



RESPUESTA DE *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis A DISTINTOS TIEMPOS DE SIEMBRA POSTERIOR A INOCULACION CON *Azospirillum brasiliense*

RESPONSE OF Brachiaria brizantha cv. ruziziensis TO DIFFERENT SOWING TIMES AFTER INOCULATION WITH *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Alejandro David Coronel González¹, Edith Ruiz Díaz Lovera^{2*}  y Alvaro Manuel Huerta Maciel²

¹ Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Concepción, Facultad de Ciencias Agrarias, Concepción, Paraguay.

² Profesor, Universidad Nacional de Concepción, Facultad de Ciencias Agrarias, Concepción Paraguay.

*Autor por correspondencia: edirudi86@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la influencia de aplicaciones de inoculante a base de *Azospirillum brasiliense* en tres tiempos diferentes en *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis. El experimento fue realizado en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNC. El diseño experimental fue completamente al azar en un arreglo factorial (2×3); siendo el factor A: con y sin *A. brasiliense*; y el factor B: tiempo de siembra (0, 24 y 48 horas después de la inoculación). Se generaron 6 tratamientos, con 4 repeticiones, totalizando 24 unidades experimentales (UE). Se determinó el porcentaje de germinación, el índice de velocidad de emergencia, la altura a los 10 días después de la siembra y, la masa fresca y seca de las plántulas. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza por el Test de F (5%) y la comparación de medias por el Test de Tukey al 5%. Para el porcentaje de germinación, altura de la planta, índice de velocidad de emergencia y masa seca, no se detectaron diferencias estadísticas significativas para ambos factores. En la masa fresca, se observa que hubo diferencia estadística para ambos factores. La mejor combinación de los factores evaluados, se registró en la semilla de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis inoculada al momento de la siembra.

Palabras clave: Inoculante, *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis, germinación.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the influence of *Azospirillum brasiliense*-based inoculant applications at three different times in *Brachiaria brizantha* cv. Ruziziensis. The experiment was conducted in the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agrarian Sciences - UNC. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement (2×3); where Factor A was: with and without *A. Brasiliense*, and Factor B was: sowing time (0, 24, and 48 hours after inoculation). A total of 6 treatments were generated, with 4 replications, resulting in 24 experimental units (EU). Germination percentage, emergence speed index, plant height at 10 days after sowing, and fresh and dry biomass of seedlings were measured. The data obtained were subjected to analysis of variance using the F test (5%) and mean comparison using Tukey's test at 5%. No significant statistical differences were detected for both factors in germination percentage, plant height, emergence speed index, and dry biomass. However, for fresh biomass, statistical differences were observed for both factors. The best combination of the evaluated factors was recorded in *Brachiaria brizantha* cv. Ruziziensis seeds inoculated at the time of sowing.

Keywords: Inoculant, *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis, germination.

INTRODUCCIÓN

Brachiaria brizantha cv. ruziziensis es un pasto perenne que se adapta a muchos tipos de suelos, incluyendo los pobres, tolera la sombra, pero es sensible a los encharcamientos. A estas especies, se le consideran de interés debido a su buen comportamiento y desarrollo cuando han sido estudiadas en diversas condiciones de manejo (Olivera y Machado, 2004).

Teniendo en cuenta la capacidad de producción de nuestros suelos en la región, déficit nutricional de los mismos y los altos costos de fertilización es frecuente que la fertilización orgánica se haga con materiales biológicos provenientes de otras regiones, lo que implica limitaciones técnicas y de adopción por parte de los agricultores locales. Ello obliga a hacer estudios de adaptación y eficiencia biofertilizante de nuevas cepas bacterianas o micorrízicas en cada región. La respuesta a inoculantes basados en *Azospirillum brasiliense* ha sido exitosa pues ha permitido incrementos mayores a 30 % en la producción de grano y materia seca de diversos cultivos (García et al., 2012).

El uso de inoculantes también ha permitido reducir la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados en diversos cultivos. La inoculación con *A. brasiliense* es altamente benéfica en gramíneas, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (García et al., 2006 y Ferlini, 2008). Una semilla de calidad contribuye a mayor eficiencia varietal productiva, ya que es capaz de emerger de manera rápida y uniforme, bajo diferentes condiciones ambientales (Pérez et al., 2006).

