

Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase I: condiciones controladas*

The effect of inoculation with rhizospheric bacteria on two varieties of wheat. Phase1: controlled conditions

Carlos José Bécquer Granados^{1§}, Danielle Prévost², Christine Juge², Carole Gauvin² y Sandra Delaney²

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus. Apdo 2255. Z. P. 1, Sancti Spiritus, Cuba. ²Agriculture and Agri-Food Canada, Sainte-Foy Research Centre, Québec, Québec, Canada. [§]Autor para la correspondencia: pastosp@yayabo.inf.cu.

Resumen

Se llevó a cabo un experimento bajo condiciones controladas para determinar la respuesta de dos variedades de trigo a la inoculación simple y combinada realizada con *Sinorhizobium* y *Azospirillum*. Se utilizó una cepa de *A. zae*, y dos cepas pertenecientes a *S. meliloti*. Los materiales y métodos aplicados correspondieron a lo descrito en las metodologías preestablecidas en este campo de estudio. Diseño experimental: completamente aleatorizado, con 20 tratamientos y 4 réplicas. No se utilizó tratamiento fertilizado. Se evaluaron diferentes variables agronómicas, relacionadas con la arquitectura radical y la biomasa aérea. Análisis de varianza bifactorial. En caso de aparecer diferencias, se aplicó análisis de varianza de un factor a la interacción en primera instancia, o a los factores probados. Diferencias entre medias por LSD de Fisher. Se transformaron datos de conteo de dígitos por \sqrt{x} . Se calculó correlación y regresión múltiple entre variables. Se concluye que la inoculación combinada de *Sinorhizobium* con *Azospirillum*, así como la inoculación simple con *Sinorhizobium*, resultaron de alta importancia en las alternativas de inoculación que se realizaron en el experimento. Existió una alta diferenciación entre las dos variedades de trigo en determinadas variables agronómicas, lo que indica una influencia marcada de las características

Abstract

The experiment was carried out under controlled conditions to determine the response of the two wheat varieties to the simple inoculation and the combined inoculation which was carried out with *Sinorhizobium*, and *Azospirillum*. A strain of *A. zae* and two strains belonging to *S. meliloti* were used. The materials and methods that were applied corresponded to what was described in the already established methodologies in this field of study. Experimental design: completely randomized, with 20 treatments and 4 replicas. Fertilizing treatment was not used. Different Agronomic variables were evaluated, related to the radical architecture and the biomass area. Analysis of the biofactorial variance. In the event that differences appeared, the variance analysis of a factor of first instance interaction or of approved factors was applied. Differences between methods by LSD of Fisher. Count data of digits by \sqrt{x} were transformed. The correlation and multiple regressions between variables were calculated. It is concluded that the combined inoculation of *Sinorhizobium* with *Azospirillum*, just like the simple inoculation with *Sinorhizobium* resulted to be of high importance in the inoculation alternatives that were carried out in the experiment. There was a great difference between the two wheat varieties in certain agronomical variables,

* Recibido: diciembre de 2011
Aceptado: julio de 2012

varietales de las plantas. Se observó una fuerte relación estadística entre las variables peso seco aéreo y variables de la raíz para los tratamientos inoculados con A2 y A2+N7, respectivamente.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, cepas, inoculación combinada, variedades,

Introducción

El efecto positivo de las bacterias rizosféricas, en plantas no pertenecientes a la familia de las leguminosas, como las gramíneas, es un hecho científico demostrado por diferentes autores (Chabot *et al.*, 1996; Antoun y Prévost, 2005; Anya *et al.*, 2009). La primera zona del vegetal que comúnmente enfrenta la colonización de dichas bacterias está constituida por las raíces, y al respecto, varios autores (Harari *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1989) demostraron que la inoculación con *Azospirillum brasilense* incrementa la longitud de la raíz, número de raíces secundarias y de pelos radiculares en plantas de trigo.

Entre las bacterias con efecto estimulador del crecimiento vegetal, *Azospirillum* constituye una de las más prometedoras, ya que esta bacteria coloniza la rizosfera de numerosos cultivos en zonas tropicales y subtropicales. Diferentes mecanismos, como la producción de fitohormonas, reducción de nitratos, y la fijación del dinitrógeno, se le han atribuido a la misma para explicar su efecto positivo en las plantas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En el presente trabajo se utilizó una cepa de *A. zea* conocida por incrementar el rendimiento de maíz en experimentos de campo (Mehnaz *et al.*, 2010). Aunque no se cuenta con antecedentes de inoculación de *A. zea* en trigo, los datos obtenidos en maíz se consideran muy promisorios también para otros cereales, además del hecho a tomar en cuenta de que esta especie es de más rápido crecimiento que otras especies de *Azospirillum* (Lazarovits, George, com. pers.).

Otros géneros bacterianos, como los rizobios, pueden colonizar no sólo las raíces de las leguminosas, sino también las de plantas pertenecientes a otras familias. Según Matiru y Dakora (2003), la infección rizobiana en dichas especies probablemente sea más común en la naturaleza que lo que se consideraba anteriormente. Según Dakora (2003), los rizobios producen diversos metabolitos como auxinas, citoquininas, riboflavinas y vitaminas, las cuales pueden

which indicates a marked influence of the varietal characteristics of the plants. A strong statistical relation was observed between the variables dry air weight and the root variables for the treatments of inoculation with A2 y Av2+N7, respectively.

Key words: *Triticum aestivum* L., strains, combined inoculation, varieties.

