

**EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA EN FILÓSFERA Y EFECTO PROMOTOR DEL  
CRECIMIENTO DE *Gluconacetobacter* sp. Y *Azospirillum* sp. EN RYE GRASS ANUAL  
(*Lolium multiflorum* Lam.) EN EL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

Trabajo Final de Grado  
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Junín, 16 de marzo de 2021

**EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA EN FILÓSFERA Y EFECTO PROMOTOR DEL  
CRECIMIENTO DE *Gluconacetobacter* sp. Y *Azospirillum* sp. EN RYE GRASS ANUAL  
(*Lolium multiflorum* Lam.) EN EL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

Trabajo Final de Grado

del alumno

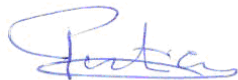
**SANTIAGO TAGLIAFERRO**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**



(Alejandro, Peticari)  
**Co-Director**



(Ricardo José, García)  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 16 de marzo de 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres por la posibilidad de estudiar y por su apoyo incondicional.

A Franco y José Luis de ARBO S.R.L por permitirme realizar parte de mi experiencia en sus instalaciones, además de proveer las cepas en estudio.

A Micaela, mi compañera, por ser incondicional y darme todo su apoyo

Al Lic. García Ricardo. Director de la tesis, por transmitir y darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos.

Y a todos aquellos que no menciono, pero que estuvieron presentes mostrando su apoyo durante toda mi carrera.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. MARCO TEÓRICO .....	9
2.1. POBLACIONES EPÍFITAS .....	9
2.1.1. Generalidades sobre la filósfera .....	9
2.1.2. Relación entre las características Topográficas de las Hojas y presencia de Microorganismos. ....	11
2.2. POBLACIONES ENDÓFITAS .....	12
2.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	13
2.3.1 Taxonomía y características culturales .....	13
2.3.2. Hospedero, Colonización y Dispersión .....	13
2.3.3. Condiciones que afectan la fijación de nitrógeno.....	15
2.3.4. Factores que afectan la asociación planta hospedero .....	16
2.3.5. Biopreparados .....	16
2.4. <i>Azospirillum brasilense</i> .....	17
2.4.1 Datos Taxonómicos y características culturales .....	17
2.4.2 Efecto promotor del crecimiento en plantas.....	18
2.5. <i>Lolium multiflorum</i> Lam. - Rye Grass .....	22
2.5.1. Importancia del cultivo .....	22
2.5.2. Ciclo vegetativo .....	23
2.5.3. Fertilización.....	24
2.6 Método de inoculación.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo general .....	26
4.2. Objetivos específicos .....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1. Materiales.....	26
5.2. Condiciones de cámara.....	27
5.3. Diseño del ensayo.....	28
5.4. Procedimiento .....	28
5.4.1. Siembra .....	28
5.4.2. Aplicación.....	29
5.5. Evaluación de los cultivos .....	29
5.5.1. Evaluación de la persistencia foliar de microorganismos. ....	29
5.5.2. Microorganismos Epífitos.....	29
5.5.3. Microorganismos Endófitos.....	30
5.5.4. Recuento de <i>Azospirillum</i> sp. ....	30
5.5.5. Recuento de <i>Gluconacetobacter</i> sp.....	31
5.5.6 Reconocimiento de Colonias .....	32
5.6.1. Evaluación del efecto promotor del crecimiento .....	33
5.6.2 Análisis estadístico de los resultados.....	34
6. RESULTADOS .....	34
6.1. Recuento de bacterias epífitas y endófitas.....	34
6.2. Evaluación Efecto Promotor.....	37
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIONES .....	43
9. BIBLIOGRAFIA.....	44
10. ANEXOS .....	53
10.1. Tratamiento Estadístico- Salida Infostat .....	53

10.1.1. Medidas de Resumen.....	53
10.1.2. Análisis de la Varianza.....	53
9.2. Prueba de Normalidad y Homogeneidad de la Varianza.....	54
10.1 Datos ufc/g de epífitas y endófitas en cada tratamiento.....	55
10.1.2. Recuento ufc/g de Epífitas en liquido de lavado sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 4 días de producida la inoculación ( $t_4$ ).....	55
10.1.4. Recuento ufc/ g de Epífitas en liquido de lavado sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 11 días de producida la inoculación ( $t_{11}$ ).....	55
10.1.5. Recuento ufc/g de Endofitas en la suspensión del homogenado, sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 11 días de producida la inoculación ( $t_{11}$ ).....	56
10.2 Datos agronómicos de las repeticiones de cada tratamiento.....	56
10.2.1. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T1.....	56
10.2.2. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T2.....	56
10.2.3. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T3.....	56
10.2.4. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T4.....	57
10.2.5. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T5.....	57
10.2.6. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T6.....	57
10.2.7. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T7.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comportamiento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> en plantas controles (sin inocular) y plantas de especies cultivables inoculadas en La Habana, Cuba. (Dibut, B. et al., 2005).....	15
<b>Tabla 2.</b> Rendimiento de tratamientos de inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> en trigo. Media de 32 experimentos en el Centro-Norte de Buenos Ares y Sur de Santa Fe. Cada sitio integra el promedio de diferentes genotipos, dosis de fósforo-nitrógeno y niveles tecnológicos. Letras distintas en el extremo de las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). .....	19
<b>Tabla 3.</b> Recuento (log de ufc/g) de Bacterias Epífitas y Endófitas en hoja a los 4 días de la inoculación foliar ( $t_4$ ) y a los 11 días de la inoculación ( $t_{11}$ ). .....	35
<b>Tabla 4.</b> Datos agronómicos. Promedio de las repeticiones de cada tratamiento. Letras distintas indican resultados significativos con ( $p < 0,05$ ). En el anexo se muestran las tablas con los datos agronómicos de las repeticiones de cada tratamiento y el análisis estadístico de los resultados.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Topografía de la Hoja (Curtis, 2001) .....	11
<b>Figura 2.</b> Colonias de <i>Azospirillum</i> en Agar RC y metodología de recuento Fuente: Mariana Puente, Luciana Di Salvo y Lina Lett (Red CAI) .....	30
<b>Figura 3.</b> Colonias de <i>Azospirillum</i> en Agar RC Fuente: Propia.....	31
<b>Figura 4.</b> Fórmula para el cálculo de ufc/ml Fuente: Red CAI.....	31
<b>Figura 5.</b> Colonias de <i>Gluconacetobacter</i> en medio LGI Fuente: Propia .....	32
<b>Figura 6.</b> Colonias de <i>Gluconacetobacter</i> en medio LGI Fuente: Propia .....	32
<b>Figura 7.</b> Bacterias de <i>Azospirillum</i> al microscopio óptico x100. Fuente: Propia .....	33
<b>Figura 8.</b> <i>Gluconacetobacter</i> al microscopio óptico x100 Fuente: Propia .....	33
<b>Figura 9.</b> Recuento de Bacterias Epífitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar ( $t_4$ ) y a los 11 post inoculación ( $t_{11}$ ) para los tratamientos: T1(testigo), T2 ( <i>Azospirillum</i> 2l/ha), T3 ( <i>Azospirillum</i> 4l/ha), T4 ( <i>Gluconacetobacter</i> 2l/ha), T5 ( <i>Gluconacetobacter</i> 4l/ha).....	35

<b>Figura 10.</b> Recuento de Bacterias Epífitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días post inoculación (t11) para los tratamientos T6 (Azospirillum + Gluconacetobacter 2l/ha), T7 (Azospirillum + Gluconacetobacter 4l/ha)...	36
<b>Figura 11.</b> Recuento de Bacterias Endófitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días de la inoculación (t11) para los tratamientos: T1(testigo), T2 (Azospirillum 2l/ha), T3 (Azospirillum 4l/ha), T4 (Gluconacetobacter 2l/ha), T5 (Gluconacetobacter 4l/ha). .....	36
<b>Figura 12.</b> Recuento de bacterias Endófitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días de la inoculación (t11) para los tratamientos T6 (Azospirillum + Gluconacetobacter 2l/ha), T7 (Azospirillum + Gluconacetobacter 4l/ha)...	37
<b>Figura 13.</b> Gráfico de media y desvío estándar de Materia Seca de cada tratamiento, expresado en Toneladas Hectáreas <sup>-1</sup> .....	38
<b>Figura 14.</b> Gráfico de media y desvío estándar de Altura de las plantas de cada tratamiento, expresado en centímetros.....	38
<b>Figura 15.</b> Gráfico de media y desvío estándar de N° de Macollos de las plantas de cada tratamiento.....	39
<b>Figura 16.T1</b> - Testigo sin aplicación foliar – Todas las macetas corresponden al mismo tratamiento.....	39
<b>Figura 17.T4</b> - Gluconacetobacter diazotrophicus 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. <b>T6</b> - Gluconacetobacter diazotrophicus + Azospirillum brasilense 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. <b>T5</b> - Gluconacetobacter diazotrophicus 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. ....	39
<b>Figura 18.T2</b> - Azospirillum brasilense 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. <b>T7</b> - Gluconacetobacter diazotrophicus + Azospirillum brasilense 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. <b>T3</b> - Azospirillum brasilense 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja. ....	40

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la persistencia en hoja, la capacidad endofítica y el efecto promotor del crecimiento de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* al ser aplicadas al follaje de una gramínea forrajera anual, Rye Grass anual (*Lolium multiflorum* Lam.). El ensayo se realizó en la cámara de crecimiento del laboratorio de Microbiología Agrícola de la UNNOBA sede de Junín y consistió de 7 Tratamientos: T1-Testigo sin aplicación, T2- *Azospirillum* sp. Dosis 2l/ha., T3- *Azospirillum* sp. Dosis 4l/ha., T4- *Gluconacetobacter* sp. Dosis 2l/ha., T5- *Gluconacetobacter* sp. Dosis 4l/ha., T6- *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. Dosis 2l/ha. c/u., T7- *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. Dosis 4l/ha. c/u. La forrajera se cultivó en macetas con un Kg de sustrato, ubicadas en un sistema de bloques al azar. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento. Se determinó el número de UFC.g<sup>-1</sup> de endófitas y epífitas en hoja para ambos géneros bacterianos mediante un recuento de viables en placa, a los cuatro y once días de la aplicación foliar. Se estudió el efecto promotor del crecimiento, midiendo caracteres agronómicos de interés tales como materia seca, altura de plantas y número de macollos. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el software Infostat y la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). A los 11 días de realizada la aplicación, ambos géneros bacterianos demostraron actividad endófitas, con recuentos comprendidos en el rango de 3,1 y 4,9 log UFC.g<sup>-1</sup>. Asimismo, se demostró la presencia en la superficie de las hojas en recuentos en el rango de 2,4 y 6,3 log UFC.g<sup>-1</sup>. La aplicación foliar de ambos géneros bacterianos en Rye Grass generó aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) en materia seca y altura de las plantas frente al testigo sin aplicación. El número de macollos fue significativamente superior ( $p < 0.05$ ) respecto al control sin tratar en los tratamientos con doble dosis de *Gluconacetobacter* y/o con la aplicación combinada de ambos géneros.

## 1. INTRODUCCIÓN

El aumento en la extensión de los límites del área sembrada en Argentina desplazó a la ganadería hacia áreas con menor capacidad productiva respecto de las zonas núcleo (Satorre, 2005), escenario que, en complemento con el bache estacional de producción invernal de pasturas perennes, dio origen a que los cultivos anuales de invierno surjan como una de las fuentes de forraje alternativas más utilizadas, ya que aportan entre mayo y septiembre, entre 4 y 9 tn ms.ha<sup>-1</sup> un forraje de alta calidad. (Scheneiter & Bertin, 2015).

La necesidad de aumentar la productividad de las pasturas invernales, principalmente en rodeos de cría y recria, promueve la revisión de las estrategias de manejo y fertilización de éstos cultivos.

La actividad agrícola-ganadera, en los últimos años, muestra una tendencia en la adopción de nuevas tecnologías de producción en busca de reducir el impacto ambiental, disminuir los costos de producción y aumentar los rendimientos en sistemas agropecuarios sustentables. Dentro de esta tendencia, los inoculantes o biofertilizantes surgen como herramientas alternativas para complementar a la fertilización convencional, apuntando a la reducción de fertilizantes químicos.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. POBLACIONES EPÍFITAS

#### 2.1.1. Generalidades sobre la filósfera

El tallo, las hojas, las flores y los frutos de las plantas son el hábitat de poblaciones microbianas epífitas. Bacterias heterótrofas y fotosintéticas, hongos (particularmente levaduras), líquenes y algunas algas se desarrollan regularmente en estas superficies aéreas de las plantas (Atlas & Corzo, 2002).

El area adyacente a la superficie de las hojas de las plantas se conoce como filósfera, y el hábitat que se encuentra directamente sobre la superficie de la hoja es el filoplano (Atlas & Corzo, 2002). La filósfera es considerada como un ambiente hostil para la colonización microbiana, debido a las rápidas fluctuaciones en las condiciones físicas y nutricionales, configurando un hábitat dinámico con variables ambientales como la temperatura, humedad relativa, lluvia, vientos y radiación solar, que pueden diferir a lo largo de la superficie foliar por diferentes causas como posición de la hoja y facilidad de difusión, etc. (Andrews, 1992; Lindow & Brandl, 2003).

Los nutrientes del filoplano que son utilizados por los microorganismos para su desarrollo, pueden originarse por aporte endógeno de la planta, como es el caso de los exudados de las hojas que se estiman en un rango menor a los 100 µg/ml, o exógenamente, a partir de partículas de suelo, polvo, iones, solutos aportados por la lluvia, muerte de microorganismos y excremento de insectos (Andrews, 1992).

La composición, cantidad y calidad de los nutrientes, entre los que se incluyen diversos carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes, elementos minerales traza, vitaminas y hormonas, al igual que compuestos antimicrobianos tales como fenoles y terpenoides, varían según la especie de la planta hospedera, la edad de la hoja, su estado fisiológico y nutricional, al igual que la presencia de tejido dañado, modificando el crecimiento de una determinada población de microorganismos (Andrews, 1992; Jacques, Kinkel & Morris, 1994; Yang, Crowley, Boneman & Keen, 2000).

Los nutrientes, no sólo son importantes por ser sustrato para la población microbiana sino también por sus efectos sobre la síntesis de antibióticos y sideróforos sobre el filoplano generados por la Microbiota colonizante. El desarrollo de la población depende de factores como régimen de humedad y época del año, y se considera que la mayor concentración de nutrientes se encuentra en la zona abaxial de las hojas y frecuentemente sobre venas y paredes de las células epidérmicas (Andrews, 1992; Lindow & Andersen, 1996).

La colonización de la filósfera, se realiza en función del inóculo disponible en el ambiente y el hospedero. Parece haber una temprana preponderancia de bacterias, seguida por un agudo incremento en el número de levaduras y eventualmente un incremento en hongos filamentosos. Este patrón es afectado por efectos locales tales como el grado de infestación de insectos, prácticas de cultivo y eventos climáticos (Andrews, 1992; Yang, Crowley, Boneman & Keen, 2000).

En términos generales, el patrón de colonización sobre las hojas es localizado y heterogéneo, los sitios preferidos son a lo largo de las venas y en las ranuras de las paredes de las células epidérmicas, posiblemente por la concentración de nutrientes, protección a la erosión y la retención de agua. Cuando bacterias y levaduras crecen en hojas en cultivo, después de 30 horas se presenta una diferenciación en la cual las levaduras colonizan las paredes anticlinales principalmente sobre la lámina, mientras que las bacterias se concentran sobre las paredes anticlinales a lo largo de las venas, estomas y cerca de las glándulas (Andrews, 1992).

En términos de biodiversidad, los ecologistas microbianos han dedicado mucho esfuerzo en investigar la diversidad de microorganismos presentes en la superficie de las hojas y al estudio de las interacciones entre las especies. En diversos trabajos de investigación se han reportado más de 85 especies diferentes de microorganismos en 37 géneros de plantas, entre los que se encuentran: centeno, aceituna, remolacha y trigo (Yang, Crowley, Boneman & Keen, 2000).

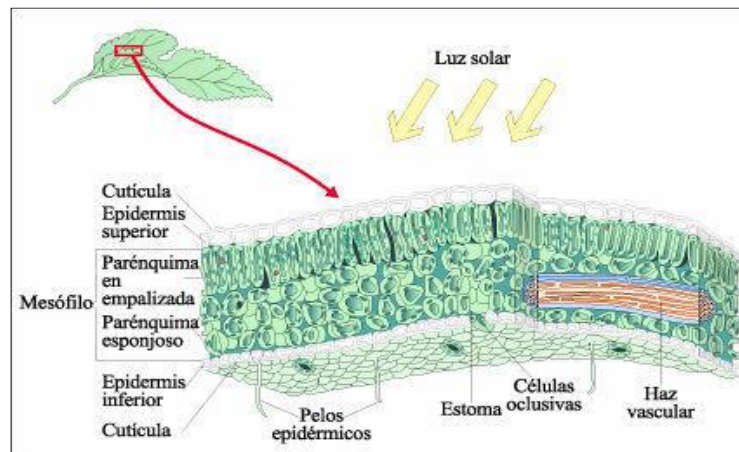
Además de los factores ya mencionados, que intervienen en la colonización de la superficie foliar y por ende en la biodiversidad, se debe tener en cuenta que este proceso implica una dinámica de inmigración, emigración, crecimiento y muerte de los microorganismos, en la que se incluye la velocidad de multiplicación, para mantener la población (Jacques, Kinkel & Morris, 1994).

