



Efecto de la Inoculación con *Glomus* spp. y *Pseudomonas putida* en Trigo

BLANCA VALDIVIA-URDIALES,^{1*} JUAN MANUEL SÁNCHEZ-YÁÑEZ,² EDMUNDO PEÑA-CERVANTES³ Y JOSÉ MANUEL FERNÁNDEZ-BRONDO⁴

Depto. de Suelos,^{1,3} Depto. de Botánica,⁴ Univ. Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coah. 25000, Coahuila, México.

Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B-1, Cd. Universitaria, Morelia, 58030, Michoacán, México.²

*Autor para la correspondencia

ABSTRACT. A possible solution to minimize the problem of wheat production in calcareous soils is to increase nitrogen and phosphorus assimilation with bioinoculations using phosphorus solubilizing microorganisms. The aim of this work was to explore the effect of individual inoculations with two *Glomus* species (G1 and G2) and the coinoculation with *Glomus* and *Pseudomonas putida* (Ps) on dry matter production and total N and P in wheat fertilized with 50% nitrogen and two phosphorus levels. Wheat seeds were inoculated and grown in Leonard jars which contained a sterile Jensen's solution amended with N and P. The G1+G2+Ps combination increased root dry weight 85.2% and shoot dry weight 55.4% in wheat fertilized with 50% P₂O₅ compared with the control wheat (100% N and P₂O₅). The addition of 100% P₂O₅ inhibited the beneficial effect of the coinoculation observed as a reduction in phosphorus solubilization and assimilation. Shoot total N in the coinoculated wheat fertilized with 50% P₂O₅ was slightly superior to the control plants while shoot total P was 86% higher than the uninoculated wheat 100% fertilized.

Key Words: *Glomus* and *Pseudomonas putida*, micorrhiza.

RESUMEN. Una posible estrategia para minimizar el problema de la producción de trigo en suelos calcáreos es incrementar la eficiencia de asimilación de los fertilizantes nitrogenado y fosforado mediante la inoculación con microorganismos que solubilizan fósforo. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inoculación individual de dos especies de *Glomus* (G1 y G2) y la coinoculación con *Glomus* y *Pseudomonas putida* (Ps) sobre la materia seca y el N y P total de trigo a 50% de fertilizante nitrogenado y dos niveles de fósforo. Se inocularon semillas de trigo y se sembraron en jarras Leonard alimentadas con solución mineral de Jensen enriquecida con N y P. La combinación G1+G2+Ps incrementó 85.2% el peso seco radical y 55.4% el peso seco de vástago del trigo fertilizado con 50% de P₂O₅ en relación al trigo control (100% de N y P₂O₅). El 100% de P₂O₅ inhibió el efecto benéfico de la coinoculación al reducir la solubilización y asimilación del fósforo. El N total del vástago del trigo coinoculado y fertilizado con 50% de P₂O₅ fue ligeramente mayor que el trigo control, mientras que el P total del vástago fue 86% mayor que el trigo no inoculado y 100% fertilizado.

Palabras Clave: *Glomus*, *Pseudomonas putida*, micorriza.

En algunas zonas del norte de México los suelos calcáreos limitan la disponibilidad de nitrógeno y fósforo que, aunado a la escasez de agua, reducen el rendimiento de trigo a niveles inferiores a los de otras zonas del país.²³ El problema se agudiza pues el trigo tiene una baja tasa de asimilación de fertilizante N de 24 y 50%.¹¹ Una alternativa para resolver parcialmente este problema en trigo es la aplicación de dosis crecientes de fertilizante N y P. Sin embargo, la incapacidad de la planta para asimilar eficientemente estos fertilizantes permite excedentes que contaminan el agrosistema con NO₃⁻ y NO₂⁻ y elevan los costos de producción.²²

Dada la relación dinámica entre el nitrógeno y el fósfo-

ro en el suelo, al reducir la disponibilidad de N, la retención de P se incrementa.⁶ El problema de la disponibilidad del fósforo en el suelo también se debe, en parte, a que éste se adsorbe al calcio unido a las arcillas o se precipita por lo que sólo el 1% del fósforo total del suelo está disponible para las plantas.¹⁰ Esta situación es más crítica en los suelos calcáreos en donde la unión de los fosfatos al calcio o magnesio disminuye aun más su disponibilidad y en consecuencia su asimilación.¹⁵

Una estrategia que puede resolver de manera parcial el problema, es mejorar la eficiencia de asimilación radical del trigo para el fertilizante nitrogenado y/o fosforado mediante la inoculación con bacterias promotoras del creci-



miento vegetal³ y/o endomicorrizas.⁴ Se ha reportado respuesta positiva de gramíneas a la inoculación con bacterias del tipo *Pseudomonas* sp., que aumentan el peso seco y el rendimiento de grano.^{9,18} Las endomicorrizas vesículo-arbusculares (VAM) pueden actuar de manera sinérgica con las bacterias, ya que las raíces micorrizadas muestran mayor afinidad por el fósforo del suelo que la raíces sin micorrizas y *Pseudomonas* sp. puede solubilizar el fósforo del suelo.¹ Esta doble acción incrementa la eficiencia de asimilación radical de la planta por el N y P y con ello se reduce la dosis de fertilización nitrogenada y fosforada.^{19,2}

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la inoculación individual o en combinación de dos especies de *Glomus* y de *Pseudomonas putida* sobre la producción de materia seca y el contenido de N y P en trigo a una dosis reducida de fertilizante nitrogenado y dos niveles de P₂O₅ en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los microorganismos. Se aisló *P. putida*, identificada mediante el sistema de caracterización BIOLOG, de la rizosfera de la maleza *Aristida* sp. y dos hongos VAM, designados *Glomus* sp. G1 y *Glomus* sp. G2, de las malezas *Reseda luteola* y *Eruca sativa*, respectivamente. La bacteria se creció en 100 ml de caldo nutritivo y se incubó a 30°C/24 h en agitador rotatorio a 250 rpm. Se utilizó como inóculo 1.0 ml de la suspensión bacteriana con una densidad de 9.8 x 10⁶ UFC/ml, determinada por la técnica de cuenta viable.