Introduction

The positive effect of the rhizospheric bacteria on plants not belonging to the leguminous family, like the gramineas, is a scientific fact shown by different authors (Chabot *et al.*, 1996; Antoun y Prévost, 2005; Anya *et al.*, 2009). The first zone of vegetables that commonly confront the colonization of said bacteria is constituted by the roots, and with respect to this, various authors (Harari *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1989) demonstrated that the inoculation with *Azospirillum brasilense* increases the length of the root, number of secondary roots, and root hairs of the wheat plant.

Amongst the bacteria with a growth stimulation effect of the vegetable, *Azospirillum* constitutes as one of the more promising, as this bacteria colonizes the rhizospheric of many cultures in tropical and subtropical zones. Different mechanisms, like the production of phyto-hormones, reduction of nitrates and the fixation of dinitrogen, has been equally attributed to explain the positive effect in plants (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). In the current research, a strain of *A. zea* that is known for increasing the yield of corn in field investigations, was used (Mehnaz *et al.*, 2010). Even though there are no precedents of inoculation in wheat with *A. zea*, the data from corn is considered very promising for other cereals, apart from the fact that this species is more rapidly growing than other species of *Azospirillum* (Lazarovits, George, Com. Pers.).

Other bacterial genus, like the rhizobias, can colonize not only the roots of the leguminous plants, but also plants belong to other families. According to Matiru and Dakora (2003), the infection of rhizobial en said species is probably more common in nature than what was previously thought. According to Dakora (2003), the rhizobias produce diverse metabolites likes auxins, cytokinins, riboflavins, and vitamins, all of which can act as vegetable growth promoting substances. In the present

actuar como sustancias promotoras del crecimiento vegetal. En el presente experimento se utilizaron dos cepas de *Sinorhizobium meliloti*, el cual se conoce como altamente eficiente por su efecto estimulador del crecimiento vegetal en trigo bajo condiciones de campo de Sancti Spiritus, Cuba (Bécquer *et al.*, 2007; Bécquer *et al.*, 2008).

Por otra parte, se conocen trabajos sobre la coinoculación con bacterias pertenecientes a diferentes géneros, capaces de producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y de lograr un efecto positivo en diversos cultivos de forma sinérgica (Carolina y Lorda, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009).

Es por ello que el objetivo general de esta investigación se centró en determinar la influencia de la inoculación simple y combinada con *Azospirillum* y *Sinorhizobium*, en la arquitectura radical y en la biomasa aérea de plántulas de trigo, cultivadas bajo condiciones controladas.

Materiales y métodos

Procedencia de la cepa de *Azospirillum*: se utilizó la cepa N7, perteneciente a *Azospirillum zeae* y donada por Agriculture and Agri-Food Canada (London).

Procedencia de las cepas de rizobios: se utilizaron las cepas A2 y NRG34, pertenecientes a *Sinorhizobium meliloti* y donadas por Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Varietades de trigo y procedencia: se evaluaron las variedades de trigo (*Triticum aestivum*): Barrie y Hoffman, donadas por Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Procedimiento experimental: se efectuó acorde a metodologías de evaluación de leguminosas (Somasegaran y Hoben, 1994) ya que no se tenían antecedentes para experimentos con cereales: todas las cepas crecieron en medio sólido Levadura-Manitol (Vincent, 1970) y se resuspendieron en medio líquido Levadura-Manitol hasta lograr una concentración de células viables de 10^7 - 10^8 UFC/mL. Se utilizaron bolsas estériles que se sembraron inicialmente con 4-5 semillas y se les añadió 25 mL de la solución nutritiva Hoagland (Prévost *et al.*, 1987). Las plantas fueron raleadas hasta dejar 1 planta por bolsa, a los tres días de siembra. Posteriormente se aplicó el inóculo bacteriano en cantidad de 1 mL/semilla, el cual

experiment, two strains of *Sinorhizobium meliloti* were used, which is known to be highly efficient for its effect in stimulating vegetable growth in wheat under field conditions in Sancti Spiritus, Cuba (Bécquer *et al.*, 2007; Bécquer *et al.*, 2008).

On the other hand, it is known from other investigations that co-inoculation with bacteria belong to different genera are able to produce substances that stimulate vegetable growth and obtain a positive effect in diverse cultigens in a synergistic form (Carolina y Lorda, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009).

It is because of this, that the general objective in this investigation was centered on determining the influence of the simple inoculation and the combined inoculation with *Azospirillum* and *Sinorhizobium*, in the root architect and in the biomass area of the wheat seedlings, cultivated under controlled conditions.

Materials and methods

Origin of the *Azospirillum* strain: the N7 strain was used, belonging to *Azospirillum zeae* and donated by Agriculture and Agri-Food Canada (London).

Origin of the *Rhizobia* strain: the A2 and NRG34 strains, belonging to *Sinorhizobium meliloti* and donated by Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Varieties of wheat and the origin: The varieties of wheat (*Triticum aestivum*) were evaluated: Barrie and Hoffman, donated by Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Experimental procedure: It was carried out according to the methodologies of leguminous evaluations (Somasegaran and Hoben, 1994), as there were no precedent for experiments done with cereals: all of the strains grew in medium-solid Yeast Manitol (Vincent, 1970) and were suspended in medium liquid Yeast-Manitol until a concentration of viable cells (10^7 - 10^8 UFC/mL) was reached. Sterile bags were used that were initially plant with 4-5 seedlings and then 25ml of the nutritive Hoagland solution was added (Prévost *et al.*, 1987). The plants were thinned until there was one plant per bag at day three of planting. Afterwards, the bacterial inoculums were applied at a quantity of 1 mL/seed, which originally presented a cellular concentration

originalmente presentaba una concentración celular de 10^7 - 10^8 UFC/mL y diluido en proporción de 1:10 mediante una solución salina estéril (0.85% NaCl). Las plantas crecieron en una cámara de condiciones controladas, sometidas a un régimen de periodicidad luminosa de 16 h-luz ($300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) a 26°C durante el día y 22°C durante la noche.