Por otra parte, la influencia del inóculo disponible presente en el aire, juega un papel muy importante como fuente de inmigración hacia nuevas hojas. En un estudio realizado por Jacques y colaboradores (1994), en el que se evaluaron las diferentes edades y posiciones de las hojas, respecto a los microorganismos presentes, se encontró que estos dos factores influyen tanto en la densidad de población como en la diversidad, ya que las hojas viejas soportan una cantidad mayor de microorganismos que las hojas nuevas, y el número de estos va aumentando con la edad de la planta. Por otro lado, en las hojas internas se ha reportado una menor densidad de microorganismos que la que se encuentra en la parte externa.

## 2.1.2. Relación entre las características Topográficas de las Hojas y presencia de Microorganismos.

Cada hoja es un órgano de nutrición especializado, cuya función es la fotosíntesis, proceso que requiere un suministro continuo de agua, energía radiante y dióxido de carbono (Villé, Martín, Berg & Solomon, 1998).

En la hoja pueden distinguirse de 3 componentes topográficos: Epidermis, Mesófilo, Vasos vasculares (**Figura 1.**)



**Figura 1.** Topografía de la Hoja (Curtis, 2001)

Los microorganismos colonizadores de la filósfera, se ubican sobre la superficie de la epidermis y en los espacios intercelulares (apoplastos) del mesófilo, sin penetrar las células de la planta. Generalmente los apoplastos son colonizados por microorganismos patógenos, más que por los saprofitos, mientras que ambos, tanto patógenos como saprofitos, pueden ocupar la superficie de la epidermis (Hiriano & Upper, 2000).

La cutícula es el primer punto de contacto entre los microorganismos inmigrantes y las hojas. Es el mayor componente estructural de la hoja y está formada por una capa cerosa que tiene diferentes estructuras cristalinas tridimensionales, la cual cambia con la edad de la hoja. (Andrews, 1992; Lindow & Brandl, 2003).

La cutícula es considerada una barrera para impedir la penetración al interior de las hojas por parte de los microorganismos. Sin embargo, la penetración microbiana no sólo ocurre por aberturas naturales como los estomas, sino también por fuerzas físicas o por la degradación de los componentes mediante la excreción de enzimas, como pectinasas (degradan la pectina: ácido poligalacturónico), celulasas (B 1-4 glucano), cutinasas, entre otras. (Lindow & Brandl, 2003; Lindow, Hecht-Poinar & Elliott, 2004).

Además de la cutícula, la hoja está rodeada por una pequeña capa de células, en la cual, la humedad emitida por los estomas puede ser secuestrada, de tal modo que

alivia un poco el estrés de agua al que están sujetos los microorganismos (Andrews, 1992).

Los habitantes del filoplano, tienen la capacidad de colonizar sitios donde puedan evadir la radiación solar como los estomas o apoplastos, y colonizar los tricomas glandulares, que les proporcionan los nutrientes necesarios para su desarrollo tales como azúcares, aceites, resinas, sales, terpenos o pigmentos (Andrews, 1992) y pueden alterar la superficie en la que se encuentran, mediante la producción de compuestos con propiedades surfactantes (Lindow & Brandl, 2003).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cutícula, es probable que ésta incremente la humedad permitiendo la solubilización y difusión de sustratos, haciendolos más fácilmente disponibles para los microorganismos. Sin embargo, los biosurfactantes pueden facilitar el movimiento de los microorganismos permitiendo su desplazamiento a lo largo de la superficie a áreas donde los nutrientes son más abundantes (Lindow & Brandl, 2003).

## **2.2. POBLACIONES ENDÓFITAS**

Los microorganismos endófitos viven en el interior de las plantas superiores, durante una parte considerable de su ciclo de vida (Reinhold-Hunrek & Hurek, 1998). La diversidad y el número de bacterias rizosféricas es muy grande y, por tanto, la competencia por los nutrientes también. Sobre esta base las bacterias endófitas tendrían ciertas ventajas (James, 2000), además de alguna protección ante condiciones adversas (Bueno dos Reis, Urquiaga, & Döbereiner, 2000).

Las bacterias endófitas residen en el interior de las plantas, principalmente en espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta. Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis que ingresaron desde semillas, desde la rizósfera, de la microbiota propia del filoplano o de material utilizado para la propagación vegetativa. Sin embargo, la penetración en la planta puede ocurrir por otros sitios, como estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, o inclusive a través de la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales.

Estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de las plantas, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno.

El potencial de este grupo se amplió al comprobarse que, por sus efectos beneficiosos, pueden utilizarse en el control de hongos fitopatógenos. Igualmente, se ha demostrado que el interior de las plantas es un ambiente propicio para la fijación biológica de nitrógeno (James & Olivares, 1998). También se plantea que promueven el crecimiento vegetal por la producción de sustancias reguladoras (Bashan & Holguin, 1993).

### **2.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus***

#### **2.3.1 Taxonomía y características culturales**

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, fue aislado por primera vez por Cavalcante y Döbereiner (1998) a partir de raíces y tallos de caña de azúcar, donde recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans*, el cual se modificó por *Acetobacter nitrocaptans* sobre la base de experimentos de hibridación ARN/ADN y ADN/ADN, nomenclatura que fue corregida por *Acetobacter diazotrophicus* (Gills, et al., 1989) y en 1998 por su nombre actual (Yamada, Hocino & Ishhikawa, 1998). Su descubrimiento abrió un nuevo capítulo en la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas, potencial que se amplió cuando se demostró que libera hasta el 50 % del nitrógeno fijado (Cojho, Reis, Schenberg & Döbereiner, 1993) y produce diversas auxinas, principalmente ácido indol acético (Fuentes-Ramírez, Caballero-Mellado, Sepúlveda & Martínez-Romero, 1999) y citocinas (Jiménez-Salgado, Aparicio & Caballero-Mellado, 1994).

El crecimiento óptimo de la bacteria se presenta a 30°C de temperatura y resulta más abundante en medios de cultivo que contienen 10 % de sacarosa y pH de 5.5. Sin embargo, puede crecer en concentraciones de sacarosa hasta del 30 % (Cavalcante & Döbereiner, 1998) y fijar nitrógeno en concentraciones de oxígeno del 4 %. Puede utilizar glucosa, fructosa o sacarosa, produciendo ácido a partir de estos sustratos (Fuentes-Ramírez, et al., 2001). Con excepción de la sacarosa no usa otros disacáridos y no crece con ácidos dicarboxílicos como única fuente de carbono (Ureta, Álvarez, Ramón, Vera & Martínez-Drets, 1995).

#### **2.3.2. Hospedero, Colonización y Dispersión**

*Gluconacetobacter diazotrophicus* se ha aislado de raíces lavadas y del interior del tallo de caña de azúcar cultivadas en Brasil, Australia, México, India, Canadá y Cuba (Cavalcante & Döbereiner, 1998; Fuentes-Ramírez, et al., 1993; Shankaraiah, Gururaj-Hunsigi & Hunsigi, 2001), en los tejidos internos de plantas adultas e hijuelos de piña (Tapia-Hernández, et al., 2000) y de la rizósfera del cafeto (Jiménez-Salgado, et al., 1997). Se encuentra presente en vasos de xilema de raíces de maíz inoculadas artificialmente

(Caballero-Mellado, et al., 1998) y también se ha detectado ocasionalmente en la rizósfera de la caña de azúcar (Li & MacRae, 1991) y cereales (Loganathan, Suelta, Parlda & Nair, 1999).

Su rango de hospederos se amplió recientemente tras su aislamiento en los cultivos de zanahoria, rábano, remolacha (Madhaiyan, et al., 2004), melón, papaya, flores (Dibut, Martínez-Viera, Ríos, Ortega & Fey, 2005), calabaza, yuca y malanga (Ríos, 2007). Los estudios de colonización de la bacteria, realizados mayoritariamente en caña de azúcar, demuestran que coloniza la superficie de las raíces y penetra a través de los sitios de emergencia de las raíces laterales y de la zona meristemática (James, Reis, Olivares, Baldani & Döbereiner, 1994), para lo cual podría involucrar estructuras similares a los hilos de infección formados por *Rhizobium* (Bellone, Bellone, Pedraza & Monzón, 1997).

Los sitios que coloniza el microorganismo y su distribución en el interior de la planta de caña de azúcar aún no se han esclarecido. Se ha demostrado que coloniza los espacios intercelulares de la raíz y los vasos del xilema (Fuentes-Ramírez, Caballero-Mellado, Sepúlveda & Martínez-Romero, 1999). Otros estudios señalan que se localiza en espacios intercelulares del tallo correspondientes al apoplasto de plantas adultas (Dong, et al., 1994). Las mayores poblaciones microbianas en la zona apical de los tallos de caña de azúcar, donde existe mayor concentración de glucosa en la planta.

La dispersión en el interior del cultivo también es motivo de discrepancia. Algunos trabajos sugieren que *Gluconacetobacter diazotrophicus* se dispersa en los tejidos internos a través de los vasos del xilema (Hernández, et al., 2000), y en otros se objeta que esta sea la vía de dispersión, argumentando que existen barreras morfológicas que impiden la comunicación del xilema de un internodo a otro (Dong, et al., 1994). Al respecto, (Dong, Mc Cully & Canny, 1997) observaron que, en condiciones de transporte activo, las bacterias penetran al xilema y son transportadas a través de éste; sin embargo, se determinó que la acumulación de ellas en los nudos provoca la no funcionalidad de la estructura. No obstante, se plantea que prefiere los espacios intercelulares y tejidos vasculares como el xilema (Loiret, Ortega, Ortega- Rodés, Rodés & Fuente, 2004).

Experimentos de dinámica poblacional desarrollados en condiciones de invernadero mediante diseño completamente aleatorizado (**Tabla 1.**) permitieron cuantificar el microorganismo en hojas, tallos y raíces de maíz y caña de azúcar, con poblaciones que oscilan entre  $1.8 \times 10^2$  y  $2.3 \times 10^7$  células por gramo de tejido fresco. Las poblaciones celulares más altas se detectaron en las hojas, seguido de los tallos y por último las raíces o tubérculos. La respuesta favorable de ocho cultivos a la inoculación de la bacteria, crecida en medio de cultivo SG e incubada a 32°C durante 72 horas, permite

plantear la potencialidad que este microorganismo presenta como biofertilizante. (Dibut, Martínez-Viera, Ríos, Ortega & Fey, 2005)

En Brasil, estudios similares realizados en caña de azúcar han arrojado un título entre  $10^3$  y  $10^7$  UFC por gramo de tejido fresco y en Estados Unidos, en el cultivo del maíz, se han logrado detectar poblaciones de la bacteria en hojas jóvenes de hasta  $10^5$  UFC por gramo de tejido (James, 2000; Döbereiner, Reis, Paula & Olivares, 1993).

**Tabla 1.** Comportamiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en plantas controles (sin inocular) y plantas de especies cultivables inoculadas en La Habana, Cuba. (Dibut, Martínez-Viera, Ríos, Ortega & Fey, 2005)

Cultivo	Población (lnx)	
	Control	Inoculado
Papa	-	6.19
Maíz	5.06 b	7.41 a
Melón	3.16 b	5.27 a
Calabaza	3.25 b	5.41 a
Yuca	4.22 b	6.07 a
Boniato	5.47	6.06 NS
Malanga	3.69 b	6.25 a
Caña de azúcar	7.53	8.01 NS

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí para  $p < 5\%$   
 X-UFC.g<sup>-1</sup> tejido fresco, la cuantificación en cada cultivo se realizó a partir de hojas jóvenes

### 2.3.3. Condiciones que afectan la fijación de nitrógeno

Algunas condiciones del entorno pueden afectar la capacidad de fijar nitrógeno de los organismos diazotrofos, por ejemplo, la presencia de oxígeno y amonio (Pan & Vessey, 2001). El efecto del oxígeno sobre la actividad de la nitrogenasa depende del suplemento de carbono y de la tasa de respiración de las células (Kuhla & Oesle, 1988). Se ha observado que al aumentar la aireación se provoca un efecto positivo sobre el crecimiento (Galar & Boiardi, 1995).

En el caso del nitrógeno, la protección podría ser explicada por la baja asimilación de amonio que manifiestan las células del microorganismo cuando crecen al 10 % de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés, considerando que el hábitat de la bacteria generalmente es rico en sacarosa, por lo que su nitrogenasa está activa aun cuando el microorganismo se encuentre rodeado de amonio (Reis & Döbereiner, 1998).

También se ha demostrado que fija nitrógeno en condiciones microaerófilas a pH ácido, incluso por debajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10 mM), y su actividad nitrogenasa se inhibe solo parcialmente aún en concentraciones de 20 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o por la presencia de aminoácidos (Stephan, Oliveira, Teixeira, Martínez-Drets & Döbereiner, 1991).

#### **2.3.4. Factores que afectan la asociación planta hospedero**

Se ha encontrado que la frecuencia de aislamiento en caña de azúcar es inversa a los niveles de fertilización nitrogenada. Con dosis de fertilización de 275-300 kg.ha<sup>-1</sup> la frecuencia máxima de aislamiento es de 2 %; sin embargo, con un nivel de fertilizante de 125 kg.ha<sup>-1</sup> este se incrementa hasta un 65% (Bueno dos Reis, Urquiaga & Döbereiner, 2000 ; Fuentes-Ramírez, et al.,1993). El nitrógeno aplicado en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  afecta la capacidad de colonizar la planta. Aparentemente no ejerce un efecto directo sobre la bacteria, sino que ocasiona cambios drásticos sobre la fisiología del cultivo (Fernández & Rosiello, 1995), como, por ejemplo, variaciones en la concentración de sacarosa (Peláez, Armas, Valadier & Champingny, 1994).

Se ha demostrado además que la edad de la planta y variedad de la caña de azúcar influyen en el establecimiento del microorganismo. Igualmente, períodos del año de poca lluvia o sequía disminuyen la población microbiana de forma drástica.

#### **2.3.5. Biopreparados**

Teniendo en cuenta la potencialidad metabólica de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, resulta sumamente interesante estudiar la posibilidad de elaborar biopreparados a base de la bacteria, que estimulen el crecimiento, desarrollo y rendimiento de diferentes cultivos. Aunque la comunidad científica ha aumentado su interés por este microorganismo, el efecto de su inoculación todavía se encuentra poco estudiado. En el cultivo en que más se ha abordado el tema es el de la caña de azúcar, donde se demostró, en condiciones de laboratorio, que las plantas inoculadas tenían una mayor altura, peso seco y contenido total de nitrógeno que aquellas inoculadas con un mutante no fijador de nitrógeno y que el testigo sin inocular. Es por ello que se sugiere que el microorganismo promueva el crecimiento, no solo por la fijación de nitrógeno sino también por la producción de ácido indol acético (Sevilla, Oliveira, Baldani & Kennedy, 1998).

Sevilla y colaboradores (2001), trabajando con plántulas de caña de azúcar micropropagadas, inoculadas con la cepa tipo PAL-5, confirmaron la ocurrencia del



proceso de fijación biológica de nitrógeno en el cultivo inoculado, mientras que Oliveira Urquiaga & Dobereiner (2002) demostraron que el 29 % del nitrógeno, incorporado a la planta procedía de este proceso. Se conoce, además, la inoculación artificial del microorganismo sobre cultivos que no son hospederos naturales de la bacteria como el maíz, en el que los resultados son controversiales (Dibut, 2005).

No obstante, es evidente que aún queda mucho por investigar en el campo de la biofertilización, con respecto al efecto que puede producir la adecuada incorporación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* al sistema planta, dadas las bondades y potencialidades de este microorganismo.

## **2.4. *Azospirillum brasilense***

### **2.4.1 Datos Taxonómicos y características culturales**

Este género de bacterias fue descubierto por la Dra. Johana Dobereiner y ganó importancia en la década de los 70 por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. En razón de la aptitud de fijar nitrógeno en vida libre, esa bacteria fue denominada *Azospirillum*. Este género presenta gran distribución geográfica, siendo encontrada en regiones de clima templado y tropical (Hungria, Nogueira & Araujo, 2016).