Por lo anterior, el objetivo general del trabajo fue, determinar la respuesta de la germinación y del crecimiento de plántulas de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis inoculadas con *Azospirillum brasiliense* a distintos tiempos de siembra.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se enmarca dentro del tipo experimental mixto. El experimento fue realizado en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Concepción, ubicada en el km 2, Ruta 5 Bernardino Caballero; durante los meses de agosto y setiembre del 2019.

Se aplicó el diseño completamente al azar, en un arreglo factorial (2×3), con cuatro repeticiones, donde el Factor A consistió en la aplicación del inoculante (con y sin *A. Brasiliense*) y el factor B tiempo para la siembra

(0, 24 y 48 horas después de inoculación - HDI). Se utilizaron 100 semillas para cada unidad experimental; totalizando 2400 semillas. Cada unidad experimental consistió en una bandeja cilíndrica de 26 cm de diámetro y 12 cm de altura. Los tratamientos se encuentran detallados en la tabla 1.

Para el experimento se adquirió semillas de pasto *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis con un valor cultural de 76 %. Posteriormente se procedió a la esterilización del sustrato, que consistió en arena lavada, a 200°C en estufa de secado, por el lapso de 2 horas.

Las semillas fueron inoculadas conforme a los tratamientos, donde los tratamientos T1, T2 y T3 recibieron la aplicación del inoculante 0, 24 y 48 horas antes de la siembra. Es decir, el T1 fue inoculado y sembrado inmediatamente. Se procedió a remojar el sustrato con aspersor manual, y posteriormente sembrar las semillas. Se distribuyeron 100 semillas en forma equidistante en las bandejas de plástico para cada tratamiento.

Tabla 1. Descripción de las combinaciones utilizadas en el experimento. Facultad de Ciencias Agrarias.

Trat.	Factor A: Inoculación	Factor B: Tiempo para la siembra
T1	Con <i>A.</i>	0 HDI
T2	<i>Brasilense</i>	24 HDI
T3		48 HDI
T4	Sin <i>A.</i>	0 HDI
T5	<i>Brasilense</i>	24 HDI
T6		48 HDI

Para la inoculación se preparó el inoculante a base de *Azospirillum brasiliense* con una dosis de 100 g para cada 5 kg de semillas, se mezcló en una solución adherente que consistió en 1000 ml de agua para 100 g de azúcar. Se realizó la mezcla del inoculante con la semilla de modo a que el producto lo recubra completamente, evitando el contacto de las semillas en forma directa con las manos.

La siembra se realizó utilizando pinzas y colocando una semilla por hoyo en cada bandeja. Posteriormente se aplicó el riego correspondiente, con 50 ml de agua para cada unidad experimental conforme las necesidades de las plántulas. Se elaboraron planillas donde se registraron todos los datos recolectados de cada medición para luego ser sometidos al análisis estadístico correspondiente.

La evaluación final del experimento se realizó a los 22 días después de la siembra. Para la cosecha se tuvo en cuenta una muestra de 10

plántulas para cada determinación de cada unidad experimental.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

Porcentaje de germinación: fue evaluado a los 8 días después de la siembra (DDS), contando la cantidad de semillas germinadas por cada uno de los tratamientos y los resultados fueron expresados en porcentaje (%), según la siguiente fórmula mencionada por ISTA (2011):

$$PG = \frac{SG \times 100}{TS}$$

Donde:

PG = Porcentaje de germinación.

SG = Semillas germinadas.

TS = Total de semillas sembradas.

Altura de la plántula: La medición se realizó a los 10 días después de la siembra, con la ayuda de una regla centimetrada, desde la punta de la raíz hasta el ápice de la hoja de las 10 plantas elegidas al azar y los resultados expresados en centímetros por planta (cm/pl).