La humedad relativa fue ajustada a 75/85% (Somasegaran y Hoben, 1994). La cosecha y evaluación fueron realizados a las tres semanas de siembra con la utilización de técnicas de evaluación agronómicas convencionales para ensayos bajo condiciones controladas (Somasegaran y Hoben, 1994), así como con un escáner LA2400 y el programa computarizado WinRHIZO (Regent Instruments Canada), para la medición de las variables longitud promedio de las raíces, diámetro promedio de las raíces y número de raíces laterales.

Diseño experimental y análisis estadístico: se usó un diseño experimental bifactorial, completamente aleatorizado, con el objetivo de evaluar dos variedades (Hoffman y Barrie), con 6 tipos de inoculaciones diferentes, un control absoluto (no-inoculado) y 4 réplicas (Somasegaran y Hoben, 1994). Factor 1: Inoculación. Factor 2: variedad. Para cada variedad de trigo, se aplicaron los siguientes tratamientos: control absoluto (no-inoculado), NRG34, A2, N7, NRG34+N7, A2+N7 (factor inoculación). Los datos fueron estadísticamente procesados con el uso de análisis de varianza bifactorial y modelos generales lineales, mediante el programa estadístico MINITAB (MINITAB Inc., v.13 para Windows). Las medias se compararon mediante LSD de Fisher ($p < 0.001$). En el caso de las variables longitud del tallo y diámetro promedio de la raíz, al aplicar el análisis de varianza, se observaron diferencias solo para el factor variedad, por ello se aplicó la prueba t-Student para varianzas iguales. Se localizó el análisis de correlación entre diámetro promedio de la raíz y longitud promedio de la raíz, así como regresión múltiple para describir el posible impacto de factores concernientes a la parte radical de la planta sobre la biomasa aérea (Ostle, 1984). Se evaluaron las variables: peso seco aéreo (g/planta), peso seco radical (g/planta), longitud del tallo (cm), longitud promedio de las raíces (cm), diámetro promedio de las raíces (mm) y número de raíces laterales/planta.

Resultados y discusión

En el análisis de varianza, se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) para el factor variedad.

of 10^7 - 10^8 UFC/mL diluted in proportion of 1:10 by means of sterile salt solution (0.85% NaCl). The plants grew in a plant bed with controlled conditions, submitted to a regime of periodic light of 16 h-luz ($300 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) at 26°C during the day and 22°C during the night.

The relative humidity was adjusted to 75/85% (Somasegaran and Hoben, 1994). The harvest and evaluations were completed at three weeks of planting with the use of conventional agronomic evaluation techniques for trials under controlled conditions (Somasegaran and Hoben, 1994), as well as with a scanner LA 2400 and the computerized program WinRHIZO (Regent Instruments Canada), for the measurement of the variables: average length of roots, average diameter of the roots, and the number of lateral roots.

Experimental design and statistical analysis: a completely randomized bifactorial experimental design was used with the objective to evaluate two varieties (Hoffman and Barrie), with 6 types of different inoculations: an absolute control (not inoculated) and 4 replicas (Somasegaran and Hoben, 1994). Factor 1: inoculation. Factor 2: variety. For each variety of wheat, the following treatments were applied: absolute control (no inoculation), NRG34, A2, N7, NRG34+N7, A2+N7 (inoculation factor). The data was statistically processed with the use of two-factorial variant analysis and general line models, by means of the statistical program MINITAB (MINITAB Inc, v 13 for Windows). The measurements were compared by means of LSD of Fisher ($p < 0.001$). In the case of the variables length of stem and average diameter of the root, upon applying a variance analysis, differences were observed only for the variety factor- for which the t- test for equal variances was applied. The correlation analysis between average diameter and average length of the root was formed, was applied along with multiple regression to determine the possible impact of factors concerning the root part of the plant above the biomass area (Ostle, 1984). The variables were evaluated: dry air weight (g/plant), dry root weight (g/plant), length of stem (cm), length of average roots (cm), average diameter of the roots (mm) and the number of lateral roots/ plant.

Results and discussion

In the variance analysis, there were significant differences ($p < 0.001$) observed for the variety factor.

En el Cuadro 1 se observó que para longitud del tallo existieron diferencias significativas entre variedades ($p < 0.001$), donde Hoffman presentó los más altos valores (3.62 cm). También esta misma variedad presentó valores estadísticamente superiores ($p < 0.001$) en peso seco radical, con 0.034 g/planta. El diámetro promedio de las raíces fue, así mismo, superior en Hoffman, con 0.46 mm.

En table 1, it was observed that for the length of the stem, there were significant differences ($p < 0.001$), where Hoffman presented the highest values (3.62 cm). Also, this same variety presented statistically superior values ($p < 0.001$) in dry root weight, with 0.034 g/plant. The average diameter of the roots was, as well, superior in Hoffman with 0.46 mm.

Cuadro 1. Resultados del factor variedad con las variables longitud del tallo, peso seco radical, diámetro promedio de las raíces y número de raíces laterales.

Table 1. Results of the variety factor with the variables: length of stem, dry rot weight, average diameter of the roots, and nub of lateral roots.

Tratamientos	Longitud del Tallo (cm)	Peso Seco Radical (g/planta)	Diámetro Promedio de las Raíces (mm)	Número de Raíces Laterales (un/planta)	
				Valores transformados, \sqrt{x}	Valor original
Hoffman	3.62a	0.034a	0.45a	17.36a	302
Barrie	3.02b	0.024b	0.40b	16.15b	262
C.V., %	13.21	17.59	0.01	1.33	
Significación	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	

¹Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Diferencias por T-Student.