Las bacterias del género *Azospirillum* se clasifican como bacilos Gram negativas, móviles y de vida libre. Su tamaño es de 0.8 a 2 µm de diámetro entre y de 2 a 4 µm de longitud y poseen gránulos intracelulares de poli-hidroxiburitrato (Trentini, 2010). Según algunos autores (Dobbelaere, et al., 2002), estas bacterias son estrictamente aerobias, cuando se les suministran fuentes nitrogenadas o microaerófilas cuando están en un ambiente libre de N<sub>2</sub>, es decir, cuando necesitan realizar FBN. Sin embargo, estos autores observaron que para promover un ambiente microaerófilico las bacterias en medio semisólido producen una película delgada en forma de velo, con concentración de oxígeno esencial para la fijación del nitrógeno y para iniciar su crecimiento.

El *Azospirillum* posee un metabolismo de carbono y nitrógeno flexible que aumenta su capacidad de competir por la colonización de la rizósfera (Trentini, 2010), además de que se los denominan diazótrofos endófitos facultativos por colonizar tanto el interior como la superficie de las raíces. La colonización ocurre principalmente en la zona de elongación y la zona de los pelos radicales (Dobbelaere, et al., 2002). Cuando están presentes en la rizósfera, estas colonizan tanto la capa de mucigel alrededor de las raíces (colonización externa) como los espacios intercelulares de las raíces (colonización interna).

Esa bacteria se desarrolla bien en temperatura óptima entre 28 y 41°C y es

altamente competitiva mientras que coloniza la rizósfera, haciendo el uso de diferentes fuentes de nitrógeno como amoníaco, nitrito, nitrato, nitrógeno molecular y aminoácidos, y fuentes de carbono como ácidos orgánicos (malato, piruvato, succinato y fructosa), para el mantenimiento de su metabolismo (Schultz, Morais & Silva, 2012).

El *A. brasilense* se distribuye ampliamente en los suelos tropicales y subtropicales lo que contribuyó para la su difusión y utilización en diversos estudios (Zambrano, Jiménez-Salgado & Tapia Hernández, 2007). Los ensayos comprobaron el uso de esta bacteria promueve el crecimiento vegetal y, en consecuencia, el aumento de la productividad (Reis, Baldini, Baldini & Dobereiner, 2000). *A. brasilense* exhibe resultados satisfactorios cuando asociado a las plantas de la familia *Poaceae* como maíz, avena, trigo y arroz (Hartmann & Baldani, 2006).

Este género, es por lejos el PGPM más estudiado en gramíneas, reportándose las primeras experiencias hace más de treinta años. En la actualidad, se han identificado 12 especies de *Azospirillum* spp, aunque en la producción de inoculantes comerciales se han utilizado *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, siendo la primera la más común a nivel mundial, y la preferida en Argentina (Puente & Peticari, 2006).

#### **2.4.2 Efecto promotor del crecimiento en plantas**

Algunos años atrás, se valoró la importancia del género *Azospirillum* como fijador libre de nitrógeno (N) atmosférico, al punto de considerarse como el principal aspecto de interés agronómico de este microorganismo. Esto se explica por la producción de cereales con escaso o nulo empleo de fertilizantes nitrogenados, o deficiencias moderadas a severas del nutriente. En la actualidad, con mayores niveles de fertilización y cultivos cercanos a la suficiencia nutricional, se considera a la capacidad de promover el crecimiento vegetal en los primeros estadios del ciclo del cultivo, especialmente bajo estrés moderado, como la principal cualidad con valor agronómico de este género. (Ferraris & Faggioli, 2013).

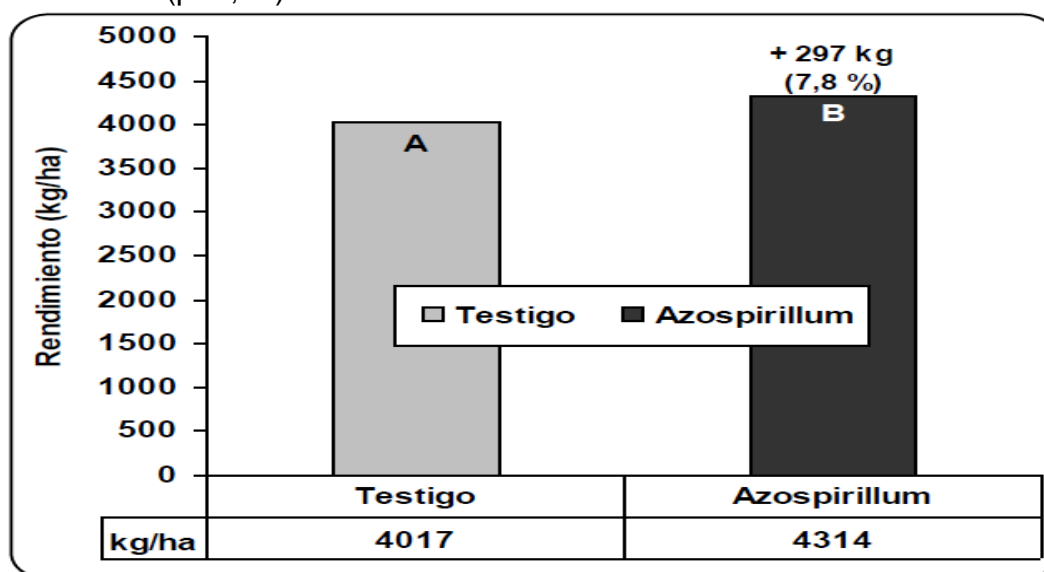
La promoción del crecimiento se origina en la producción y liberación de hormonas que estimulan e incrementan el crecimiento radical (ej. auxinas, giberelinas, citoquininas), y de enzimas tales como las pectinolíticas que distorsionan la funcionalidad de células de las raíces y contribuyen al aumento en la producción de exudados (Okon & Labandera-González, 1994). Asimismo, de manera indirecta, la inoculación con *Azospirillum* sp. podría promover la proliferación y establecimiento en la rizósfera de otros microorganismos favorables para el cultivo (Russo, et al. 2005).

El efecto de *Azospirillum* sp en las plantas, genera mejoras en la emergencia, en el

número de plantas logradas, en el vigor vegetativo, en la biomasa de tallo y raíz y en el contenido de nutrientes de los tejidos que conducen finalmente, a incrementos en el rendimiento final del cultivo.

En una evaluación conjunta de 32 ensayos realizados en la región Pampeana, Ferraris & Faggioli (2013) observaron que el cultivo de trigo inoculado en semilla produjo en promedio 297 kg/ha más que el testigo. (**Tabla 2.**)

**Tabla 2.** Rendimiento de tratamientos de inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo. Media de 32 experimentos en el Centro-Norte de Buenos Aires y Sur de Santa Fe. Cada sitio integra el promedio de diferentes genotipos, dosis de fósforo-nitrógeno y niveles tecnológicos. Letras distintas en el extremo de las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).



Mejoras en el ambiente productivo conlleva a mejores respuestas a la inoculación con *Azospirillum*. Esto se debería a la generación de cultivos con mayor tasa de crecimiento y demanda de agua y nutrientes, y por la creación de un ambiente rizosférico más apropiado para los microorganismos en situaciones de alto rendimiento (mayor liberación de exudados radicales, reciclaje de carbono, cobertura y almacenaje de agua en el suelo). (Ferraris & Faggioli, 2013)

Respecto de la fertilización, en la actualidad se considera que la mayor respuesta a la inoculación se produce bajo dosis medias a elevadas de nutrientes. Cuando la fertilización es ausente o muy reducida, se producen deficiencias severas que reducen el crecimiento, la duración del área foliar, y afectan procesos fisiológicos esenciales que difícilmente puedan ser compensados por un agente biológico.

Por el contrario, una fertilización sin restricciones resta importancia al factor eficiencia, una de las ventajas atribuida a los PGPM en forma reiterada. Por otra parte, se

ha observado que la respuesta permanece estable bajo diferentes situaciones hídricas. Una condición de sequía aún severa no afectaría el nivel de respuesta. (Ferraris & Faggioli, 2013)

Hay suficiente evidencia que indica que la respuesta a *Azospirillum* no está afectada por el ciclo de maduración del genotipo sembrado (Díaz Zorita & Fernández Caniggia, 2008; Ferraris, Couretot & Díaz Zorita, 2008). Sin embargo, es probable que exista variabilidad entre especies, o eventualmente cultivares, que jerarquicen diferentes componentes en la construcción de su rendimiento. En aquellos cultivos donde el rendimiento se define en etapas tempranas del ciclo, debido al número de macollos como el caso de Cebada Scarlett y algunas forrajeras, podrían ser los más beneficiados por la promoción de crecimiento lograda en tratamientos inoculados con *Azospirillum*.

Según un estudio llevado a cabo por Mendoza et al. en el 2004 en México, sobre especies gramíneas anuales, el número de bacterias nativas, capaces de invadir el tejido interno de las plantas, fue de  $1 \times 10^3$  UFC (3 log UFC/g) por gramo de tejido analizado. Esta concentración fue decayendo mientras que las plantas llegaban a la madurez.

Okon & Vanderleyden (1997) compilaron datos de 22 años de experimentos con inoculación a campo y concluyeron que el *Azospirillum* spp., promovió ganancias en varias especies de gramíneas en diferentes condiciones ambientales. Los autores también señalaron que las ganancias están más allá de la FBN, también modificando la producción de raíces y, en consecuencia, la superficie de absorción y volumen de suelo explotado. A su vez, observaron un aumento en la materia seca y un mayor crecimiento foliar en las plantas *Setaria italica* cultivadas en vasos e inoculadas con *A. brasilense*.

Al estudiar los efectos de la inoculación de bacterias diazotróficas en gramíneas forrajeras nativas del Pantanal, investigadores constataron que los efectos de la inoculación se volvieron notables a los 60 y 90 días de cultivo (Brasil, Baldani & Baldani, 2005). Los autores también verificaron que la asociación de *A. brasilense* y *A. lipoferum* proporcionó una mayor producción de materia seca de la parte aérea, raíces y acumulación de N. La inoculación de *A. brasilense* en pasto natural también verificó una mayor producción de materia seca del pasto en relación al control.

El uso de *Azospirillum* asociado la producción de forraje tiene resultados favorables, contribuyendo positivamente sobre la masa seca, el contenido de N y la altura de la planta, convirtiendo la inoculación en una alternativa viable en sustitución parcial del N-fertilizante. Por eso, el uso de bacterias promotoras de crecimiento está en línea con la necesidad de combinar la producción animal con la conservación del medio ambiente. Esto indica que el interés en la biotecnología del suelo tiende a aumentar porque es en

gran parte responsable de la conservación y fertilidad del suelo y nutrición de la planta.

Sin embargo, se necesitan más estudios sobre los mecanismos y efectos de la inoculación sobre la MS, el contenido de N y la altura de la planta, especialmente con respecto al área foliar y proteína cruda, de modo que se puedan hacer recomendaciones con respecto a su uso asociado al N-fertilizante (Hungria, Nogueira & Araujo, 2016).

La adopción de la inoculación de *Azospirillum* sp. puede aumentar la competitividad de los productos agrícolas y ser un diferencial frente a la producción adoptada en la agricultura convencional. En la ganadería la inoculación en pastizales puede aumentar la producción de masa de forraje y mitigar los riesgos de degradación y mejorar los índices productivos de ese sector. (Fernandez Domingues Duarte, et al., 2019)

Desde su redescubrimiento en la década de 1970, *Azospirillum* se ha convertido en una piedra angular en el estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Su potencial como inoculante eficaz para una amplia variedad de cultivos ha sido reconocido. Sin embargo, el modo exacto de acción todavía no se entiende completamente. Los modos de acción de *Azospirillum* se explicaron inicialmente por la hipótesis aditiva; 20 años más tarde, eso fue reemplazado por la hipótesis de múltiples mecanismos. Según Cassán & colaboradores (2020) la promoción del crecimiento de las plantas se produce a través de dos mecanismos principales, la fijación biológica N y la producción de fitohormonas, que son efectivamente inducidas por las bacterias colonizadas.

Por lo tanto, algunas de estas moléculas tienen la capacidad de alterar la morfología de la raíz, mejorando así la absorción de minerales e induciendo mayores rendimientos, incluso si se utilizan dosis más bajas de fertilizantes químicos. La contribución de la fijación N es más controvertida, y su efecto puede ser menos potente de lo que se creía. Aunque se han reportado resultados mixtos para la inoculación, esto no ha impedido que numerosas empresas en todo el mundo ofrezcan inoculantes que contengan *Azospirillum*. Más específicamente, en América del Sur, 10 millones de dosis de inoculantes que contienen *Azospirillum* se utilizaron en 2018. (Cassán, et al., 2020).

El uso de *Azospirillum* en condiciones de campo se ha demostrado ampliamente para mejorar el crecimiento de la planta y la productividad de los cultivos. Por lo tanto, el uso de inoculantes de *Azospirillum* para la producción de cultivos debe entenderse como una práctica consolidada, en términos de producción de granos en cereales de verano e invierno, así como de producción de leguminosas (co-inoculación). (Cassán, et al., 2020).

Como una mejora en el uso de *Azospirillum*, la co-inoculación con *rhizobium* sp. ha demostrado ser una tecnología novedosa para mejorar el rendimiento de las legumbres. Parte de los desafíos actuales de los inoculantes de *Azospirillum* ha sido la necesidad de

empresas inoculantes para desarrollar formulaciones efectivas que se pueden utilizar para diversas aplicaciones y bajo diferentes condiciones ambientales y de manejo de almacenamiento. (Cassán, et al., 2020).

En resumen, el desarrollo de sistemas de aplicación alternativos, como la entrega de *Azospirillum* por inoculación foliar, se considera una solución para superar las limitaciones del tratamiento de las semillas. Es urgente promover un programa regional de comunicación coordinada sobre los beneficios ya medidos de la inoculación con *Azospirillum* como complemento de las prácticas agrícolas intensivas y extensas actuales. Estas redes deben incluir usuarios directos de estos productos, así como otros actores de entornos rurales y urbanos y agencias reguladoras locales. (Cassán, et al., 2020).

## **2.5. *Lolium multiflorum* Lam. - Rye Grass**

### **2.5.1. Importancia del cultivo**

El Rye Grass anual, luego de la avena es el verdeo de invierno más utilizado en todo el país. Si bien es originario del sur de Europa actualmente está naturalizado en la región pampeana húmeda y en las dos últimas décadas se ha convertido en una especie clave para los sistemas ganaderos de producción de leche y carne que requieren contar con una fuente de alimento alternativa en el período de bajas tasas de crecimiento de las pasturas perennes en invierno.

Ese bache estacional de producción invernal se hizo más evidente a partir del incremento del área dedicada a la agricultura, en los sistemas agrícolas-ganaderos, con el consecuente aumento de la carga global en la actividad ganadera. En este contexto es que los cultivos anuales de invierno son una de las fuentes de forraje más utilizadas ya que aportan, entre mayo y septiembre, de 4 y 9 t MS/ha de un forraje de alta calidad.

En los últimos 20 años, el rye grass anual ha sido la especie anual de crecimiento invernal que mayor incremento evidenció, en regiones húmedas y subhúmedas, en cuanto al área sembrada. Esto se debió a su capacidad para producir forraje en pleno invierno, cuando otros cultivos declinan en sus tasas de crecimiento, su tolerancia al pulgón verde y su fácil establecimiento y resiembra, además, la flexibilidad de la especie para liberar el lote temprano en primavera para un cultivo estival, como cultivo con destino a silaje, como doble propósito, o bien para promover su presencia en el campo natural.

La productividad de rye grass anual en nuestro país, como promedio de ensayos multilocacionales, se ubica en el rango de 3,7 y 8,9 t materia seca (MS)/ha/año. Si bien no se han identificado las principales variables ambientales que afectan la productividad en cada uno de los sitios evaluados, el rye grass anual tiene una capacidad mayor de crecer

con menores temperaturas medias invernales, con respecto a otras gramíneas anuales y perennes, y requiere aportes de agua elevados y estables.

### **2.5.2. Ciclo vegetativo**

El rye grass anual, no difiere en producción de forraje frente a otros cultivos anuales de invierno como avena, cebada, trigo y triticale, excepto en localidades y ambientes con alto potencial de producción donde evidencia altas acumulaciones anuales de forraje, incluso en años secos. (Amigone, et al., 2010, Amigone, Kloster, Chiacchiera, Conde & Masiero, 2012).

El rye grass se destaca con respecto a los restantes cultivos por su productividad invernal, incluso en años con precipitaciones por debajo de la media histórica (Méndez, Davies, Zamolinski & Peralta, 2004, Amigone, et al., 2010).

Es de producción otoño - invierno - primaveral aunque concentra su producción principalmente a la salida del invierno y en primavera, en coincidencia con tasas diarias de crecimiento elevadas (De Battista & Ré, 2008). La floración ocurre entre fines de octubre y principios de noviembre. Como verdeo de invierno el objetivo es que produzca forraje de mayo a septiembre.