Masa fresca y masa seca: Para la masa fresca se pesaron las 10 plántulas seleccionadas al azar, en una balanza electrónica de presión, y los resultados fueron expresados en gramos por planta (g/pl). Para la masa seca se realizó el secado de las mismas plántulas, las cuales fueron introducidas a estufa a 70° C por 24 hs hasta que la muestra alcanzó un peso constante y luego se procedió a pesar cada muestra con una balanza electrónica de 0,01 g de resolución.

Índice de velocidad de emergencia: La velocidad de emergencia de plántulas normales (PN) se calculó según el índice de velocidad de emergencia (IVE) de ISTA (2011), computando el intervalo de tiempo para la emergencia de plántulas por días.

$$IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_n}{N_n}$$

IVE: índice de velocidad de emergencia de plántulas normales expresado en plantas por día (pl/día).

E_1 , E_2 , y E_n : cantidad de plántulas normales computadas en el primer, segundo y último conteo.

N_1 , N_2 y N_n : cantidad de días desde del inicio del test.

Los datos de cada una de las determinaciones fueron sometidos a un análisis de varianza y al Test de Fisher y las medias que presentaron diferencias estadísticas fueron comparadas entre sí por el Test de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Porcentaje de germinación

Los resultados del análisis de varianza para porcentaje de germinación de plántulas no presentan diferencias estadísticas significativas para ambos factores, además no hubo interacción entre los factores en estudio.

Se puede apreciar en la Tabla 2, en relación a la inoculación el porcentaje de germinación de *Brachiaria ruziziensis* con inoculante, independientemente al tiempo de siembra las plántulas presentaron un alto porcentaje de germinación, donde estadísticamente no difieren entre sí, pero son superiores agronómicamente a las que no recibieron inoculante.

Tabla 2. Efecto de inoculación y tiempo de siembra sobre el porcentaje de germinación de plantas de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis.

Factor	Descripción	Germinación (%)
A: Inoculación ^{NS}	Con A. <i>brasiliense</i>	49,41 a
	Sin A. <i>brasiliense</i>	40,08 a
DMS:		10,57
B: Tiempo para siembra ^{NS}	48 HDI	38,00 a
	24 HDI	45,75 a
	0 HDI	50,50 a
DMS:		15,73
CV %		27,54
Media general		44,75

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5 %. NS: Diferencia no significativa. HDI: Horas después de la inoculación. CV: Coeficiente de variación. DMS: Diferencia mínima significativa.

Para el factor B, el porcentaje de germinación de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis, no presentó diferencia entre los tiempos de siembra después de la inoculación, pero mayor porcentaje, numéricamente, se observa a las 0 horas después de la inoculación con un valor 50,50%.

Altura de la planta

En el análisis de los datos para la altura de plántulas no se encontraron diferencias estadísticas significativas tanto para el factor A (inoculación) como para el factor B (tiempo para siembra), además tampoco se detectó interacción entre ambos factores.

En la Tabla 3, se presenta las medias de la altura de plántula, con respecto a la inoculación, aunque no existe diferencia estadística, la mayor altura se observa en la aplicación de inoculante cuyo valor fue de 13,41 cm/pl.

Tabla 3. Efecto de inoculación y tiempo de siembra sobre la altura de plantas de *Brachiaria brizantha* cv ruziziensis.

Factor	Descripción	Altura (cm/pl)
A: Inoculación ^{NS}	Con A. <i>Brasilense</i>	13,41 a
	Sin A. <i>Brasilense</i>	12,87 a
	DMS:	1,36
B: Tiempo para siembra ^{NS}	48 HPI	13,07 a
	24 HDI	13,08 a
	0 HDI	13,28 a
DMS:		2,02
CV %		12,07
Media general		13,14

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5 %. NS: Diferencia no significativa. HDI: Horas después de la inoculación. CV: Coeficiente de variación. DMS: Diferencia mínima significativa.

En cuanto al tiempo de siembra después de la inoculación, se puede visualizar que la mayor altura de plántulas se observó en el tiempo 0 horas, mientras el que presentó menor altura fue

la que se sembró a las 48 horas después de la inoculación.

Masa fresca total de las plántulas

En el análisis de los resultados de masa fresca, se observa que hubo diferencia estadística para ambos factores. También hubo interacción entre el Factor A y Factor B según la prueba de Fisher.