Con respecto al número de raíces laterales, la variedad Hoffman resultó estadísticamente superior ($p < 0.05$), con 17.36 un/planta (valores transformados).

With respect to the number of lateral root the Hoffman variety resulted statistically superior ($p < 0.05$), with 17.36 un/plant (transformed values).

Si tenemos en cuenta la superioridad estadística de la variedad Hoffman en estas variables, pudiéramos inferir que existió una alta diferenciación entre los representantes de las dos variedades. Esta diferencia de significación estadística pudiera indicar una influencia marcada del genotipo vegetal en determinadas variables agronómicas de la planta. Döbbelaere *et al.* (2002) y Pecina-Quintero *et al.* (2005) consideraron que la respuesta de la planta a la inoculación depende de factores diversos, como los componentes físico-químicos del suelo, genotipo de la planta y microflora autóctona del suelo. Aunque el presente experimento se realizó bajo condiciones controladas, es obvio notar que el genotipo de las plantas marcó diferencias en los resultados de algunas variables. Askary *et al.* (2009) encontraron que la coinoculación de trigo con *Azospirillum brasilense* y *Sinorhizobium meliloti* influyó favorablemente en determinados parámetros de crecimiento de la planta, pero que esos resultados dependieron también de las variedades de trigo utilizadas.

If we take into account the statistical superiority of the Hoffman variety in these variables, we could infer that there existed a great difference between the representatives of the two varieties. This difference of statistical significance could indicate a marked influence of plant genotype in certain agronomical variables of the plant. Döbbelaere *et al.* (2002) and Pecina-Quintero *et al.* (2005) considered that the plant response to the inoculation depends on diverse factors, like physical-chemical components of the soil, genotype of the plant, and native micro-flora of the soil. Even though the present experiment was carried out under controlled conditions, it is obvious to note that the plant genotype was responsible for differences in the results of the some variables. Askary *et al.* (2009) found that in co-inoculation, the wheat with *Azospirillum brasilense* y *Sinorhizobium meliloti* favorably influenced certain parameters for growth in the plant, but that these results also depended on the varieties of wheat that was used.

Como complemento sólido a las observaciones anteriores, se pueden considerar los resultados obtenidos en la combinación de los factores variedad e inoculación con las

As a solid compliment to the previous observations, the obtained results can be considered, in combination with the varietal factors and inoculation with the variables, number

variables número de raíces laterales (Cuadro 2), donde la interacción entre estos dos factores en el análisis de varianza mostró una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$).

Los valores estadísticamente más altos se encontraron entre el tratamiento Hoffman+A2 (18.55), seguido por el tratamiento Barrie+NRG34+N7 (18.13) y Hoffman-Control (17.87), tratamientos que entre ellos compartieron letras comunes. A su vez, Hoffman+A2 fue superior al resto de los tratamientos, excepto a los anteriormente mencionados. El hecho de que Hoffman-Control compartiera letras comunes con los tratamientos que resultaron estadísticamente superiores, puede deberse precisamente, a la influencia notable del factor variedad en algunas variables, como en el número de raíces laterales, ya visto en el Cuadro 1. Es de destacar que fue precisamente la combinación de NRG34+N7, lo que permitió obtener resultados superiores en Barrie, mientras que la misma combinación en Hoffman (16.86), situó estadísticamente a esta variedad muy por debajo de los dos primeros tratamientos (Cuadro 2). Es posible que para la variable estudiada, la cepa NRG34 ejerciera mayor efecto en la planta que A2, a pesar de pertenecer ambas al mismo género y especie (*Sinorhizobium meliloti*). Esa influencia de la bacteria en la planta, al parecer responde a variaciones en la secreción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal a un nivel interespecífico. Según Biswas *et al.* (2000), la inoculación con determinadas cepas de rizobios puede inducir un número mayor de pelos radicales y raíces laterales en arroz, lo cual favorece, por lo tanto, una mayor extracción de nutrientes por la planta.

El factor inoculación presentó diferencias significativas ($p < 0.005$) en el análisis de varianza para las variables peso seco aéreo, longitud promedio de la raíz, diámetro promedio de la raíz y número de raíces laterales.

Se observó que en peso seco aéreo existieron diferencias significativas ($p < 0.005$) con valores superiores en los tratamientos A2 (0.036 g/planta) y A2+N7 (0.036 g/planta), con respecto al control absoluto (0.029 g/planta). Asimismo, existieron incrementos de 24.14% en esos dos tratamientos, en comparación con el control absoluto (Cuadro 3). Hilali *et al.* (2001) informaron aumentos de 24% en el peso seco aéreo de trigo sembrado en Arcilla Merchouch, al inocularlo con *Rhizobium leguminosarum*. Askary *et al.* (2009) aseguraron que la coinoculación de trigo con *A. brasilense* y *S. meliloti* ejerció mayor efecto en el rendimiento y contenido de macroelementos de la planta, que las inoculaciones simples con esas mismas bacterias. Bonilla *et al.* (2009) dieron a

of lateral roots (Table 2), that where the interaction between these two factors in the variance analysis highly significant difference ($p < 0.001$) was shown.

Cuadro 2. Resultados de ANOVA (LSD de Fisher) de la interacción entre dos factores (variedad x inoculación) en la variable número de raíces laterales.

Table 2. Results of ANOVA (LSD of Fisher) of the interaction between two factors (variety vs. inoculation) in the variable number of lateral roots.