Típicamente se considera la inclusión de un cultivo invernal para cubrir el bajo crecimiento de las pasturas perennes. Sin embargo, el uso de rye grass anual incrementa la acumulación de forraje, pero no necesariamente estabiliza la distribución estacional de forraje. Esto último depende básicamente del recurso base que se trate de complementar. En el norte de la provincia de Buenos Aires, durante el otoño y principios del invierno, el contenido de agua del rye grass anual es alto, incluso más elevado que el de avena. Desde mediados de invierno, luego de las heladas, el porcentaje de MS se incrementa linealmente. Es preciso aclarar que el porcentaje de materia seca de los verdes de invierno, tiene variaciones diurnas siendo mayor por la tarde, en coincidencia con mayores niveles de carbohidratos no estructurales (Acosta, Acosta & Ayala Torales, 2007).

El valor nutritivo del rye grass anual cambia durante el período de crecimiento. El porcentaje de MS se incrementa al igual que el contenido de fibra detergente ácido (FDA), el porcentaje de proteína bruta (PB) disminuye y el porcentaje de carbohidratos no estructurales (CHS) resulta indiferente a los cambios en la época de crecimiento (Pordomingo, Romero, Pordomingo & Volpi Lagreca, 2004a).

La composición química y el valor nutritivo del rye grass anual cambian según el manejo de la fertilización. La fertilización nitrogenada incrementa el porcentaje de nitrógeno (N) y disminuye el porcentaje de CHS. No obstante, la mayor relación entre N y

CHS que se genera en este caso no llegaría a valores críticos como para afectar la performance animal. La fertilización combinada con fósforo y N permite incrementar la acumulación de forraje sin alterar sustancialmente indicadores del valor nutritivo del forraje (Pordomingo, Romero, Pordomingo & Volpi Lagreca, 2004b).

A nivel de producción secundaria, la fertilización con N en rye grass anual no afecta la ganancia diaria de peso vivo de novillos en el primer pastoreo, ya que esta práctica no altera significativamente la relación entre proteína soluble y carbohidratos solubles (Méndez & Davies, 2003).

### **2.5.3. Fertilización**

Como toda gramínea, el rye grass anual responde a la fertilización con N y en algunos ambientes como el centro - sur de Corrientes, la respuesta a este nutriente ocurre cuando los requerimientos de fósforo fueron cubiertos (Altuve, Bendersky, Ramírez, & Ramírez, 2004). En suelos vertisoles de Entre Ríos, con fertilizaciones de base con fósforo, se han obtenido respuestas a la fertilización nitrogenada del orden de los 21 a 42 kg MS kg N-1, según la dosis de N aplicada (De Battista, Diez, Ré, Iacopini & Costa, 2006)

En ausencia de limitaciones hídricas y de otros nutrientes, la máxima respuesta a la fertilización nitrogenada ocurre cuando la disponibilidad de formas asimilables de N en el suelo es escasa y la demanda de N del rye grass anual es elevada. En la región pampeana esto ocurre al comienzo del crecimiento activo a fines del invierno y principios de la primavera. Por otro lado, la mayor disponibilidad de N mineral en los primeros estadios con siembra convencional determina que la producción inicial de rye grass anual sea mayor que con siembra directa (Bertolotti, Bandera, Méndez & Davies, 2007). En el mismo sentido, en años favorables para el crecimiento de las pasturas, la respuesta a la fertilización y la eficiencia de uso del N por el rye grass es mayor con siembra directa que con siembra convencional (27,5-33,0 vs 17,0-27,0 kg MS kgN-1, Marino, Fernández-Grecco & Agnusdei, 2006, Fernández Grecco & Agnusdei, 2004). Esto se debe a la baja disponibilidad de formas asimilables de N mineral con siembra directa (Marino, Fernández-Grecco & Agnusdei, 2004). Los resultados sugieren que, debido a la menor disponibilidad de N edáfico, el rye grass anual sembrado en forma directa debe ser fertilizado con altas dosis para alcanzar una acumulación de forraje similar a la de un cultivo de rye grass sembrado con laboreo convencional (Villanueva, Marino, Fernandez-Grecco & Agnusdei, 2004).

A pesar de la mayor eficiencia de la aplicación de N al final del invierno, la



fertilización otoñal para obtener más forraje en pleno invierno siempre es una alternativa atractiva en cualquier sistema de producción. En este caso, las respuestas a la fertilización a la siembra en otoño se expresan en las dos o tres primeras utilidades, desapareciendo prácticamente su efecto al final de la temporada de crecimiento del rye grass. Este tipo de práctica evidenció, según la dosis, una respuesta total, durante la temporada otoño invernal, de entre 12 y 22 kg MS por kg de N-1 aplicado. En los tres primeros pastoreos, la respuesta individual en cada uno fue, en promedio, de  $5,2 \pm 4,3$  kg MS kg N-1.

La cantidad de N en la lámina luego de una fertilización es altamente dependiente de la expansión foliar y de la disponibilidad de N mineral (Marino, Agnusdei & Lattanzi, 2005).

## **2.6 Método de inoculación**

La efectividad de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre la semilla dependerá de su interacción con el suelo. Mientras que la inoculación foliar se independiza de las condiciones edáficas.

La forma convencional de realizar la inoculación es sobre las semillas. Sin embargo, la efectividad al incorporar bacterias sobre ésta, dependerá de las características edáficas (pH, humedad, materia orgánica, nutrientes, entre otros), de la interacción con compuestos aplicados sobre las semillas (fungicidas o insecticidas), de la competencia con la microbiota nativa y la capacidad que tengan las bacterias utilizadas para colonizar las raíces. La inoculación foliar podría considerarse una tecnología innovadora que permitiría una independencia de estas condiciones. (Zanettini & Puente, 2016).

La efectividad al incorporar bacterias sobre la semilla dependerá de la interacción con otros compuestos aplicados sobre las semillas, como fungicidas o insecticidas y de la competencia con la microbiota nativa. En tal sentido, la inoculación foliar podría considerarse una tecnología innovadora que permitiría una mayor independencia sobre estas condiciones; sin embargo, no hemos encontrado trabajos de investigación utilizando esta forma de aplicación foliar en el cultivo de rye grass.

### 3. HIPÓTESIS

*Gluconacetobacter* sp. y *Azospirillum* sp. aplicados en el follaje de Rye Grass anual (*Lolium multiflorum* Lam.), promueven el crecimiento del cultivo.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

Evaluar la persistencia en filósfera y el efecto promotor del crecimiento vegetal de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* en el cultivo de Rye grass anual (*Lolium multiflorum* Lam.).

#### 4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Evaluar la persistencia de la colonización en la filósfera del cultivo de Rye grass anual luego de la aplicación foliar de cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense*.

4.2.2. Evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* en el cultivo de Rye grass cuando se aplican en forma foliar.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la persistencia y el efecto promotor del crecimiento por la aplicación foliar de cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Azospirillum brasilense* sobre Rye Grass anual (*Lolium multiflorum* Lam.). El trabajo se realizó en condiciones controladas de temperatura y humedad en la cámara de crecimiento del laboratorio de Microbiología Agrícola de la UNNOBA, ubicado en la sede de Junín, en el edificio María Eva D. de Perón.

#### 5.1. Materiales

I. Semilla de Rye Grass tetraploide, despuntada sin tratamiento.

II. Cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, y *Azospirillum brasiliense* para ser usadas como inoculante. A una concentración de  $1 \times 10^9$  ufc/ml.

III. Macetas polipropileno de 0,15 m de alto por 0,12 m de ancho (0,011 m<sup>2</sup>) de 2 Kg de

capacidad, con tres perforaciones en el fondo de aproximadamente dos milímetros de diámetro.

**IV.** Bolsas plásticas para inoculación.

**V.** Pipetas, pinzas, mecheros, heladera, balanza y demás materiales básicos del laboratorio de microbiología.

**VI.** Bandejas de material plástico, con una altura de tres centímetros.

**VII.** Sustrato: Tierra del campo experimental tinalizada (autoclavada a vapor fluente 15 min, tres veces a intervalos de 24 horas manteniendo el sustrato a 37°C) para la destrucción de los microorganismos presentes, sin alterar la composición química del sustrato y de éste modo eliminar la influencia de las bacterias propias del suelo.

**VIII.** Cámara de crecimiento del Laboratorio de Microbiología de UNNOBA sede Junín.

**IX.** Solución Buffer para riego:

K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H.....	0,5 g
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> .....	0,7 g
Agua destilada.....	1 l

## 5.2. Condiciones de cámara

### I. Fuente de Luz:

6-7 tubos Growth-lux por m<sup>2</sup> y tubos de luz día en una relación 2/1.

- Altura: 40 cm al borde de las macetas.
- Luminosidad: aproximadamente 4600 lux.
- Fotoperíodo: 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

### II. Temperaturas:

Temperaturas		Especies de ciclo otoño-invierno
Máximas		25°C
Mínimas	Diurnas	20°C
	Nocturnas	15-20°C

### III. Humedad relativa:

Se mantuvo una humedad relativa mínima de 65%.

### IV. Riego

Las macetas colocadas en las bandejas, se mantuvieron con 1 cm de solución de riego para mantener a capacidad de campo las plantas y al mismo tiempo amortiguar el efecto de secado generado por el equipo de frío (aire acondicionado).

### 5.3. Diseño del ensayo

Se empleó un diseño en bloques completos al azar (BCA) con 7 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. A saber:

**T1.** Testigo sin aplicación.

**T2.** Aplicación de *Azospirillum* sp. Dosis 2l/ha.

**T3.** Aplicación de *Azospirillum* sp. Dosis 4l/ha.

**T4.** Aplicación de *Gluconacetobacter* sp. Dosis 2l/ha.

**T5.** Aplicación de *Gluconacetobacter* sp. Dosis 4l/ha.

**T6.** Aplicación conjunta de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. Dosis 2l/ha. c/u.

**T7.** Aplicación conjunta de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. Dosis 4l/ha. c/u.

### 5.4. Procedimiento

#### 5.4.1. Siembra

I. Se prepararon 10 macetas con 1 Kg de sustrato, obtenido de los primeros 20 cm del Campo Experimental “Las Magnolias” de UNNOBA previa tinalización, para cada uno de los 7 tratamientos (70 macetas) y se agregaron aproximadamente 150 ml de solución de riego hasta saturación tres horas antes de la siembra.

II. Con ayuda de una policubeta, se prepararon las semillas de Rye Grass a sembrar para cada maceta, donde se ajustó el número de semillas (densidad de siembra) a las recomendaciones de siembra a campo para la región pampeana. La misma se ubica en un rango de 300 a 600 semillas  $m^{-2}$  (Scheneiter & Bertin, 2015), por lo que para la superficie de la maceta (0,011  $m^2$ ), se colocaron 12 semillas por cada una de ellas.

Una vez producida la emergencia y el establecimiento de las plántulas, se “ralearon” a una densidad de 6 plantas por maceta con el objetivo de estandarizar y unificar las repeticiones dentro y entre tratamientos.

La implantación se realizó mediante un palillo de madera a una profundidad no mayor a 2 veces el tamaño de la semilla. Luego se cubrió con el mismo sustrato, se compactó ligeramente y se regó sutilmente a fin de no generar compactación en la capa superior.

III. Las macetas se colocaron en bandejas plásticas y se ubicaron en la cámara de crecimiento en oscuridad, hasta inicio de germinación.

IV. Luego de la emergencia y del estandarizado de la densidad, todas las repeticiones de

los tratamientos, se cultivaron respetando el fotoperiodo y las condiciones de temperatura y humedad con riego a peso constante, como ya se indicó.

#### **5.4.2. Aplicación**

La manera habitual de incorporar los biopreparados a los cultivos es mediante la inoculación de los mismos a la semilla al momento de la siembra. Éste método, a diferencia de la aplicación foliar, presenta desventajas para las bacterias, donde los fungicidas, insecticidas, la microbiota nativa y las condiciones edáficas del suelo, no aseguran un adecuado hábitat de crecimiento. (Zuffo et al., 2017).

Se realizó la aplicación foliar del inoculante con un pulverizador manual, al macollaje del cultivo (4 hojas desplegadas), realizando 3 descargas del pulverizador por maceta para alcanzar el volumen de aplicación indicado más arriba.

La concentración del inoculante provisto por la Empresa ARBO SRL. fue la misma para todos los tratamientos ( $1 \times 10^9$  ufc/ml.), variando las dosis de los mismos, como se mencionó anteriormente.

### **5.5. Evaluación de los cultivos**

#### **5.5.1. Evaluación de la persistencia foliar de microorganismos.**

Se realizó el recuento de epífitas y endófitas de *Gluconacetobacter* y *Azospirillum* en hojas en dos tiempos distintos por duplicado por tratamiento. La primera determinación se realizó a los 4 días de haber sido aplicado el inoculante (**t<sub>4</sub>**), y la segunda a los 11 días de la aplicación (**t<sub>11</sub>**).

#### **5.5.2. Microorganismos Epífitos**

El recuento de los microorganismos de la filósfera se realizó tomando una muestra de 10 g de hojas de cada uno de los tratamientos y se colocó en un Erlenmeyer de 500 ml, con 100 ml de buffer de fosfato de sodio estéril 0,1 M a pH=7,0 (17,42 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 13,60 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y Tween 80 al 0,1% v/v. El recipiente con las muestras se colocó a un shaker (agitador) por 1 hora a 150 rpm y a temperatura ambiente para realizar un lavado inicial de las bacterias epífitas adheridas a las hojas.

A partir de esta suspensión, se sembró 100 µl de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  en la superficie de medios de cultivo sólido específicos para cada género bacteriano en estudio, con el objetivo de determinar las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) por el método de recuento de viables en superficie de medio sólido.

### 5.5.3. Microorganismos Endófitos

Para el recuento de bacterias endófitas de la filósfera, se realizó una desinfección de la superficie de las hojas según el siguiente procedimiento:

- 1-Lavado de las muestras con agua corriente de grifo en forma lenta durante 10 minutos.
- 2-Enjuague con agitación en Tween 80 (1 gota en 200 ml de agua destilada estéril) por 2 minutos.
- 3-Etanol 70% 2 minutos.
- 4- Hipoclorito de Sodio al 2% durante 1.5 minutos.
- 5- Tres lavados con agua destilada estéril.

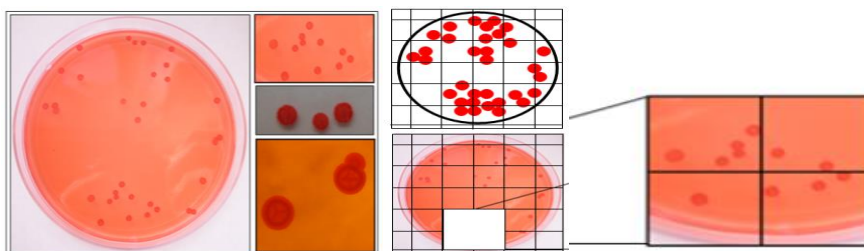
Las aguas del último lavado se cultivaron en medio TSA (Tryptona soja agar) a 37°C durante cuatro días para verificar eficacia en la desinfección.

Luego los fragmentos de hojas desinfectados en el paso anterior, se colocaron en 100 ml de Solución buffer estéril con Tween 80 al 0.01% (v/v) para seguidamente preparar los homogenados por tratamiento en procesadora durante 10 segundos. Posteriormente se sembraron 100 µl del homogenado sin diluir y de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en los mismos medios utilizados para el recuento de epifitas.

### 5.5.4. Recuento de *Azospirillum* sp.

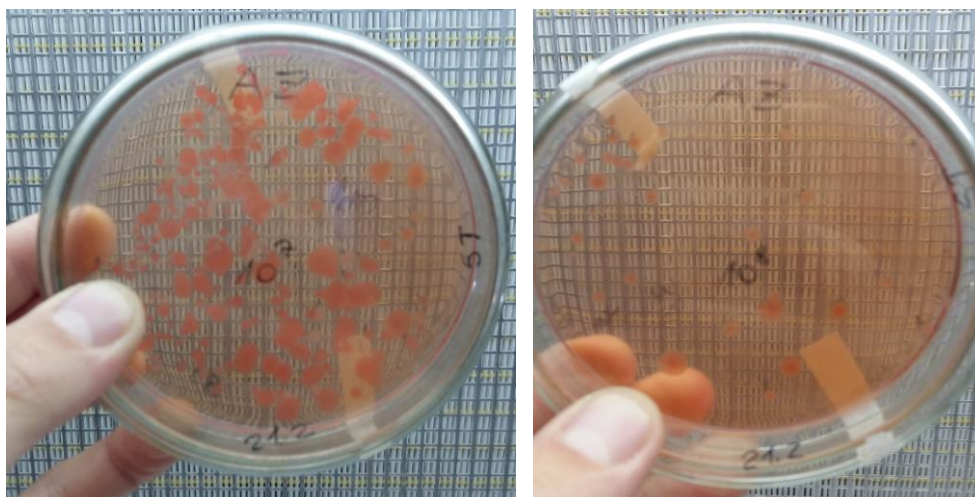
Para la cuantificación de las bacterias del género *Azospirillum*, se utilizó el Medio de crecimiento selectivo Agar Rojo Congo (RC) (Rodríguez Cáceres, 1982), propuesto en el protocolo de evaluación de inoculantes a base de *Azospirillum* por la red de control de calidad de inoculantes (Red CAI). El rojo Congo presente en la formulación actúa como colorante diferencial y permite el reconocimiento de colonias de *Azospirillum*.