En la tabla 4 se puede apreciar las interacciones de la media de masa fresca total, en relación al comportamiento de inoculación dentro de tiempo de siembra después de la inoculación. No se revela diferencia significativa con y sin inoculante en el tratamiento (48 hs) donde se aplicó inoculante y se sembró 48 hs después, sin embargo, revelaron diferencia con y sin inoculante a las 0 y 24 horas de siembra después de la inoculación. En cuanto al tiempo de siembra después de la inoculación dentro de con y sin inoculante, no hubo diferencia entre los tiempos (0, 24 y 48 hs) en las semillas inoculadas. Entretanto en la semilla de *B. brizantha* cv. ruziziensis sin la aplicación de inoculante indica una diferencia entre los tiempos estudiados. La mejor combinación de los factores evaluados, se registró en la semilla inoculadas a la siembra después de los 0 hs después de inoculación con una media 0,1063 g/pl.

De una manera general, los datos obtenidos en la variable masa fresca total resultó que la inoculación de bacteria *Azospirillum* en la semilla contribuyen un mejor desempeño en las plántulas.

Tabla 4. Efecto de inoculación y tiempo de siembra sobre la masa fresca total (g/pl) de planta de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis.

Factor	B: Tiempo de siembra después de la inoculación (horas)		
	48	24	0
A: Inoculación			
Con A. <i>Brasilense</i>	0,103 A a	0,1060 A a	0,1063 A a
Sin A. <i>Brasilense</i>	0,035 B b	0,041 B b	0,086 A a
CV %	22,35		
DMS (Columna)	0,026		
DMS (fila)	0,032		
Media general	0,079		

En las columnas, medias seguidas por la misma letra mayúscula, y en las filas, medias seguidas por la misma letra minúscula, no difieren entre sí por el Test de Tukey en el nivel de significancia al 5 %. CV: Coeficiente de variación. DMS: Diferencia mínima significativa.

Bashan y Olguin (1997) en una revisión sobre las relaciones de *Azospirillum* con las plantas mostraron que las mezclas de bacterias interactúan entre sí y auxilian en la absorción de nutrientes, remoción de algunos productos

inhibitorios, cooperando uno con el otro a través de mecanismos bioquímicos.

Masa seca

El análisis de varianza realizado indica que no hubo diferencias significativas en la masa

seca total para el factor A y Factor B, además no se detectaron diferencias estadísticas en la interacción entre los factores según la prueba Fisher para la masa seca total.

En la tabla 5 se observa la media de masa seca total de los efectos de inoculación, la semilla inoculada con *Azospirillum* e inmediatamente sembrada (0 h) fue la que agronómicamente presentó la mayor cantidad de masa seca con una media 0,055 g/pl. En cuanto al tiempo de espera para la siembra, en la masa seca de las plántulas no se observaron efectos significativos en las horas (0, 24 y 48), sin embargo, a las 0 horas para la siembra, agronómicamente presentó el mejor resultado con relación a los demás tratamientos con una media 0,060 g/pl. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se deduce que el tiempo de siembra después de la inoculación es un factor de importancia ligado al proceso del crecimiento inicial de las plántulas, dado que se percibió influencia con o sin inoculante sobre los caracteres de crecimiento.

Tabla 5. Efecto de inoculación y tiempo de siembra sobre la masa seca (g/pl) total de planta de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis.

Factor	Descripción	Masa seca (g/pl)
A: Inoculación ^{NS}	Con A. <i>Brasilense</i>	0,055 a
	Sin A. <i>Brasilense</i>	0,054 a
	DMS:	0,009
B: Tiempo para siembra ^{NS}	48 HPI	0,046 a
	24 HDI	0,057 a
	0 HDI	0,060 a
DMS:		0,014
C.V. %		20,39
Media general		0,054

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5 %. NS: Diferencia no significativa. HDI: Horas después de la inoculación. CV: Coeficiente de variación. DMS: Diferencia mínima significativa.

