	60 DPI		20 DPI	35 DPI	60 DPI
T	0	3	3	T	0	3	3
Azp	0	3	3	Azp	0	3	3
Gr	0	3	4	Gr	0	3	4

inoculadas con AZP en comparación con las testigo sin inocular solamente a los 140 DPI, mientras que para GR se observaron diferencias a los 110 y 140 DPI (Tabla 3b). A los 110 DPI, las plantas del tratamiento GR

presentaron un mayor ritmo de desarrollo en comparación con las plantas del tratamiento AZP; sin embargo, estas diferencias se equipararon a los 140 DPI.

Evaluación de la capacidad de colonización de Az39

A fin de evaluar si las plántulas crecidas a partir de estacas inoculadas con AZP y Gramen están colonizadas

por *Azospirillum*, se tomaron muestras de suelo rizosférico y de diferentes tejidos en distintos DPI. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. En el caso de las

Tabla 4. Capacidad de *A. brasilense* Az39 de colonizar el suelo rizosférico y diferentes tejidos de las plantas de caña de azúcar inoculadas mediante riego de estacas uni y binodales.

Estacas uninodales												
AZP												
Tiempo DPI	Tejidos											
	RSE	RE	Brote	Cepa	HSDB	HSDM	HSDP	HDB	HDM	HDP	Suelo	
20	+	-	+	+							+	
40	+	-		+	+	-	-	-	-	-	+	
60	+	-		+	+	+	-	-	-	-	+	
GR												
20	-	-	+	+							+	
40	+	-		+	+	+	+	-	-	-	+	
60	+	-		+	+	+	-	-	-	-	-	
T												
20	-	-	-	-							-	
40	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
60	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	
Estacas binodales												
AZP												
Tiempo DPI	Tejidos											
	RSE	RE	Brote	Cepa	HSDB	HSDM	HSDP	HDB	HDM	HDP	Suelo	
80	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GR												
80	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
110	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
T												
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

estacas uninodales, a los 20 DPI se detectó la presencia de *Azospirillum* tanto en el suelo rizosférico como en los tejidos internos de las cepas y los brotes de las plantas inoculadas, y solamente en las plantas inoculadas con AZP se detectó la presencia de *Azospirillum* asociada a la superficie de las raíces. Recién a partir de los 40 DPI la bacteria fue capaz de traslocarse y colonizar la superficie de las hojas.

En el caso de las estacas binodales evaluadas a partir de los 80 DPI, se puede observar que la bacteria colonizó de manera endofítica y superficial casi la totalidad de los tejidos evaluados y el suelo rizosférico cuando las estacas se inocularon con AZP. En el caso de estacas inoculadas con Gramen, los tallos, raíces y hojas fueron colonizados. Sin embargo, a partir de los 110 DPI, la presencia de *Azospirillum* se observó solamente en la superficie de las hojas en el tratamiento GR, mientras que a los 140 DPI no se observó la presencia de *Azospirillum* en ninguno de los tratamientos evaluados.

La presencia de *Azospirillum* colonizando el suelo rizosférico y los diferentes tejidos de las plantas inoculadas, observada a los 80 DPI, podría explicar el mayor crecimiento y desarrollo aéreo y radicular. En cambio, a partir de los 110 DPI el crecimiento de las plantas inoculadas fue similar al de las plantas testigo, lo cual coincide con la ausencia de *Azospirillum* en el suelo y en los diferentes tejidos evaluados.

CONCLUSIONES

Mediante los diferentes bioensayos se demostró que la inoculación de yemas aisladas y estacas uninodales de caña de azúcar con el biofertilizante AZP mejoró el crecimiento inicial, tanto aéreo como radicular, de las plántulas. Estos resultados coinciden con la presencia endofítica de la bacteria, colonizando el interior de las raíces y hojas de las plantas inoculadas.

Se observó además que en las estacas binodales, en las cuales las determinaciones se hicieron a partir de los 80 DPI, no se detectaron diferencias con respecto al testigo, lo que coincide con la ausencia de la bacteria en los tejidos de las plantas inoculadas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se demostró que bajo condiciones controladas, la colonización endofítica y superficial de Az39 luego de la inoculación es un factor fundamental para mejorar el crecimiento y desarrollo inicial del cultivo de la caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Laboratorio de Microbiología de la Sección Química de la EEAOC por proporcionar los insumos y equipos necesarios para el desarrollo de este

trabajo; y a la Empresa Azur Soil SA por proporcionar los bioproductos comerciales.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Anitha, K. V. and M. Thangaraju. 2010.** Influence of N fertilization on colonization and activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Agro. Crop. Sci.* 1 (1): 6-11.
- 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 (10): 947-952.
- Bueno dos Reis Jr., F.; V. Massena Reis; S. Urquiaga and J. Döbereiner. 2000.** Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil* 219: 153-159.
- Chen, C.; R. R. Belanger; N. Benhamou and T. C. Paulitz. 1999.** Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *Eur. J. Plant Pathol.* 105 (5): 477-486.
- Christiansen-Weniger, C. 1998.** Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1): 55-76.
- Díaz Zorita, M.; R. Baliña; M. Fernandez-Canigia; C. Penna and A. Perticari. 2004.** Field inoculation of wheat and maize with a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* in the Pampas, Argentina. En: ASA-CSSA-SSSA Abstracts of International Annual Meetings, Seattle, USA.
- Döbereiner, J.; V. L. D. Baldani e J. I. Baldani. 1995.** Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília-DF, Brasil.
- Kolb, W. and P. Martin. 1985.** Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In: Klingmüller, W (ed.), *Azospirillum* III, Berling Heidelberg. pp. 215-221.
- Moreno Seceña, J. C. 2010.** Evaluación del manejo del nitrógeno en el agroecosistema caña de azúcar. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados Campus Veracruz, Tepetates, Veracruz, México.
- Ostengo, S.; M. A. Espinosa; M. B. García; N. Delgado y M. I. Cuenya. 2012.** Distribución varietal del cultivo de la caña de azúcar y aplicación de otras tecnologías en la provincia de Tucumán. Relevamiento de la campaña 2010/2011. *Gac. Agroindustrial EEAOC* (76).

- Pacovsky, R. S. 1990.** Development and growth effects in the sorghum - *Azospirillum* association. *J. Appl. Bacteriol.* 68 (6):555-563.
- Perrig, D.; L. Boiero; O. Masciarelli; C. Penna; O. Ruíz; F. Cassán and V. Luna. 2007.** Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum* brasilense, and their implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (5):1143-1150.
- Rodríguez Cáceres, E. A. 1982.** Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (4): 990-991.
- Romero, E. R.; L. G. P. Alonso; S. D. Casen; M. F. Leggio Nemme; M. J. Tonatto; J. Scandaliaris; P. A. Digonzelli; J. A. Giardina y J. Fernández de Ullivarri. 2009.** Fertilización de la caña de azúcar, criterios y recomendaciones. En: Romero, E. R.; P. A. Digonzelli y J. Scandaliaris (eds.), *Manual del Cañero*, EEAOC, Tucumán, R. Argentina, pp. 87-99.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 1-30.
- Scandaliaris, J.; F. Pérez Zamora; E. R. Romero y E. Argiró. 2000.** Las pérdidas de nitrógeno de los fertilizantes por la volatilización de amoníaco. *Publ. Espec. EEAOC* (18): 23-28.