Se sembraron las placas con 100µl de la suspensión con pipeta automática, por duplicado y se extendió con espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron invertidas en una estufa a una temperatura de 30°C durante 4-5 días. En este medio las colonias típicas de *Azospirillum* sp. aparecen rojo escarlata, circulares, convexas de 1-3 mm de diámetro de los bordes elevados.



**Figura 2.** Colonias de *Azospirillum* en Agar RC y metodología de recuento.

Fuente: Mariana Puente, Luciana Di Salvo y Lina Lett (Red CAI)



**Figura 3.** Colonias de *Azospirillum* en Agar RC

Fuente: Propia

Se cuentan las colonias en la placa. Para tener adecuada precisión, se eligen aquellas placas que tengan entre 30 y 300 colonias, si dos diluciones sucesivas tienen entre 30 y 300 colonias se realiza un promedio. Para obtener el recuento por ml de la suspensión, se utiliza la fórmula de la Red CAI, presentada en la **Figura 4**.

$$\text{ufc/ml} : n^{\circ} \text{ colonias } F_{\text{siembra}} F_{\text{dilución}}$$

**Figura 4.** Fórmula para el cálculo de ufc/ml

Fuente: Red CAI

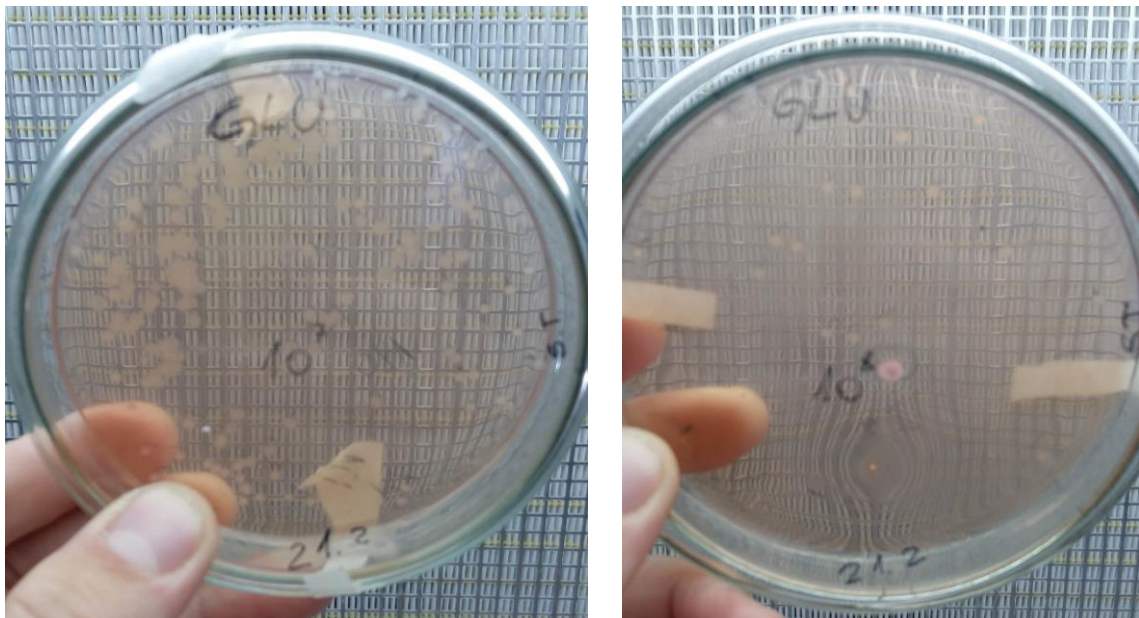
El factor de siembra ( $F_s$ ), es la inversa del volumen sembrado en ml. El factor de dilución ( $F_d$ ), es la inversa de la dilución decimal realizada. Para expresar el recuento por gramo de hoja es necesario dividir el resultado de ufc/ml por 10 porque se utilizaron suspensiones  $10^{-1}$ . Para la evaluación de microorganismos colonizantes se realizó la siembra de Medio TSA (Agar Tripticasa Soya) y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

#### 5.5.5. Recuento de *Gluconacetobacter* sp.

Para la cuantificación de los microorganismos pertenecientes al género *Gluconacetobacter*, se cultivaron en medio LGI sólido y se incubaron durante siete días a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Para el recuento, se utilizó la misma metodología mencionada para el recuento de *Azospirillum*. (**Figura 5. – Figura6.**)



**Figura 5.** Colonias de *Gluconacetobacter* en medio LGI  
Fuente: Propia



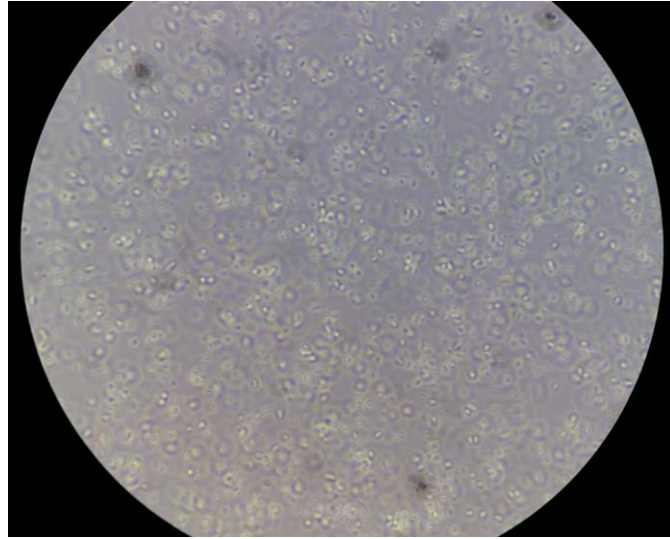
**Figura 6.** Colonias de *Gluconacetobacter* en medio LGI.  
Fuente: Propia

### 5.5.6 Reconocimiento de Colonias

Para reconocer las colonias en los medios de cultivo, se sembraron diluciones decimales seriadas de la cepa de ambas especies a partir del biofertilizante, en sus respectivos medios de cultivo, a modo de entrenamiento en la identificación de la morfológica de las colonias propia de cada una de ellas y así poder compararlas con las obtenidas en el ensayo.

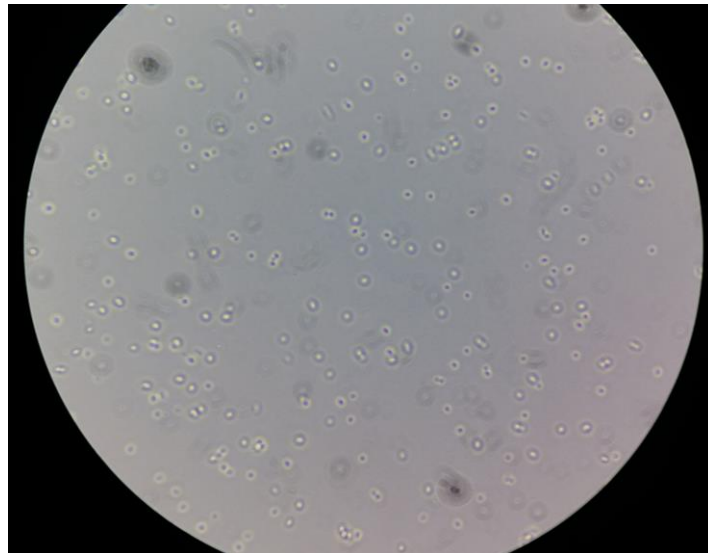
Para confirmar que la colonia pertenezca al género aplicado, se llevó al microscopio óptico una dilución de las mismas y se observó la morfología de las bacterias comparándolas con las aplicadas con el inoculante. (**Figura 7. – Figura 8.**)





**Figura 7.** Bacterias de *Azospirillum* al microscopio óptico x100.

Fuente: Propia



**Figura 8.** *Gluconacetobacter* al microscopio óptico x100.

Fuente: Propia

### **5.6.1. Evaluación del efecto promotor del crecimiento**

Se determinaron los siguientes parámetros agronómicos:

- I. Altura: Se determinó la altura en centímetros de las plantas.
- II. Macollaje: Se contabilizaron la cantidad de macollos vivos por planta.
- III. Estado Fenológico: Se observó el ciclo externo de cada tratamiento- Macollaje- Encañazón-Espigazón.
- IV. Biomasa: Se determinó el peso húmedo de las plantas de cada maceta y luego se colocó en estufa a 70°C por 48 horas, hasta peso constante, donde se volvió a determinar el peso de las muestras.

## 5.6.2 Análisis estadístico de los resultados

Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento en sistema en bloque al azar y los datos fueron sometidos estadísticamente con el software Infostat, donde se obtuvieron los datos de media, desvió estándar, varianza, prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) y homogeneidad de varianza.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recuento de bacterias epífitas y endófitas

Las poblaciones epífitas de *Azospirillum* sp. a los 4 días de producida la inoculación, se encontraron en el rango comprendido entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> (T2 y T3). Mientras que *Gluconacetobacter* sp., los valores fueron levemente superiores encontrándose entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>, (T4 y T5). Ver **Tabla 3**.

En el caso de los tratamientos T6 y T7 donde se aplicaron ambos géneros bacterianos en conjunto, se observan valores similares a los obtenidos por cada cepa aislada. Donde *Azospirillum* sp. se encontró entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> y *Gluconacetobacter* sp. entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> respectivamente para cada dosis. Ver **Tabla 3**.

Cuando se observan los valores de recuento de epífitas para todos los tratamientos a los 11 días de la aplicación (t11), la relación de rangos entre especies y dosis es la misma que para t4. En t11 las concentraciones bacterianas se redujeron considerablemente. Reportándose valores para *Azospirillum* sp. de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> y *Gluconacetobacter* sp. de  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ver **Tabla 3**.

Las poblaciones endófitas de *Azospirillum* sp. en t4 se encontraban en valores comprendidos entre  $10^2$  y  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>, mientras que *Gluconacetobacter* sp. entre  $10^3$  y  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> respectivamente para cada dosis. Ver **Tabla 3**.

A los 11 días, las poblaciones endófitas aumentan con la misma relación de persistencia dentro de las hojas entre especies bacterianas que las observadas a los 4 días de producida la aplicación. En el caso de *Azospirillum* sp. los valores estuvieron comprendidos entre  $10^3$  y  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> para ambas dosis respectivamente. Para *Gluconacetobacter* sp. las poblaciones se encontraban entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>, para ambas dosis respectivamente. Ver **Tabla 3**.

A los 11 días sin diferenciar tratamientos, se observa que las poblaciones endófitas aumentaron respecto a las determinadas a los 4 días. Mientras que para el caso de las poblaciones epífitas determinadas a los 11 días fueron menores que las observadas a los

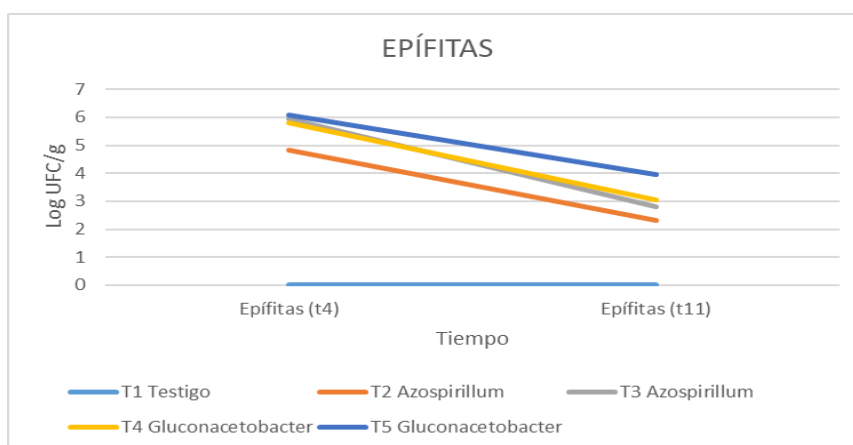
4 días. Indicando que las condiciones de exposición al ambiente generan disminuciones en la vida bacteriana en la superficie de las hojas, contrariamente lo que ocurre con las endófitas.

Las UFC.g<sup>-1</sup> endófitas sufrieron una dinámica poblacional inversa cuando se las compara con la dinámica de las poblaciones epífitas, donde la mayor concentración de las mismas se encontró a los 11 días luego de haberse producido la inoculación.

Al observar los gráficos de las figuras 9 y 10, se aprecia la evolución de las poblaciones epífitas en el tiempo. Donde en t4 las UFC.g<sup>-1</sup> son mayores que en t11. Caso contrario ocurre con las poblaciones endófitas (Figura 11. + Figura 12.), donde la mayor concentración poblacional ocurre en t11.

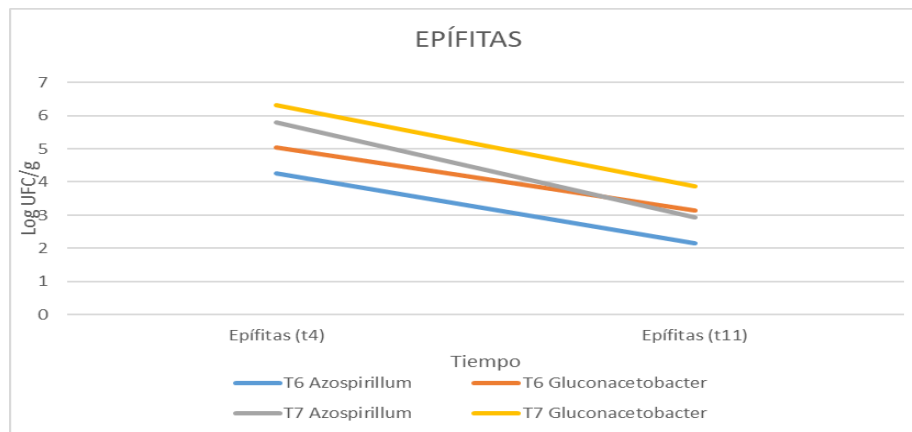
**Tabla 3.** Recuento (expresado en log ufc.g-1) de Bacterias Epífitas y Endófitas en hoja a los 4 días de la inoculación foliar (t<sub>4</sub>) y a los 11 días de la inoculación (t<sub>11</sub>).

TRATAMIENTO	Germen	Epífitas (t <sub>4</sub> )	Endófitas (t <sub>4</sub> )	Epífitas (t <sub>11</sub> )	Endófitas (t <sub>11</sub> )
T1	Testigo	0	0	0	0
T2	Azospirillum	4,819	2,602	2,301	3,146
T3	Azospirillum	5,944	2,924	2,812	3,857
T4	Gluconacetobacter	5,806	3,079	3,041	4,041
T5	Gluconacetobacter	6,079	3,919	3,963	4,944
T6	Azospirillum	4,255	2,255	2,146	3,23
	Gluconacetobacter	5,041	3,633	3,146	4,176
T7	Azospirillum	5,792	2,857	2,944	3,972
	Gluconacetobacter	6,301	3,857	3,857	4,857

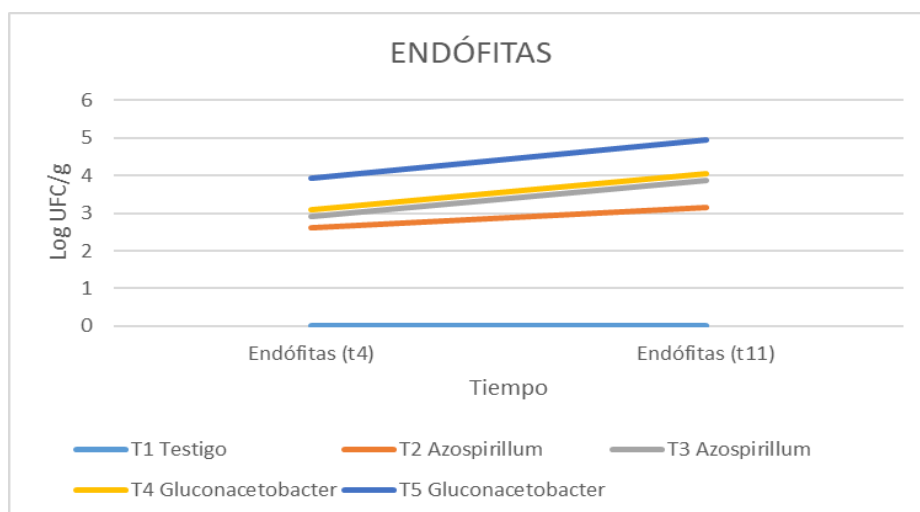


**Figura 9.** Recuento de Bacterias Epífitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t<sub>4</sub>) y a los 11 post inoculación (t<sub>11</sub>) para los tratamientos: T1(testigo), T2

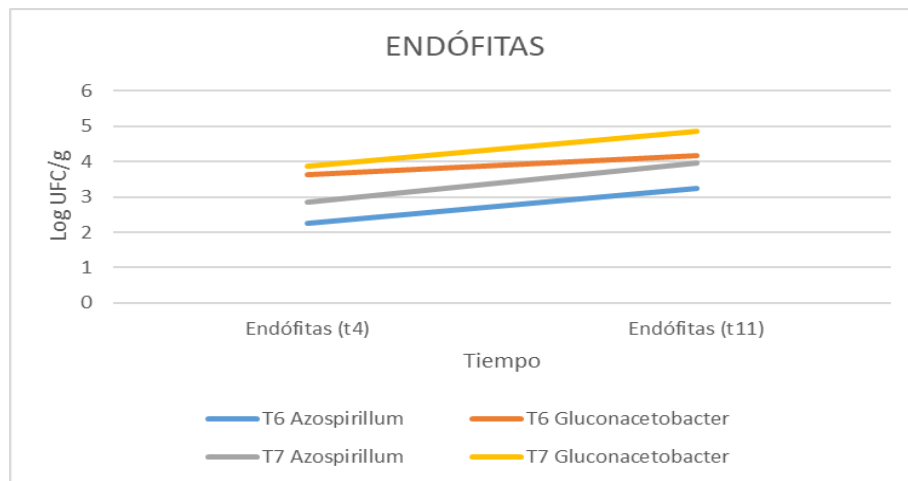
(Azospirillum 2l/ha), T3 (Azospirillum 4l/ha), T4 (Gluconacetobacter 2l/ha), T5 (Gluconacetobacter 4l/ha).