El trabajo desarrollado por Han y New (1998) mostró un aumento en la masa seca en plantas de trigo cuando las plantas fueron inoculadas con unas cepas de *Azospirillum* en comparación con aquellas que no recibieron inoculación. A su vez, Oliveira (2000) en un experimento de inoculación de bacterias en plantas de caña de azúcar mostró que la

inoculación fue capaz de aumentar el 30% de producción cuando comparadas con el testigo (sin inoculación). Por otro lado, los trabajos de inoculación en gramíneas forrajeras y de granos presentando mejores resultados en el crecimiento inicial en cuando a la aplicación *Azospirillum Brasilense* (Fallik y Okon, 1996).

Índice de velocidad de emergencia

En la tabla 6 se presentan las medias de IVE en el factor de inoculación dando como resultado con inoculación, se consiguió el mejor indicé de velocidad con una media 25,06, sin embargo, no difiere donde no se aplicó inoculante que es la bacteria *Azospirillum*, con una media 20,47.

Tabla 6. Efecto de inoculación y tiempo de siembra sobre IVE de planta de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis.

Factor	Descripción	IVE
A: Inoculación ^{NS}	Con A. <i>Brasilense</i>	25,06 a
	Sin A. <i>Brasilense</i>	20,47 a
DMS:		4,63
B: Tiempo para siembra ^{NS}	0 HPI	18,61 a
	24 HPI	24,21 a
	48 HPI	25,46 a
DMS:		6,90
CV %		23,75
Media general		22,76

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tukey al 5 %. NS: Diferencia no significativa. HDI: Horas después de la inoculación. CV: Coeficiente de variación. DMS: Diferencia mínima significativa.

En relación al Factor B (Tiempo de siembra después de la inoculación), se puede apreciar las medias de IVE entre los tiempos estudiados, no produjeron efectos significativos. El mejor IVE presenta a los 0 hs, seguida 24 hs y por último 48 (horas de inoculación antes de la siembra) cuyos valores 25,46; 24,21 y 18,61, respectivamente.

CONCLUSIONES

En las condiciones que fue realizado el trabajo de investigación, se puede concluir: La inoculación en *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis, no ocasionó diferencias significativas en el crecimiento en altura de las plántulas, masa fresca y seca, índice de velocidad de emergencia y en el % de germinación.

La siembra en el menor tiempo, benefician la acumulación de biomasa fresca en las plántulas de *Brachiaria brizantha* cv. ruziziensis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bashan, Y., & Holguin, G. (1997). Azospirillum–plant relationships: Environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43(2), 103–121. <https://doi.org/10.1139/m97-015>
- Fallik, E., & Okon, Y. (1996). Inoculants of *Azospirillum brasiliense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), 123–126. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00084-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00084-4)
- Ferlini, H. (2008). Inoculación de semillas, una técnica también para gramíneas. *Producir XXI*, 16(197), 16–20.
- García, J., Moreno, V., Rodríguez, I., Mendoza, A., & Mayek, N. (2016). Biofertilización con *Azospirillum brasiliense* en sorgo, en el norte de México. *Agricultura Técnica en México*, 32(2), 135–141. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0568-25172006000200001&tlang=pt
- García, O. J. G., Mendoza-Herrera, A., & Mayek-Pérez, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasiliense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y Ciencia*, 28(1), 79–84.
- Han, S. O., & New, P. B. (1998). Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecology*, 36, 193–201. <https://doi.org/10.1007/s002489900106>
- ISTA (International Seed Testing Association). (2011). *Reglas de análisis de semillas*.
- Oliveira, A. L. M. (2000). *Contribuição da fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar: Avaliação da interação entre espécies de relevância agronômica com a planta hospedeira* [Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro].
- Olivera, Y., & Machado, R. (2004). Evaluación de especies del género *Brachiaria* en suelos ácidos e infértilles durante la época de mínimas precipitaciones. *Pastos y Forrajes*, 27(3).
- Pérez, M. C., Hernández Livera, A., González Cossío, F. V., García de los Santos, G., Carballo Carballo, A., Vásquez Rojas, T. R., & Tovar Gómez, M. D. R. (2006). Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura Técnica en México*, 32(3), 341–352. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0568-25172006000300010