Tratamientos	Número de Raíces Laterales (un/planta)	
	Valores transformados, \sqrt{x}	Valores originales
Hoffman+A2	18.55 ^a	344
Hoffman+A2+N7	17.34 ^{bcd}	319
Hoffman+N7	16.75 ^{de}	281
Hoffman+NRG34	16.82 ^{cde}	283
Hoffman+NRG34+N7	16.86 ^{cde}	285
Hoffman-Control	17.87 ^{abc}	319
Barrie+A2	16.45 ^{de}	271
Barrie+A2+N7	15.88 ^e	252
Barrie+N7	16.49 ^{de}	272
Barrie+NRG34	16.38 ^{de}	270
Barrie+NRG34+N7	18.13 ^{ab}	334
Barrie-Control	13.55 ^f	184
C.V., %	2.37	
Significación	$p < 0.001$	

¹Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Diferencias por LSD de Fisher

The values that are distinctively higher were found amongst the treatment Hoffman+AS (18.55), followed by the Barrie+NRG34+N7 (18.13) treatment, and then, the Hoffman-Control (17.87), treatments between those shared common letters. In turn, Hoffman+A2 was superior to the rest of the treatments, except to those previously mentioned. The fact the Hoffman-Control shared common letters with the treatments that resulted in statistically superior, could be precisely because of the notable influence of the variety factor in some of the variables, like in the number of lateral roots that was seen in Table 1. It should be emphasized that it was precisely the combination of NRG34+N7, that yielded such superior results in Barrie. Meanwhile the same combination in Hoffman (16.86) put this variety statistically lower than the other two treatments (Table 2). It is possible that the studied variable, the NRG34 strain, exercised a greater effect in the plant than A2, despite that the two belonged to the same genus and species (*Sinorhizobium*

conocer resultados que fueron estadísticamente superiores en la biomasa aérea de maíz y sorgo coinoculados con *Azospirillum* y *Azotobacter*, en condiciones de invernadero.

meliloti). That influence of bacteria in the plant seemed to respond to variations in the secretion of substances that are plant growth stimulators at an interspecific level. According

Cuadro 3. Resultados de ANOVA del factor Inoculación con las variables peso seco aéreo, longitud promedio de la raíz, diámetro promedio de las raíces y número de raíces laterales.

Table 3. Results of ANOVA of the Inoculation factor with the variables dry air weight, average length of the root, average diameter of the root and number of lateral roots.

Tratamientos	Peso Seco Aéreo (g/ planta)	Incremento del PSA (%) con respecto al control absoluto	Longitud Promedio de las Raíces (cm)	Diámetro Promedio de las Raíces (mm)	Número de Raíces Laterales (un/planta)	
					Valores transformados, \sqrt{x}	Valor original
A2	0.036 a	124.14	185.63 a	0.42 c	17.50a	306
A2+N7	0.036 a	124.14	184.33 a	0.41 c	16.61ab	276
N7	0.034 ab	117.24	176.69 b	0.43 ab	16.62ab	276
NRG34	0.033 ab	106.45	160.59 bc	0.46 ab	16.60ab	276
NRG34+N7	0.031 ab	106.90	176.48 b	0.43 ab	17.49a	306
Control	0.029 b		152.36 c	0.45 a	15.71b	247
C.V., %	10.45		11.79	11.86	16.76	
Significación	$p < 0.05$		$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	

¹Valores con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales. Diferencias por LSD de Fisher.

Por otra parte, en longitud promedio de las raíces se observó que los tratamientos A2 (0.036 g/planta) y A2+N7 (0.036 g/planta) también resultaron estadísticamente superiores ($p < 0.005$) al resto de los tratamientos (Cuadro 3). Estos resultados pudieran explicarse por el efecto de las fitohormonas segregadas por estas cepas con una influencia directa en el desarrollo radical, con énfasis en el alargamiento longitudinal. La producción de la auxina indol-3-acido acético (AIA), está reconocida como un factor importante en las habilidades directas de *Azospirillum brasilense* en su efecto promotor del crecimiento vegetal (Döbbelaere *et al.*, 2001). Asimismo, Ilyas y Bano (2010) encontraron que la inoculación de trigo con *A. brasilense* desarrolló el sistema radical con mayor longitud de las raíces, mayor número de raíces laterales y mayor alargamiento de los pelos radicales, y se correlacionaron las cepas más eficientes con las de mayor producción de fitohormonas. Existen evidencias que los rizobios pueden ejercer un efecto positivo en el alargamiento del sistema radical en arroz (Biswas *et al.*, 2000). Si tenemos en cuenta que la coinoculación de cultivos con el empleo de diferentes géneros bacterianos ha conllevado a efectos positivos (Tejeda *et al.*, 2009), resulta lógico inferir que en la actual variable que se analiza, la combinación de cepas antes mencionada ejerciera el mayor efecto sinérgico.

to Biswas *et al.* (2000), the inoculation with certain rhizobe strains can lead to greater number of root hairs and lateral roots in rice, which therefore favors a greater extraction of nutrients for each plant.

The inoculation factor presents significant differences ($p < 0.005$) in the variance analysis for the variables dry air weight, average length of the root, average diameter of the root, and number of lateral roots.