**Figura 10.** Recuento de Bacterias Epífitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días post inoculación (t11) para los tratamientos T6 (Azospirillum + Gluconacetobacter 2l/ha), T7 (Azospirillum + Gluconacetobacter 4l/ha)



**Figura 11.** Recuento de Bacterias Endófitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días de la inoculación (t11) para los tratamientos: T1(testigo), T2 (Azospirillum 2l/ha), T3 (Azospirillum 4l/ha), T4 (Gluconacetobacter 2l/ha), T5 (Gluconacetobacter 4l/ha).



**Figura 12.** Recuento de bacterias Endófitas en hoja (log de ufc/g) a los 4 días de la inoculación foliar (t4) y a los 11 días de la inoculación (t11) para los tratamientos T6 (Azospirillum + Gluconacetobacter 2l/ha), T7 (Azospirillum + Gluconacetobacter 4l/ha)

## 6.2. Evaluación Efecto Promotor

Todos los tratamientos inoculados produjeron aumentos significativos en materia seca y altura de las plantas cuando se lo compara frente al testigo sin inocular. En cambio, el nº de macollos aumento significativamente en aquellos tratamientos donde se aplicó conjuntamente *Gluconacetobacter* sp. y *Azospirillum* sp. (T6 y T7) y la doble dosis de *Gluconacetobacter* sp. (T5). Ver **Tabla 4.** Ver **Figura 13.** – **Figura 14.** – **Figura 15.**

Al analizar los valores de materia seca de *Azospirillum* sp. a simple (T2) y doble dosis (T3), se observan incrementos de 41.44% y 48.5% respectivamente frente al control sin inocular. Con valores de Materia seca de 4.71 Tn.ha<sup>-1</sup> y 4.69 Tn.ha<sup>-1</sup> para cada uno. Ver **Tabla 4.** - **Figura 13.**

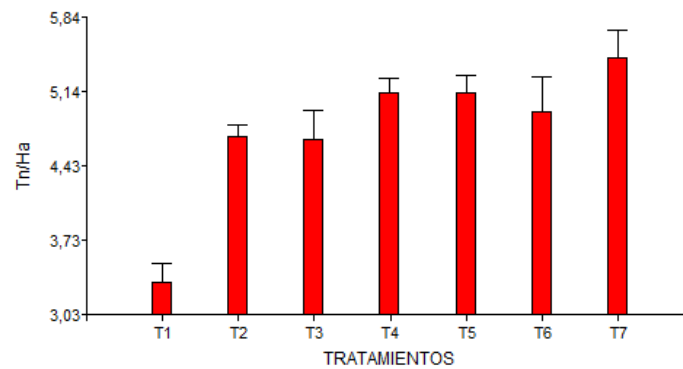
Para el caso de *Gluconacetobacter* sp. a simple (T4) y doble dosis (T5), el incremento frente al testigo fue superior que para el caso de *Azospirillum* sp., donde el porcentaje de aumento fue de 53.75%, con un valor de 5.12 Tn.ha<sup>-1</sup>. Ver **Tabla 4.** - **Figura 13.**

La aplicación conjunta de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. a doble dosis (T7), fue la que mayores incrementos produjo frente al testigo, 5.45 Tn.ha<sup>-1</sup>. Sin embargo, no difirió significativamente frente a T4 – T5 – T6. Ver **Tabla 4.**

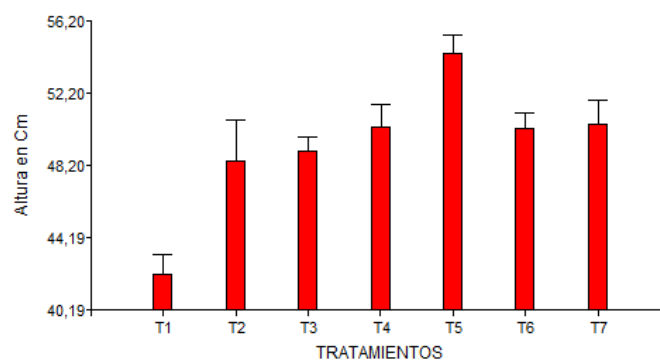
Los tratamientos co-inoculados (T6 y T7) y *Gluconacetobacter* sp. con 4Lts/Ha, superan al testigo sin inocular en todos los parámetros agronómicos observados. Ver **Tabla 4.**

**Tabla 4.** Datos agronómicos. Promedio de las repeticiones de cada tratamiento. Letras distintas indican resultados significativos con ( $p < 0,05$ ). En el anexo se muestran las tablas con los datos agronómicos de las repeticiones de cada tratamiento y el análisis estadístico de los resultados.

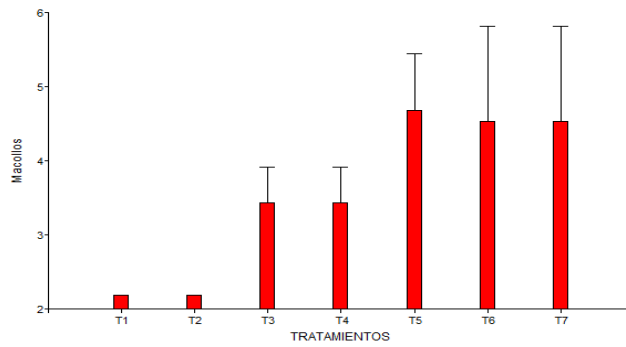
TRATAMIENTOS	Tn (mat.seca)/ha	Altura de plantas (cm)	N° Macollos
T1	3,33 a	42,1 a	2 a
T2	4,71 b	48,5 b	2 a
T3	4,69 b	49,0 b	3 a b
T4	5,12 c d	50,3 b	3 a b
T5	5,12 c d	54,4 c	5 b
T6	4,95 b c	50,3 b	4 b
T7	5,45 d	50,5 b	4 b



**Figura 13.** Gráfico de media y desvío estándar de Materia Seca de cada tratamiento, expresado en Toneladas Hectáreas<sup>-1</sup>.



**Figura 14.** Gráfico de media y desvío estándar de Altura de las plantas de cada tratamiento, expresado en centímetros.

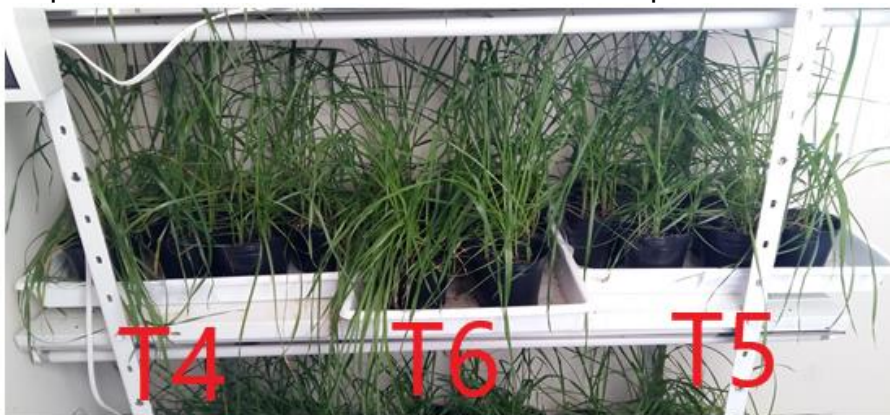


**Figura 15.** Gráfico de media y desvío estándar de N° de Macollas de las plantas de cada tratamiento.



**Figura 16.**

**T1** - Testigo sin aplicación foliar – Todas las macetas corresponden al mismo tratamiento.



**Figura 17.**

**T4** - *Gluconacetobacter diazotrophicus* 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.

**T6** - *Gluconacetobacter diazotrophicus* + *Azospirillum brasilense* 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.

**T5** - *Gluconacetobacter diazotrophicus* 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.



**Figura 18.**

**T2** - *Azospirillum brasilense* 2Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.

**T7** - *Gluconacetobacter diazotrophicus* + *Azospirillum brasilense* 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.

**T3** - *Azospirillum brasilense* 4Lts/ha. Todas las macetas de la bandeja.

## **7. DISCUSIÓN**

La germinación de Rye Grass ocurre cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas para que la semilla germine (Correa, 2016); es decir el grano absorbe agua y se desencadena una serie de reacciones que finalizan con la aparición de la radícula y las primeras hojas. Esta fase de crecimiento, ocurre entre los 8 y 15 días posteriores a la siembra. (Japón, 2009). El tiempo que transcurre desde la siembra hasta la emergencia de la radícula, generaría una demora en la infección, que disminuiría la población del inoculo, para el cual se necesitaría un formulado bacteriano capaz de sobrevivir el tiempo entre la siembra y la germinación. Sin embargo, en el mercado de inoculantes son escasos o nulos los formulados para semillas forrajeras gramíneas dada la baja persistencia estimada sobre la semilla. (Peticari, 2021. comunicación personal). A su vez, son escasas las posibilidades que existan futuros desarrollos por parte de semilleros y/o empresas formuladoras de inoculantes que produzcan biopreparados para semilla en especies forrajeras (Pasto ovido, Rye Grass, Festuca, entre otras). (Peticari, 2021. comunicación personal). Por tal motivo la técnica de inoculación a la semilla sería muy compleja y generaría una desmedida mortandad de bacterias. Es frecuente además el tratamiento de la semilla con fungicidas e insecticidas



aumentando las posibilidades de mortalidad de los PGPR sobre la semilla tratada. La aplicación foliar se presenta como una alternativa frente a la imposibilidad de realizar la inoculación en semilla de gramíneas forrajeras anuales.

Este método de aplicación foliar se presenta como una técnica innovadora para ser aplicado en especies de difícil o nula capacidad de inoculación a la semilla, como el caso de pastizales naturales y/o especies con granos vestidos o condiciones particulares de siembra como es el caso de las aéreas. Se plantea entonces la aplicación foliar, como un procedimiento novedoso para la remediación de sectores de baja producción de forraje a bajo costo y de difícil acceso a los fertilizantes tradicionales.

Una condición microbiológica fundamental para justificar la efectividad de un inoculante es que sobreviva en el sitio aplicado (Bashan, 1998).

En el presente estudio se observó que las especies utilizadas como modelo, demostraron escasa capacidad de sobrevivida en la filósfera a los 11 días de ser aplicadas, sin embargo, los datos de UFC.g<sup>-1</sup> endófitos presentes en **Tabla 3** indican la capacidad de sobrevivencia y adaptación de las bacterias en el interior del vegetal.

Estos géneros aplicados en esta condición controlada, tienen capacidad de sobrevivida en el sitio. Es factible que los valores obtenidos en cámara, sean inferiores a los que se muestren a campo, afectados en éste caso por los cambios en las variables ambientales a las cuales se encontrarían expuestos. Por tal motivo, en el ensayo a campo sería necesario considerar la aplicación conjunta con protectores UV específicos que alarguen la vida media bacteriana hasta que se produzca el establecimiento de las PGPR en la condición de endófitos en el interior de las hojas.

Los valores observados de actividad endofíticas de *Azospirillum* sp. aplicados en forma foliar en este estudio, es similar a la determinada en condiciones naturales sin inoculación por Mendoza, et al., (2004) sobre especies gramíneas anuales, donde encontraron 1x10<sup>3</sup> UFC (3 log UFC/g) por gramo de tejido analizado. Para el caso de *Gluconacetobacter* sp., no se encuentran datos publicados sobre recuentos bacterianos luego de aplicaciones foliares. Las investigaciones que se pueden observar son acerca de recuentos de UFC.g<sup>-1</sup> de endófitos naturales, no inoculados, (Dibut, Martínez-Viera, Ríos, Ortega & Fey, 2005) en especies vegetales tropicales como caña de azúcar y maíz azucarado.

Este estudio podría ser considerado el primer trabajo donde se inocula *Gluconacetobacter* sp. y *Azospirillum* sp. en forma conjunta y de manera foliar, a una gramínea forrajera anual. Se pueden encontrar trabajos de recuento de UFC.g<sup>-1</sup> de *Azospirillum* sp. foliar en soja (Puente, et al., 2017) y de recuento de nativos para

*Gluconacetobacter* sp. como los publicados por Dibut, y colaboradores (2005).

Ambos géneros bacterianos demostraron capacidad de persistencia endófitas en Rye Grass. La población de endófitas se incrementó en el segundo recuento ( $t_{11}$ ) respecto del primero ( $t_4$ ), mientras que las poblaciones epífitas mostraron un comportamiento inverso. T5, *Gluconacetobacter diazotrophicus* a dosis de 4Lts/Ha, fue el tratamiento que mayor capacidad endófitas evidenció.

Según la revisión bibliográfica sobre *Gluconacetobacter* sp. (Rios, & Dibut, 2007), los principales trabajos publicados son referidos a la fijación de Nitrógeno en cultivos tropicales, principalmente en caña de azúcar. No se encontraron estudios donde se hayan evaluado los efectos de la aplicación de *Gluconacetobacter* sp. en la producción de biomasa aérea en especies forrajeras anuales. Por tal motivo, este trabajo podría ser considerado como uno de las primeras evaluaciones donde se calcula *Gluconacetobacter* sp. en este aspecto.

En *Azospirillum* sp. ocurre algo similar con investigaciones realizadas inoculando a la semilla. Sin embargo, en los últimos años se han realizado algunos estudios de aplicación foliar en trigo, maíz y soja. Según Zanettini y Puente, 2016 al evaluar la respuesta de *Azospirillum brasilense* aplicado vía foliar, sobre la producción de trigo, el cultivo no mostró respuesta al rendimiento en grano en las condiciones ambientales del ensayo. Puente y colaboradores (2017) encontraron respuestas en la producción de biomasa y en rendimiento al aplicar foliarmente *Azospirillum brasilense* y *Bradyrhizobium japonicum* a la semilla.

Los resultados obtenidos en producción de materia seca, confirmaron que la aplicación foliar de bacterias endófitas aumentaron el crecimiento de Rye Grass anual, encontrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey, entre el testigo sin aplicar y las plantas tratadas. Ambos géneros bacterianos promovieron el crecimiento de Rye Grass, indicando como tecnología potencial para aumentar la producción de esta gramínea forrajera.

Al evaluar el número de macollos, se encontró que no todos los tratamientos difirieron significativamente frente al testigo sin aplicación. Solamente T5 – T6 – T7 difirieron significativamente.

La diferencia en Materia seca no puede ser explicada en su totalidad por la altura y número de macollos. Lo que supone un mayor tamaño celular, mayor concentración y menor cantidad de agua.

## 8. CONCLUSIONES

- De acuerdo a las conclusiones obtenidas se acepta la hipótesis de trabajo.
- La aplicación foliar de *Azospirillum brasilense* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en las condiciones de estudio afectó positivamente el crecimiento del cultivo de Rye Grass, ya sea en forma individual o co-inoculados.
- Se encontró una alta persistencia de *Azospirillum brasilense* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el interior de las hojas de Rye Grass anual.
- Se determinó una baja persistencia de ambos géneros bacterianos luego de la inoculación en la superficie foliar de Rye Grass anual.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, G., Acosta A. & Ayala Torales A. (2007). *Cambios en el contenido de materia seca en Lolium multiflorum, Avena sativa y Bromus unioloides cortados en distintos momentos del día*. Revista Argentina de Producción Animal. Revista Argentina de Producción Animal 27 (1): 117-18.
2. Altuve, S., Bendersky, D., Ramírez, M. & Ramírez, R. (2004). *Producción de forraje de Lolium multiflorum bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfatada en el centro sur de Corrientes*. Revista Argentina de Producción Animal 24 (1): 124-5.
3. Amigone, M., Chiacchiera, S., Bertram, N., Kloster, A., Conde, M. & Masiero B. (2010). *Producción de forraje de avena, cebada forrajera, centeno, triticale y raigrás anual en el sudeste de Córdoba*. INTA, Centro Regional Córdoba, EEA Marcos Juárez. Información para extensión 133: 11pp
4. Amigone, M., Kloster, M., Chiacchiera, S., Conde, M. & Masiero, B. (2012). *Verdeos de Invierno: Producción de forraje de avena, cebada forrajera, triticale y raigrás anual en la EEA INTA Marcos Juárez*. INTA, Centro Regional Córdoba, EEA Marcos Juárez. Información para extensión 139: 9 pp
5. Andrews, J. (1992). *Biological control in the phyllosphere*.
6. Atlas, R., & Corzo, A. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: Pearson Educación.
7. Bashan, Y. (1998). *Inoculants of plantgrowth-promoting bacteria for use in agriculture*. *Biotechnology Advances*, 16 (4): 729-770
8. Bashan, Y. & Holguin, G. (1993). *Anchoring of Azospirillum brasilense to hydrophobic polystyrene and wheat roots*. *J. Gen. Microbiol.*, p. 379-385.
9. Bellone, C. H., Bellone, S. D. V. C., Pedraza, R. O. & Monzón, M. A. (1997). *Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by Acetobacter diazotrophicus*. *Soil. Biol. Biochem.*, 1997, vol. 29, p. 965-967.
10. Bertolotti, N., Bandera, R., Méndez, D. & Davies, P. (2007). *Efecto del sistema de siembra y de la fertilización nitrogenada sobre la producción de raigrás anual y avena*. Revista Argentina de Producción Animal 27 (1): 159-160.
11. Brasil, M., Baldani, JI., Baldani, B. (2005). *Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense*. *R Bras Ciênc Solo*; (29):179-190.

12. Bueno dos Reis Jr, F., Reis, V. M., Urquiaga, S. & Döbereiner, J. (2000). *Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria Herbaspirillum sp. And Acetobacter diazotrophicus in sugar cane (Saccharum spp). Plant Soil, vol. 219, p. 153-159.*
13. Caballero-Mellado, J., Martínez- Romero, E., Estrada de los Santos, P. & Fuentes-Ramírez, L. E. (1998). *Maize colonization by Acetobacter diazotrophicus. En: C. Elmerich, A. Kondrosi; W. E. Newton (Ed). Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher. p. 381-382.*
14. Cavalcante, V. A. & Döbereiner, J. (1998). *A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil, vol. 108, p. 23-31.*
15. Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., Coline Le Noir, C., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Olivera Pedrosa, F., de Souza, E., Días Zorita, M., de-Bashan, L., Mora, V. (2020). *Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature.*
16. Cocking, E.C., Stone, P.J. & Davey, M.R. (2006). *Intracellular colonization of roots of Arabidopsis and crop plants by Gluconacetobacter diazotrophicus . In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 42, 74–82.*
17. Cojho, E. H., Reis, V. M., Schenberg, A. C. & Döbereiner J. (1993). *Interactions of Acetobacter diazotrophicus with amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture.FEMS. Microbiol. Lett., vol. 106, p. 23-31.*
18. Correa, S. P. Q. (2016). *Comparación productiva de tres cultivares de ryegrass perenne (Lolium perenne) en términos de producción y calidad. Quito- Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8031/1/T-UCE-0004-23.pdf>*
19. Curtis, H. (2001). *Biología. 6a Ed. Médica Panamericana. 1496p.*
20. De Battista, JP. & Ré, A. (2008). *Tasas de crecimiento estacionales de verdeos de invierno en vertisoles de Entre Ríos. Revista Argentina de Producción Animal 28(1):465-6*
21. De Battista, JP., Diez, P., Ré, A., Iacopini, L. & Costa, M. (2006). *Respuesta a la fertilización de raigrás anual en vertisoles de Entre Ríos. Revista Argentina de Producción Animal 26 (1): 138-140*
22. Díaz-Zorita, M., Fernández-Canigia, M.V. (2008). *Field performance of a liquid formulation of Azospirillum brasilense on dryland wheat productivity, Eur. J. Soil Biol. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.07.001*

23. Dibut, B. (2005). *Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible. HUMIWORM S.R.P. de R. L.* 108 p.
24. Dibut, B., Martínez-Viera R., Ríos Y., Ortega M. & Fey L. (2005). *Nuevos aislados de Gluconacetobacter diazotrophicus en cultivos de importancia económica para Cuba. Cultivos Tropicales*, vol. 26, no. 2, p. 5-10.
25. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2002). *Effect of inoculation with wild type Azospirillum brasilense and A. irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol Fertil Soil.* (36):284–297.
26. Döbereiner, J., Marriel, I., Nery, M. (1976). *Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. Can J Microbiol* 22: 1464-1473.
27. Döbereiner, J., Reis, V. M., Paula, M., Olivares, F. (1993). *Endophytic diazotroph in sugarcane, cereals and tuber plants. En: New Horizons in Nitrogen Fixation. Netherlands: Klumer Academic Publisher, p. 671-676.*
28. Dong, Z., Canny, M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., Rodés, R. (1994). *A nitrogenfixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. Plant Physiol.*, vol. 105, p. 1139-1147.
29. Dong, Z., Mc Cully, M. E., Canny, M. J. (1997). *Does Acetobacter diazotrophicus live and move in xylem of sugarcane stem? Anatomical and physiological data. Annals of Botany*, vol. 80, p. 147-158.
30. Fernández Grecco, R. & Agnusdei, M. (2004). *Producción otoño – invernal de forraje de raigrás anual: método de siembra y fertilización nitrogenada. Revista Argentina de Producción Animal* 24(1):189-90.
31. Fernandez Domingues Duarte, C., Cecato, U., Trento Biserra, T., Mamédio, D., Galbeiro, S. (2019). *Azospirillum spp. en gramíneas y forrajeras. Rev Mex Cienc Pecu* 2020;11(1):223-240.
32. Ferraris, G. & Faggioli, V. (2013). *Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina.*
33. Ferraris, G., Couretot, L., Díaz Zorita, M. (2008). *Respuesta de trigo a tratamientos con Azospirillum sp. según niveles tecnológicos. CD Rom. VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Invernal de Cereales de siembra Otoño – Invernal. I Encuentro del Mercosur.*
34. Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristles, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (2001).

*Novel nitrogen-fixing acid bacteria, Gluconacetobacter johannae sp nov and Gluconacetobacter azotocaptans sp. Nov, associated with coffee plants. Int. J. Syst. Evolu. Microbiol.*

35. Fuentes-Ramírez, L. E., Caballero- Mellado, J., Sepúlveda, J., Martínez-Romero, E. (1999). *Colonization of sugarcane by Acetobacter diazotrophicus, and indolacetic is inhibited by high N-fertilization. FEMS. Microbiol. Ecol., vol. 29, p. 117-128.*
36. Fuentes-Ramírez, L. E., Jiménez- Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R., Caballero- Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. Plant Soil., vol. 154, p. 145-150.*
37. Galar, M. L. & Boiardi J. L. (1995). *Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in Acetobacter diazotrophicus. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 43, p. 713-716.*
38. Gills, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Texeira, K. R. S., Döbereiner, J., Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 39, p. 361-364.*
39. Hartmann, A., Baldani, JI. (2006). *The genus Azospirillum. In: Dworkin M editor. The Prokaryotes. 1st ed. New York, New York: Springer;115-140.*
40. Hiriano, S., Upper, C. (2000). *Bacterial in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vo 64 No. 3. 624-653.*
41. Hungria, M., Nogueira, MA., Araujo, RS. (2016). *Inoculation of Brachiaria spp. with the plant growth-promoting bacterium Azospirillumbrasilense: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. Agr Ecosyst Environ;(221):125-131.*
42. Jacques, M., Kinkel, L., Morris, C. (1994). *Population sizes, inmigration, and growth of epiphytic bacterial on leaves of different ages position of field-grown endive (Cichorium endivia var. Latifolia). Applied and Enviromental Microbiology. Vol 61 No 3. 899-906.*
43. James, E. K., & Olivares, F. L. (1998). *Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant. Sci., vol. 17, p. 77-119.*
44. James, E. K. (2000). *Nitrogen fixation in endophytic and associative simbiosis. Field Crops Research, vol. 65, p. 197-209.*

45. James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. L., Döbereiner, J. (1994). *Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.*, vol. 45, p. 57-66.
46. Japón, P. (2009). *Universidad Nacional de Loja*, 62. Retrieved from <http://dspace.unl.edu.ec:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4343/ARELLANO WASHINGTON - JIMENEZ GALO.pdf?sequence=1>
47. Jiménez-Salgado, T., Aparicio, R., Caballero-Mellado, J. (1994). *Detección de citocinas en Acetobacter diazotrophicus aislado de caña de azúcar*. En: *Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*. (15:1994: La Habana).
48. Jiménez-Salgado, T., Fuentes- Ramírez, L. E., Tapia-Hernández, A., Mascarúa-Esparza, M. A., Martínez-Romero, E., Caballero- Mellado, J. (1997). *Coffea arabica L., a new host plant for Acetobacter diazotrophicus and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, p. 3676-3683.
49. Kuhl, J., Oesle, J. (1988). *Dependence of nitrogenase switch off upon oxygen stress on the nitrogenase activity in Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, vol. 170, p. 5325-5329.
50. Li, R. P. & MacRae, I. C. (1991). *Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane*. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 23, p. 999-1002.
51. Lindow, S., Andersen, G. (1996). *Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 62 No 8. 2978-2987.
52. Lindow, S., Brandl, M.T. (2003). *Minireview microbiology of the phyllosphere*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 No 4: 1875-1883.
53. Lindow, S., Hecht-Poinar, E., Elliott, V. (2004). *Phyllosphere microbiology*. *American Phytopathological Society. United States of América*. P 393.
54. Loganathan, P., Suelta, R., Parida, A. K., Nair, S. (1999). *Isolation and characterization of two genetically distant groups of Acetobacter diazotrophicus from a new host plant Eleusine coracana L*. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 87, p. 167-172.
55. Loiret, F. G., Ortega, E., Ortega-Rodés, P., Rodés, R., Fuente, E. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus es todavía un dilema para la ciencia*. *Revista Biología*, vol. 18, no. 2, p. 113-122.
56. Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Jovi, D. B. S. S., Hyungseok, J., Thenmozhi, R., Hari, K., Sa, T. (2004). *Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus in tropical and subtropical plants of Western Hates, India*. *Microbiol. Res.*, vol. 159, p. 233-243.



57. Marino, A., Agnusdei, M., Lattanzi, F. (2005). *Dinámica de la acumulación de nitrógeno en función de la expansión foliar de raigrás anual*. *Revista Argentina de Producción Animal* 25 (1): 131-132.
58. Marino, A., Fernández-Grecco, R., Agnusdei, M. (2004). *Producción otoño-invernal y eficiencia de uso del nitrógeno de raigrás anual: métodos de siembra y fertilización nitrogenada*. *Revista Argentina de Producción Animal* 24 (1): 183-4.
59. Marino, A., Fernández-Grecco, R., Agnusdei, M. (2006). *Fertilización nitrogenada de raigrás anual en siembra convencional y directa: acumulación de forraje y eficiencia de uso del nitrógeno con diferente régimen hídrico*. *Revista Argentina de Producción Animal* 26 (1): 243-4.
60. Méndez, D. & Davies, P. (2003). *Calidad del forraje y baja ganancias de peso otoñales. En Invierno al verdeo. Tercera Jornada Demostrativa, 15 de julio*. INTA, EEA Gral. Villegas. Pp 7-12
61. Méndez, D., Davies, P., Zamolinski, A., Peralta, O. (2004). *Producción trienal de verdeos de invierno en la región noroeste bonaerense*. *Revista Argentina de Producción Animal* 24 (1): 238-9
62. Mendoza, H., Cruz, M., Jacques-Hernández, C. (2004). *Aislamiento, Selección, Producción y Evaluación de un Inoculante basado en cepas nativas de Azospirillum el norte de Tamaulipas*. *Lab. Biotecnología Vegetal I, (2) Transferencia de Tecnología, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamps. México*.
63. Muthukumarasamy, R., Rebathi, G., Vadivelu, M. (2000). *Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing Acetobacter diazotrophicus against Colletotrichum falcatum Went, a casual of red-rot of sugar*. *Curr. Sci.*, vol. 78, p. 1063-1065.
64. Okon, Y. & Labandera-Gonzalez, C. (1994). *Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation*. *Soil Biol. Biochem.* Vol 26 (12):1591-1601.
65. Okon, Y. & Vanderleyden, J., (1997). *Azospirillum species can stimulate plants, Root-associated*. *Appl Environ Microbiol*;63(7):366-370.
66. Oliveira, A., Urquiaga, S., Dobereiner, J., Baldani, J. I. (2002). *The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria in micropropagate sugarcane plants*. *Plant and Soil.*, 242, p. 205-215.
67. Ortega, P., Ortega, E., Fernández, L., Rodés, R. (2002). *Composición de cinco aislados fijadores de nitrógeno obtenidos del interior de la caña de azúcar y de*

- Saccharococcus sacchari*. En: Congreso Científico del INCA (13:2002 nov. 12-15: La Habana).
68. Peláez, I., Armas, R., Valadier, M. H., Champigny, M. L. (1994). *Shortterm effect of nitrate on carbón metabolism of two sugar cane cultivars differing in their biomass production*. *Phytochemistry*, 1994, vol. 36, p. 819-833.
69. Pordomingo, A.J., Romero, N., Pordomingo, A.B., Volpi Lagreca, G. (2004). *Evaluación de la producción y la composición química de raigrás anual en el este de La Pampa*. *Revista Argentina de Producción Animal* 24(1): 88-9.
70. Puente, M. & Peticari, A. (2006). *Inoculación de trigo con Azospirillum*. *Trigo en Siembra Directa*. 97-99.
71. Puente, M., Gualpa, J.L., López, G., Molina, R., Carletti, S., Cassan, F. (2017). *The benefits of foliar inoculation with Azospirillum brasilense in soybean are explained by an auxin signaling model*. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>
72. Reinhold-Hunrek, B. & Hurek, T. (1998). *Life in grasses: diazotrophic endophytes*. *Trends Microbiol.* Vol. 6, p. 139-144.
73. Reis, V., Baldini, J., Baldini, V., Dobereiner, J. (2000). *Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm Trees*. *Plant Sci*;(19):227-247.
74. Reis, V. M. & Döbereiner, J. (1998). *Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.*, vol. 171, p. 13-18.
75. Ríos, Y. (2007). *Efecto de Gluconacetobacter diazotrophicus sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de la yuca (Manihot esculenta Crantz) var CMC-40*. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana. 57 p.
76. Ríos, Y. & Dibut, B. (2007). *Gluconacetobacter diazotrophicus: UN MICROORGANISMO PROMISORIO EN LA ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS*. *Cultivos Tropicales*, vol. 28, núm. 4, 2007, pp. 19-24. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba
77. Rodríguez Cáceres, E. A. (1982). *Improved medium for isolation of Azospirillum spp.* *Appl. And Environmental Biol.* p 990-991.
78. Russo, A., Felici, C., Toffanin, A., Götz, M., Collados, C., Barea, J.M., Moënne-Loccoz, Y., Smalla, K., Vanderleyden, J., Nuti, M. (2005). *Effect of Azospirillum inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants*. *Biol Fertil Soils* 41:301–309
79. Satorre, E. (2005). *Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual*. *Ciencia Hoy* 15: 24- 31.