It was observed that in the dry air weight, there were significant differences ($p < 0.005$) with superior values in the A2 (0.036 g/plant) of A2+N7 (0.036 g/plant) treatment, with respect to the absolute control (0.029 g/plant). Also, there were in increases of 24.14% in these two treatments, in comparison to the absolute control (Cuadro 3). Hilali *et al.* (2001) reported increases of 24% in dry air weight of wheat planted in Arcilla Merchouch, upon inoculating with *Rhizobium leguminosarum*. Askary *et al.* (2009) claimed that co-inoculation of wheat with *A. brasilense* y *S. meliloti* exercised a greater effect on the yield and contained macro-elements of the plant, as the simple inoculations with the same bacteria. Bonilla *et al.* (2009) revealed results that were statistically superior in biomass area of maize and sorghum that were co-inoculated with *Azospirillum* y *Azotobacter* under greenhouse conditions

Sin embargo, en diámetro promedio de las raíces, el control absoluto (0.45 mm) fue estadísticamente superior ($p < 0.005$) a los tratamientos inoculados A2 (0.42 mm) y A2+N7 (0.41 mm), aunque presentó letras comunes con el resto de los tratamientos (Cuadro 2). Este resultado pudiera deberse a que la acción de las auxinas, supuestamente segregadas por las bacterias inoculadas, está primariamente encaminada al alargamiento celular y no al de la multiplicación celular (Fruton y Simmonds, 1963). A tal efecto, el análisis de correlación realizado entre diámetro promedio de las raíces y longitud promedio de las raíces (-0.91), indica una interrelación negativa entre éstas. Por otra parte, Vázquez y Torres (1981) plantearon que las auxinas, al realizar cambios en la plasticidad de la pared celular, primero provocan el alargamiento de la misma, y posteriormente, su engrosamiento.

Se observó que el número de raíces laterales fue estadísticamente superior ($p < 0.005$) en A2 (307.50 un/planta) y NRG34+N7 (17,49 un/planta), con respecto al control absoluto (15.71 un/planta) y presentó superíndices comunes con el resto de los tratamientos (Cuadro 3). El valor estadísticamente más bajo correspondió al control absoluto (251.91 un/planta).

En el presente experimento, la inoculación simple con *Azospirillum* no arrojó resultados estadísticamente superiores en ninguna de las variables estudiadas, pero sí lo mostró en la aplicación simple de *Sinorhizobium*, o en la combinación de los dos géneros bacterianos. Yanni *et al.* (2001) afirmaron que los rizobios pueden inducir cambios en el sistema radicular, en cuanto a número de raíces, entre otras variables. Según Biswas (1998), la inoculación con rizobios con capacidad de promover el crecimiento vegetal, conlleva a cambios morfológicos en las raíces, especialmente en número, diámetro y longitud de las mismas. Torres *et al.* (2003) encontraron que en *Phaseolus vulgaris*, los tratamientos coinoculados con *A. brasilense* y *Rhizobium leguminosarum*, presentaron mayor número de raíces laterales. Como se evidencia de estos resultados, la presencia de *Sinorhizobium* en las combinaciones realizadas, fue un factor importante en el efecto positivo de la inoculación sobre la planta.

Al efectuar un análisis de regresión múltiple para los tratamientos inoculados, donde se tomó como variable dependiente (Y) la variable peso seco aéreo, y como variables independientes (X_1 , X_2 y X_3) a longitud promedio de las raíces, diámetro promedio de las raíces y número de raíces laterales, se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.80$ ($p <$

On the other hand, in the average root length, it was observed that the A2 (0.036 g/plant) y A2+N7 (0.036 g/plant) treatments also resulted statistically superior ($p < 0.005$) to the rest of the treatments (Table 3). These results could explain the effect of the segregated phytohormones by these strains with a direct influence in the root development and with emphasis on the longitudinal elongation. The production of the auxin indole-3-acetic acid (ALA) is known as an important factor in the direct ability of *Azospirillum brasilense* in its promoting effect of plant growth (Dobbelaere *et al.*, 2001). Also, Ilyas y Bano (2010) found that inoculation of wheat with *A. brasilense* developed the root system with greater length of the roots, a larger number of lateral roots and, greater length of the root hairs; the most efficient strains were also correlated with the greater production of phyto-hormones. There is evidence that rhizobes can have a positive effect on the lengthening of the root system in rice (Biswas *et al.*, 2000). If we take into account the co-inoculation of the crops with the example of different genera of bacteria that have led to positive effects (Tejeda *et al.*, 2009), it results logically inferior than the actual variable that is being analyzed, the combination of strains previously mentioned that have had a greater synergetic effect.

However, the average diameter of the roots, the absolute control (0.45 mm) was statistically superior ($p < 0.005$) to the inoculated A2 (0.42 mm) y A2+N7 (0.41 mm) treatments, even though common letters in the rest of the treatment (Table 2). This result could be because of the actions of the auxins, supposedly segregated by inoculated bacteria that are primarily aimed at cell lengthening and not at cellular multiplication (Fruton y Simmonds, 1963). For this purpose, the correlation analysis that was realized with average diameter of the roots and average length of the roots (-0.91), indicated a negative interrelation in the plasticity of the cellular wall, first provoking the lengthening itself and then, afterwards, or the thickening.

It was observed that the lateral root number was statistically superior ($p < 0.005$) in A2 (307.50 un/plant) y NRG34+N7 (17,49 un/plant), with respect to the absolute control (15.71 un/plant) and presented common super-indices with the rest of the treatments (Chart 3). The lowest statistical value corresponded to the absolute control (251.91 un/plant).

In the present experiment, the simple inoculation with *Azospirillum* did not show statistically superior results in any of the studied variables but rather showed in the

0.001), el cual hace inferir de que en general, la aplicación de los inóculos, de forma simple o combinada, fue capaz de influir en el desarrollo de la biomasa aérea, a partir del desarrollo del sistema radical. Al respecto, los autores del presente trabajo tomaron como fundamento científico, lo informado por Fallik y Okon (1999), Dalla-Santa *et al.* (2004), Mostajeran *et al.* (2002) y Wu *et al.* (2005); de que el incremento de raíces laterales y pelos radicales por la inoculación con rizobacterias, conlleva a un aumento de la superficie radical y a una mayor capacidad de absorción de nutrientes, lo que se convierte en el factor principal para el crecimiento de la planta.