80. Scheneiter, J. O. & Bertin, O. D. (2015). *Producción de forraje y cultivos forrajeros en el norte de la provincia de Buenos Aires. INTA EEA Pergamino. Revista de Tecnología Agropecuaria III (7). 45 p.*
81. Schultz, N., Morais, R.F., Silva, JA. (2012). *Avaliação agrônômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. Pesq Agropec Bras;(47):261-268.*
82. Sevilla, M. & Kennedy, C. (1999). *Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of Acetobacter diazotrophicus, an endophyte of sugarcane. En: Triplett, E.W. (ed). Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for the analysis of a biological process. Wymondham:Horizon Scientific Press., p. 737-760.*
83. Sevilla, M., Burris, R. H., Nirmala-Gunalapa, G. L., Kennedy, C., Gunalapa, N. (2001). *Comparison of Benedit to sugarcane plant growth and N15 incorporation following inoculation of sterile plants with Acetobacter diazotrophicus wildtype and Nif-mutant strains. Molec. Plant. Micro. Interactions., vol. 14, no. 3, p. 358-366.*
84. Sevilla, M., Oliveira, A., Baldani, I., Kennedy, C. (1998). *Contributions of the endophyte Acetobacter diazotrophicus to sugarcane nutrition: a preliminary study. Symbiosis, 1998, vol. 25, p. 181-196.*
85. Shankaraiah, N., Gururaj-Hunsigi, L., Hunsigi, G. (2001). *Field evaluation of some promising associative nitrogen fixing bio-abuts under grader levels of nitrogen for yield and quality of jiggery. Cooperative Sugar, vol. 33, no. 1, p. 39-43.*
86. Stephan, M. P., Oliveira, M., Teixeira, K. R. S., Martínez-Drets, G., Döbereiner, J. (1991). *Physiology and dinitrogen fixation of Acetobacter diazotrophicus. FEMS Microbiol. Lett., vol. 77, p. 67-72.*
87. Tapia-Hernández, A., Bustillos, M. R., Jiménez Salgado, T., Caballero Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L. E. (2000). *Natural endophytic occurrence of Acetobacter diazotrophicus in pineapple plants. Microbial Ecology, vol. 39, no. 1, p. 49-55.*
88. Trentini, D.B. (2010). *Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre Azospirillumamazonense [tesis maestria]. Brasil, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*
89. Ureta, A.; Álvarez, B.; Ramón, A.; Vera, M. A., Martínez-Drets, G. (1995). *Identification of Acetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum seropedicae and Herbaspirillum rubrisubalbicans using biochemical and genetic criteria. Plant Soil, vol. 172, p. 271-277.*

90. Villanueva, D., Marino, M., Fernandez-Grecco, R., Agnusdei, G. (2004). *Producción inverno – primaveral de raigrás anual: métodos de siembra y fertilización nitrogenada. Revista Argentina de Producción Animal 24(1):164-5.*
91. Villé, C., Martín, D., Berg, L., Solomon, E., (1998). *Biología de Villé. 4a edición. McGraw-Hill interamericana. México. 1305p.*
92. Yadav, R. K., Karamanoli, K. Vokou, D. (2005). *Bacterial Colonization of the Phyllosphere of Mediterranean Perennial Species as Influenced by Leaf Structural and Chemical Features. Microbial ecology 50: 185-196.*
93. Yamada, Y.; Hocino, K., Ishhikawa, T. (1998). *Gluconacetobacter nom. Corrig. (Gluconacetobacter (sci)). En: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published out side the IJSB. List no. 64. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol. 48, p. 327-328.*
94. Yang, C., Crowley, D., Boneman, J., Keen, N. (2000). *Microbial Phyllosphere Population are more complex than previously realized. Plant Pathology and Enviromental sciences. 98: No7: 3889-3894.*
95. Zambrano, E.R., Jiménez Salgado, T., Tapia Hernández, A. (2007). *Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). Lankesteriana;(71-2):322-325.*
96. Zanettini, J.L. & Puente, M. (2016). *Inoculación foliar con Azospirillum brasilense en trigo. RTA / Vol 10 / N°35*
97. Zuffo, A.M., Júnio, J.M.Z., Fonseca, W.L., Zambiazzi, E.V., de Oliveira, A.M., Guilherme, S.R., Seglin Mendes, A.E., Maia Godinho, S.H., de Oliveira Ribeiro, F., Pinto, A.R.S. (2017). *Path Analysis in Soybean Cultivars Grown under Foliar Spraying and Furrow Inoculation with Azospirillum brasilense. Journal of Agricultural Science, 9(10):137.*

## 10. ANEXOS

### 10.1. Tratamiento Estadístico- Salida Infostat

#### 10.1.1. Medidas de Resumen

- **Altura en Cm**

TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
T1	Altura en Cm	6	42,13	1,16	41,00	44,00
T2	Altura en Cm	6	48,45	2,28	45,00	51,00
T3	Altura en Cm	6	48,97	0,78	48,00	50,00
T4	Altura en Cm	6	50,33	1,21	48,90	52,00
T5	Altura en Cm	6	54,43	0,99	53,10	55,40
T6	Altura en Cm	6	50,27	0,81	48,90	51,00
T7	Altura en Cm	6	50,45	1,38	48,00	52,00

- **N° Macollos**

TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
T1	Macollos	6	2,00	0,00	2,00	2,00
T2	Macollos	6	2,00	0,00	2,00	2,00
T3	Macollos	6	3,33	0,52	3,00	4,00
T4	Macollos	6	3,33	0,52	3,00	4,00
T5	Macollos	6	4,67	0,82	4,00	6,00
T6	Macollos	6	4,50	1,38	3,00	6,00
T7	Macollos	6	4,50	1,38	3,00	6,00

- **Materia Seca – Tn/Ha**

TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
T1	Tn/Ha	6	3,33	0,18	3,11	3,58
T2	Tn/Ha	6	4,71	0,11	4,58	4,82
T3	Tn/Ha	6	4,69	0,27	4,40	5,08
T4	Tn/Ha	6	5,12	0,14	4,86	5,28
T5	Tn/Ha	6	5,12	0,16	4,88	5,37
T6	Tn/Ha	6	4,95	0,33	4,64	5,54
T7	Tn/Ha	6	5,45	0,26	5,11	5,89

#### 10.1.2. Análisis de la Varianza

- **N° Macollos**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Macollos	42	0,66	0,60	24,31

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	47,48	6	7,91	11,08	<0,0001
TRATAMIENTOS	47,48	6	7,91	11,08	<0,0001
Error	25,00	35	0,71		
Total	72,48	41			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,52530**

Error: 0,7143 gl: 35

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
T2	2,00	6	0,35 A
T1	2,00	6	0,35 A
T4	3,33	6	0,35 A B
T3	3,33	6	0,35 A B

T6	4,50	6	0,35	B
T7	4,50	6	0,35	B
T5	4,67	6	0,35	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### • Materia Seca – Tn/Ha

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Tn/Ha	42	0,91	0,89	4,60	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16,96	6	2,83	58,67	<0,0001
TRATAMIENTOS	16,96	6	2,83	58,67	<0,0001
Error	1,69	35	0,05		
Total	18,65	41			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39616**

Error: 0,0482 gl: 35

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
T1	3,33	6	0,09	A	
T3	4,69	6	0,09	B	
T2	4,71	6	0,09	B	
T6	4,95	6	0,09	B	C
T4	5,12	6	0,09		C D
T5	5,12	6	0,09		C D
T7	5,45	6	0,09		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### • Altura en Cm

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Altura en Cm	42	0,89	0,87	2,68	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	491,22	6	81,87	47,07	<0,0001
TRATAMIENTOS	491,22	6	81,87	47,07	<0,0001
Error	60,88	35	1,74		
Total	552,10	41			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,38019**

Error: 1,7393 gl: 35

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.		
T1	42,13	6	0,54	A	
T2	48,45	6	0,54	B	
T3	48,97	6	0,54	B	
T6	50,27	6	0,54	B	
T4	50,33	6	0,54	B	
T7	50,45	6	0,54	B	
T5	54,43	6	0,54		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 9.2. Prueba de Normalidad y Homogeneidad de la Varianza

### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Tn/Ha	42	4,77	0,67	0,85	<0,0001
Altura en Cm	42	49,29	3,67	0,90	0,0030

Macollos 42 3,48 1,33 0,83 <0,0001  
 Valores de ( $p > 0,05$ ) indican normalidad en las variables

## 10.1 Datos ufc/g de epífitas y endófitas en cada tratamiento

### 10.1.2. Recuento ufc/g de Epífitas en liquido de lavado sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 4 días de producida la inoculación ( $t_4$ )

EPIFITAS	TRATAMIENTOS						
	T1	T2 Az 2	T3 Az 4	T4 GI 2	T5 GI 4	T6 Az+GI 2	T7Az+GI 4
Medio de cultivo							
Azospirillum dil. $10^{-1}$	0	-	-	0	0	-	-
Azospirillum dil. $10^{-2}$	0	$6.6 \cdot 10^4$	$8.8 \cdot 10^5$	0	0	$1.8 \cdot 10^4$	-
Azospirillum dil. $10^{-3}$	0	$2.2 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^5$	0	0	$1.0 \cdot 10^4$	$6.2 \cdot 10^5$
Gluconacetobacter dil. $10^{-1}$	0	0	0	-	-	-	-
Gluconacetobacter dil. $10^{-2}$	0	0	0	-	-	-	-
Gluconacetobacter dil. $10^{-3}$	0	0	0	$6.4 \cdot 10^5$	$1.2 \cdot 10^6$	$1.1 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^6$

### 10.1.3. Recuento ufc/g de Endófitas en la suspensión del homogenado, sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 4 días de producida la inoculación ( $t_4$ )

ENDOFITAS	TRATAMIENTOS						
	T1	T2 Az 2	T3 Az 4	T4 GI 2	T5 GI 4	T6 Az+GI 2	T7Az+GI 4
Medio de cultivo							
Azospirillum Sin dil	0	$4.0 \cdot 10^2$	$8.5 \cdot 10^2$	0	0	$1.8 \cdot 10^2$	$7.2 \cdot 10^2$
Azospirillum dil. $10^{-1}$	0	$3.0 \cdot 10^2$	$4.1 \cdot 10^2$	0	0	$1.0 \cdot 10^2$	$2.0 \cdot 10^2$
Azospirillum dil. $10^{-2}$	0	0	0	0	0	0	0
Gluconacetobacter Sin dil	0	0	0	-	-	-	-
Gluconacetobacter dil. $10^{-1}$	0	0	0	$1.2 \cdot 10^3$	$8.3 \cdot 10^3$	$4.3 \cdot 10^3$	$7.2 \cdot 10^3$
Gluconacetobacter dil. $10^{-2}$	0	0	0	$2.0 \cdot 10^3$	$4.0 \cdot 10^3$	$4.1 \cdot 10^3$	$1.0 \cdot 10^3$

### 10.1.4. Recuento ufc/ g de Epífitas en liquido de lavado sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$ y $10^{-2}$ ) a los 11 días de producida la inoculación ( $t_{11}$ )

EPIFITAS	TRATAMIENTOS						
	T1	T2 Az 2	T3 Az 4	T4 GI 2	T5 GI 4	T6 Az+GI 2	T7Az+GI 4
Medio de cultivo							
Azospirillum dil. $10^{-1}$	0	$2.0 \cdot 10^2$	$6.5 \cdot 10^2$	0	0	$1.4 \cdot 10^2$	$8.8 \cdot 10^2$
Azospirillum dil. $10^{-2}$	0	$2.6 \cdot 10^2$	$7.0 \cdot 10^2$	0	0	-	$3.0 \cdot 10^2$
Azospirillum dil. $10^{-3}$	0	-	-	0	0	-	0
Gluconacetobacter dil. $10^{-1}$	0	0	0	$1.1 \cdot 10^3$	$9.2 \cdot 10^3$	$1.4 \cdot 10^3$	$7.2 \cdot 10^3$
Gluconacetobacter dil. $10^{-2}$	0	0	0	$2.3 \cdot 10^3$	$2.8 \cdot 10^3$	$1.7 \cdot 10^3$	$3.3 \cdot 10^3$
Gluconacetobacter dil. $10^{-3}$	0	0	0	-	-	-	-

**10.1.5. Recuento ufc/g de Endofitas en la suspensión del homogenado, sin diluir y en diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) a los 11 días de producida la inoculación ( $t_{11}$ )**

ENDOFITAS	TRATAMIENTOS						
	T1	T2 Az 2	T3 Az 4	T4 GI 2	T5 GI 4	T6 Az+GI 2	T7Az+GI 4
Medio de cultivo							
Azospirillum dil. $10^{-1}$	0	-	-	0	0	-	$6.2 \cdot 10^3$
Azospirillum dil. $10^{-2}$	0	$1.4 \cdot 10^3$	$7.2 \cdot 10^3$	0	0	$1.7 \cdot 10^3$	$2.3 \cdot 10^3$
Azospirillum dil. $10^{-3}$	0	$1.0 \cdot 10^3$	$2.5 \cdot 10^3$	0	0	$5.0 \cdot 10^2$	$1.0 \cdot 10^3$
Gluconacetobacter dil. $10^{-1}$	0	0	0	-	-	++	-
Gluconacetobacter dil. $10^{-2}$	0	0	0	$1.1 \cdot 10^4$	$8.8 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^4$	$7.2 \cdot 10^4$
Gluconacetobacter dil. $10^{-3}$	0	0	0	$2.3 \cdot 10^4$	$5.0 \cdot 10^4$	$1.2 \cdot 10^4$	$2.2 \cdot 10^4$

## 10.2 Datos agronómicos de las repeticiones de cada tratamiento

### 10.2.1. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T1

TRATAMIENTO	T1 - Testigo					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	10,9	10,7	11,9	11,4	12,3	11,5
Peso Seco (g)	3,49	3,42	3,81	3,65	3,94	3,68
G. de Agua (g)	7,41	7,28	8,09	7,75	8,36	7,82
% Humedad	68,00%	68,00%	68,00%	68,00%	68,00%	68,00%
Tn (mat. seca)/ha	3,17	3,11	3,46	3,32	3,58	3,35
Altura (cm)	43,0	42,0	41,6	44,0	41,2	41,0
N°Macollos	2	2	2	2	2	2

### 10.2.2. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T2

TRATAMIENTO	T2 -2Lts Azospirillum					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	15,6	15,9	16,4	15,6	16,2	16,4
Peso Seco (g)	5,04	5,14	5,30	5,04	5,24	5,30
G. de Agua (g)	10,56	10,76	11,10Gr	10,56	10,96	11,10
% Humedad	67,67%	67,67%	67,67%	67,67%	67,67%	67,67%
Tn (mat. seca)/ha	4,58	4,67	4,82	4,58	4,76	4,82
Altura (cm)	45,0	49,0	50,7	51,0	48,0	47,0
N°Macollos	2	2	2	2	2	2

### 10.2.3. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T3

TRATAMIENTO	T3 -4Lts Azospirillum					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	14,2	14,3	15,0	14,9	16,4	15,9
Peso Seco (g)	4,84	4,88	5,12	5,08	5,59	5,42
G. de Agua (g)	9,36	9,42	9,89	9,82	10,81	10,48
% Humedad	65,90%	65,90%	65,90%	65,90%	65,90%	65,90%
Tn (mat. seca)/ha	4,40	4,43	4,65	4,62	5,08	4,93
Altura (cm)	48,3	49,4	48,6	49,5	50,0	48,0
N°Macollos	3	3	4	3	4	3



#### 10.2.4. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T4

TRATAMIENTO	T4 -2Lts Gluconacetobacter					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	18,4	17,4	18,5	18,9	18,2	18,6
Peso Seco (g)	5,65	5,35	5,68	5,81	5,59	5,71
G. de Agua (g)	12,75	12,05	12,82	13,09	12,61	12,89
% Humedad	69,28%	69,28%	69,28%	69,28%	69,28%	69,28%
Tn (mat. seca)/ha	5,14	4,86	5,17	5,28	5,08	5,19
Altura (cm)	51,1	52,0	50,6	48,9	50,4	49,0
N°Macollos	4	4	3	3	3	3

#### 10.2.5. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T5

TRATAMIENTO	T5 -4Lts Gluconacetobacter					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	17,5	16,7	16,5	15,9	17,0	16,5
Peso Seco (g)	5,91	5,64	5,57	5,37	5,74	5,57
G. de Agua (g)	11,59	11,06	10,93	10,53	11,26	10,93
% Humedad	66,22%	66,22%	66,22%	66,22%	66,22%	66,22%
Tn (mat. seca)/ha	5,37	5,13	5,07	4,88	5,22	5,07
Altura (cm)	55,2	55,3	53,1	54,0	53,6	55,4
N°Macollos	4	5	5	6	4	4

#### 10.2.6. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T6

TRATAMIENTO	T6 -2Lts Azospirillum+ 2Lts Gluconacetobacter					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	15,1	15,8	16,0	16,2	15,0	17,9
Peso Seco (g)	5,14	5,38	5,45	5,51	5,11	6,09
G. de Agua (g)	9,96	10,42	10,55	10,69	9,89	11,81
% Humedad	65,96%	65,96%	65,96%	65,96%	65,96%	65,96%
Tn (mat. seca)/ha	4,67	4,89	4,95	5,01	4,64	5,54
Altura (cm)	49,8	48,9	51,0	50,2	50,9	50,8
N°Macollos	6	5	6	3	4	3

#### 10.2.7. Datos agronómicos de las repeticiones del tratamiento T7

TRATAMIENTO	T7 -4Lts Azospirillum+ 4Lts Gluconacetobacter					
REPETICIONES	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Peso Húmedo (g)	17,4	17,4	16,4	18,9	17,8	17,1
Peso Seco (g)	5,96	5,96	5,62	6,48	6,10	5,86
G. de Agua (g)	11,44	11,44	10,78	12,42	11,70	11,24
% Humedad	65,73%	65,73%	65,73%	65,73%	65,73%	65,73%
Tn (mat. seca)/ha	5,42	5,42	5,11	5,89	5,55	5,33
Altura (cm)	52,0	50,9	50,7	51,2	49,9	48,0
N°Macollos	5	3	4	3	6	6