Ya que los análisis de regresión siempre presuponen la intervención de errores involucrados en la medición de las variables independientes, o de factores relacionados con dichas variables, difíciles de identificar (Castillo, 2005), los autores del presente experimento sólo pueden inferir discretamente en la interpretación de los resultados obtenidos. En este trabajo se tomó en cuenta la inoculación como factor causal. Este factor indudablemente conllevó a cambios en el sistema radical, y posiblemente a variaciones en el peso seco aéreo de la planta. También es conveniente tener en cuenta que las variables independientes analizadas no presentaban una alta interrelación entre sí, o la misma fue negativa, aunque Sigarroa (1985) consideró que dichas variables no tienen necesariamente que estar no correlacionadas. Una investigación más profunda es altamente recomendable para hallar las causas específicas de las variaciones en la variable dependiente que se estudia.

Conclusiones

La inoculación combinada de *Sinorhizobium* con *Azospirillum*, así como la inoculación simple con *Sinorhizobium*, resultaron de alta importancia en las alternativas de inoculación que se realizaron en el experimento.

Existió una alta diferenciación entre las dos variedades de trigo en determinadas variables agronómicas, lo que indica una influencia marcada de las características varietales de las plantas.

Se observó una alta relación estadística entre las variables peso seco aéreo y las variables longitud promedio de la raíz, diámetro promedio de la raíz y número de raíces laterales, para todos los tratamientos inoculados de forma simple, o combinada.

simple application of *Sinorhizobium*, or in the combination of the two genera of bacteria. Yanni *et al.* (2001) affirmed that the rhizobes can induce changes in the root system, in as much as the number of roots as in the number of variables. According to Biswas (1998), the inoculation with rhizobes with the capacity to promote plant growth, leads to morphological changes in roots, especially in number, diameter, and length. Torres *et al.* (2003) found that the co-inoculation treatments for *Phaseolus vulgaris* with *A. brasilense* y *Rhizobium leguminosarum* resulted in a greater number of lateral roots. As evidences of these results, the presence of *Sinorhizobium* in the completed combinations was an important factor in the positive effect of inoculation on the plant.

To make an analysis of multiple regression for the inoculated treatments, where the variable dependent (Y) was taken as dry air weight and independent variables (X_1 , X_2 y X_3) as average root length, average root diameter, and number of lateral roots, a determination coefficient of $R^2=0.80$ ($p<0.001$) was obtained; this allows one to infer, that in general, the application of the inoculation, whether simple or combined, was capable influencing the development of the biomass area, beginning from the development of the root system. In this regard, the authors of this current research took as a scientific basis, the report of Fallik y Okon (1999), Dalla-Santa *et al.* (2004), Mostajeran *et al.* (2002) y Wu *et al.* (2005), saying that the increase in lateral roots and root hairs from the inoculation of rhizobacteria, led to an increase in the root area and a greater capacity to absorb nutrients, which converts into the principal factor for plant growth.

Now that the regression analysis always presupposes the intervention of errors involved in the measurement of the independent variables or of related factors with said variables, difficult to identify (Castillo, 2005), the authors of the present experiment could only discreetly infer the interpretation of the obtained results. In this research, the inoculation as a casual factor was taken into account. This factor, undoubtedly led to changes in the root system and possibly in the variations of dry air weight of the plant. It is also convenient to realize that the independent variables that were analyzed did not present a high interrelation between themselves nor was it negative, even though Sigarroa (1985) considered that said variables do not necessarily have to be related. A deeper exploration is highly recommended so as to find the specific causes of the variations in the dependent variable that was studied.

Agradecimientos

El autor principal agradece el apoyo de la beca concedida por el Centro de Desarrollo Internacional, Ottawa, Canadá.

Literatura citada

- Antoun, H. and Prévost, De. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. 1-34 pp. *In*: PGPR: biocontrol and biofertilization. Siddiqui, Z. A. (Ed.). 318 p.
- Anya, A. O.; Archambault, D. J.; Bécquer, C. J. and Slaski, J. J. 2009. Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies. *In*: Microbial strategies for crop improvement. M. S. Khan *et al* (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 4:287-300.
- Askary, M.; Mostajeran, A.; Amooaghaei, R. and Mostajeran, M. 2009. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5:296-307.
- Bécquer, C. J.; Salas, Ávila, U. B.; Palmero, L. Nápoles, J. A. Ulloa, L. 2007. Selección de cepas de rizobios aislados de ecosistemas ganaderos de Canadá, inoculados en trigo (*Triticum aestivum*, L.). II: Ensayo de campo. *Rev. Pastos y Forrajes*. 30:221-228.
- Bécquer, C. J.; Salas, Ávila, U.; Palmero, L. A.; Nápoles, J. A.; Ulloa, L. 2008. Selección de cepas de rizobios aisladas de ecosistemas ganaderos de Cuba, inoculadas en trigo (*Triticum aestivum* L.). *Rev. Pastos y Forrajes*. 31:63-72.
- Biswas, J. C. 1998. Effect of nitrogen fixing bacteria on growth promotion of lowland rice (*Oryza sativa* L.). PhD Thesis. Los Baños, Dep. Of Soil Sci., Univ. of Philippines.
- Biswas, J. C.; Ladha, J. K. and Dazzo, F. B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sc. Soc. of America J.* 64:1644-1650.

Conclusions

The combined inoculations of *Sinorhizobium* with *Azospirillum*, as well as the simple inoculation with *Sinorhizobium* resulted as being highly important in the alternatives of inoculation that was carried out in the experiment.

There was a great difference between the two wheat varieties in certain agronomic variables, which indicates a marked influence of the varietal characteristics of the plants.

A high statistical relationship between the variables dry air weight and the variables average root length, average root diameter and number of later roots was observed for all the inoculated treatments, whether simple or combined.

End of the English version



- Bonilla, Ruth; Roncallo, B.; Barros, J. y Murillo, J. 2009. Producción de fertilizantes biológicos a partir de microorganismos nativos del genero *Azospirillum* sp. para mejorar la productividad y sostenibilidad de gramíneas en suelos del Valle del Cesar. Informe Técnico Final de Proyecto. CORPOICA, Bogotá, Colombia. 46 p.
- Carolina, R. y Lorda, G. 2009. Producción de inoculantes mixtos: desarrollo de procesos fermentativos para el cultivo conjunto de *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas fluorescens*. Memorias XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba. 232 p.
- Castillo, J. J. 2005. Modelos ecuacionales de regresión. *In*: Econometría. Primera Parte. Ed. Felix Varela. 597 p.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W. y Beauchamp, Chantal. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2767-2772.
- Dalla Santa, O. R.; Hernández, R.F.; Alvarez, G. L.; Junior, M. and Soccol, C. R. 2004. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(6):843-850.
- Dakora, F. D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* 158:39.

- Döbbelaere, S. A.; Croonenborghs, A.; Thys, D.; Ptacek, J.; Vanderleyden, P. and Okon, Y. 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. Soils*. 36:284-297.
- Döbbelaere, S., A.; Croonenborghs, A.; Thys, D.; Ptacek, J.; Vanderleyden, P.; Dutto, C.; Labandera-Gonzalez, J.; Caballero-Mellado, J.; Francisco Aguirre, Y.; Kapulnik, S.; Brener, S.; Burdman, D.; Kadouri, S.; Sarig, and Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:871-879.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1999. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28:123-126.
- Fruton, J. S. and Simmonds, S. 1963. *General Biochemistry*. 2da Edición. Instituto del Libro. 1077 p.
- Hilali, A.; Prévost, Danielle; Broughton, W. J. and Antoun, H. 2001. Effects de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Can. J. Microbiol.* 47:590-593.
- Harari, A.; Kigel, J. and Okon, Y. 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant Soil*. 110:275-282.
- Ilyas, N. and Bano, A. 2010. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 46:393-406.
- Lazarovits, G. Com. Pers. Agriculture and Agri-Food Canada, London, Ontario, Canada.
- Martin, P.; Glatzle, A.; Kolb, W.; Omay, H. and Schmidt, W. 1989. N₂-fixing bacteria in the rhizosphere: quantification and hormonal effects on root development. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152:237-245.
- Matiru, V. and Dakora, F. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3:1-7.
- Mehnaz, S.; Kowalik, T.; Reynolds, B. and Lazarovits, G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biol. & Biochem.* 42:1848-1856.
- Mostajeran, A., Amooaghaie, R. and Emtiazi, G. 2002. Root hair density and deformation of inoculated roots of wheat cultivars by *Azospirillum brasilense* *Azospirillum/Trichoderma*: the effects on dry bean and role of IAA in this phenomenon. *Iranian Biol. J.* 13:18-28.
- Ostle, B. 1984. *Estadística aplicada*. Ed. Científico Técnica. 629 p.
- Pecina-Quintero, V.; Diaz-Franco, A.; Williams-Alanis, H.; Rosales-Robles, E. y Garza-Cano, I. 2005. Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en Sorgo. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:389-392.
- Prévost, D.; Bordeleau, L. M.; Caudry-Reznick, Sculman, H. M. and Antoun, H. 1987. Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the Canadian high arctic: *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydelliana*, and *Oxytropis arctobia*. *Plant and soil*. 98:313-324.
- Rodríguez, J.; Tejada, G.; Fresneda, J.; Mesa, E. A.; Ortega, M.; García, A.; Soca, U.; Cañizares, K.; Martínez-Viera, R.; Ríos, Y. y Fey, L. 2009. Aplicación de DIMABAC: bioproducto mixto con efectividad biocontrol sobre Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y Zanahoria (*Daucus carota* L.). *Memorias XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*. La Habana, Cuba. 223 p.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y diseño experimental*. Ed. Pueblo y Educación. 793 p.
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag. New York. 450 p.
- Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.
- Tejada, G.; Rodríguez, J.; García, R.; Dibut, B.; Martínez-Viera, R.; Ríos, Y.; Socas, U.; Ortega, M.; Pérez, R.; Mesa, E.; Fey, L.; Martínez, A.; Izquierdo, L. y Cañizares, K. 2009. Biopreparado mixto a partir de *Bacillus subtilis* y *Azotobacter* sp. para la estimulación del crecimiento vegetal y la prevención de enfermedades en cultivos hortícolas. *Memorias XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*. La Habana, Cuba. 226 p.
- Torres, R.; Pérez, C. y Suarez, N. 2003. Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*. 30:56-60.

- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 164 p.
- Vázquez, E. y Torres, S. 1981. Fisiología Vegetal. Ed. Pueblo y Educación. Ministerio de Enseñanza Superior. 463 p.
- Wu, S.C.; Caob, Z.H.; Lib, Z.G.; Cheunga, K. C. and Wonga, M.H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125:155-166.
- Yanni, Y. G.; Rizk, R. Y.; Abd-El-Fattah, F. K.; Squartini, A.; Corich, V.; Giacomini, A.; de Bruijn, F. J.; Rademaker, J.; Maya, F. J.; Ostrom, P.; Vega-Hernández, M.; Hollingsworth, R. I.; Martinez-Molina, E.; Mateos, P.; Velázquez, E. ; Wopereis, J.; Triplett, E.; Umali-Garcia, M.; Anarna, J. A.; Rolfe, B. G.; Ladha, J. K. ; Hill, J.; Mujoo, R. ; Ng, P. K. and Dazzo, F. B. 2001. The beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Plant Soil*. 194:99-114.