Las raíces de *Reseda luteola* y *Eruca sativa* se secaron a temperatura ambiente y se maceraron por separado en un mortero, después de detectar la presencia de vesículas, arbusculos y esporas por la técnica de azul de tripano en lactoglicerol al 0.05%¹⁷. Se identificaron los hongos endomicorrizicos de las dos malezas como *Glomus* spp., con base en las características morfológicas de las esporas, según Morton.¹⁴

Inoculación de trigo. Para evaluar el efecto de la inoculación individual de *Glomus* sp. y/o de la combinación *Glomus/P. putida*, se desinfectaron semillas de trigo (*Triticum aestivum* L. var. Pavón F-76) con hipoclorito de sodio 1% por 15 min y se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. Después, se mezclaron con un adherente (sacarosa 10%) y se cubrieron con 0.1 g de raíces molidas de *R. luteola*, *E. sativa* o una combinación de ambas y se sembraron en un sistema semihidropónico o jarras Leonard. Se utilizó como sustrato una mezcla de suelo-arena (1:1) esterilizada a 120°C/3 h. El pH del suelo fue de 8.3 (potenciómetro 2:1), el N total 0.12% (Kjeldahl¹³) y el P extractable 31.5 mg/kg (método de Olsen²⁴). Las plantas se alimentaron con solución estéril de Jensen¹³ adicionada con 50% (60 kg N/ha) de la dosis de N recomendada para la región, aplicado como urea. A la emergencia, se inocularon las plántulas con 1.0 ml de la suspensión de *P. putida* y

se fertilizaron con 50 y 100% de la dosis de fósforo recomendada para la región, aplicado como superfosfato triple, equivalente a 40 y 80 kg P₂O₅/ha, respectivamente. Las plantas se aclarearon a una por jarra Leonard y se colocaron en invernadero con temperatura diurna de 25°C y nocturna de 19°C.

Diseño experimental y análisis estadístico. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, con 14 tratamientos y cuatro repeticiones. Se incluyó un tratamiento testigo (trigo sin inocular y sin fertilizar) y un control (trigo sin inocular y fertilizado con 100% de N y P₂O₅). Las plantas se cosecharon al inicio del espigamiento (aproximadamente 60 días después de la siembra), correspondiente a la etapa 10.5 de la escala de Feekes.¹² Las variables que se evaluaron fueron peso seco (70°C/72 h), N total¹³ y P total²⁴ de la raíz y del vástago de trigo. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y la comparación de medias se calculó según la prueba Tukey (P<0.01).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la inoculación sobre la raíz de trigo. El trigo inoculado con las especies de *Glomus* individual o combinado, *Glomus* sp. G1+*Glomus* sp. G2, y fertilizado con 50% (40 kg P₂O₅/ha) de fosfato (Fig. 1) alcanzó un peso seco radical estadísticamente igual al trigo usado como control (sin inocular y con 100% N y P₂O₅). Esto indica que en ambos casos, *Glomus* incrementó la eficiencia de asimilación de nitrógeno y fósforo.⁵ Sin embargo, el trigo coinoculado con *Glomus* sp y *P. putida* y adicionado con la misma dosis de P₂O₅, alcanzó mayor peso radical que el trigo control debido probablemente a que, aunado a la asimilación del fósforo por *Glomus*, la bacteria estimuló un mejor funcionamiento del sistema radical como resultado del reconocimiento de los exudados radicales y su transformación en fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal. El incremento de peso radical fue dependiente del tipo de microorganismo: la coinoculación con *Glomus* sp. G2 y *P. putida* causó un aumento de 34%, *Glomus* sp. G1 y *P. putida* causó un incremento de 47% y *Glomus* sp. G1+*Glomus* sp. G2 *P. putida* aumentó el peso seco de la raíz 85%. Lo anterior confirma que la asimilación del fósforo del suelo no sólo dependió de *Glomus* sino que *Pseudomonas* también tiene la capacidad para mejorar la eficiencia de asimilación de este elemento. De acuerdo con Ishac et al.,⁸ el incremento de peso seco en trigo se debe a la acción sinérgica entre la bacteria y el hongo endomicorrizico.

Cuando el trigo coinoculado con *Glomus* sp./*P. putida* se fertilizó con 100% de P₂O₅, se observó que, en general, el peso seco radical fue inferior al alcanzado con 50% de P₂O₅, excepto con *Glomus* sp. G2 *P. putida* (Fig. 1). Ferrera-Cerrato y Pérez-Moreno⁷ observaron un efecto similar cuando incrementaron la dosis de fertilizante fosforado en plantas inoculadas con VAM, lo cual redujo su acción so-

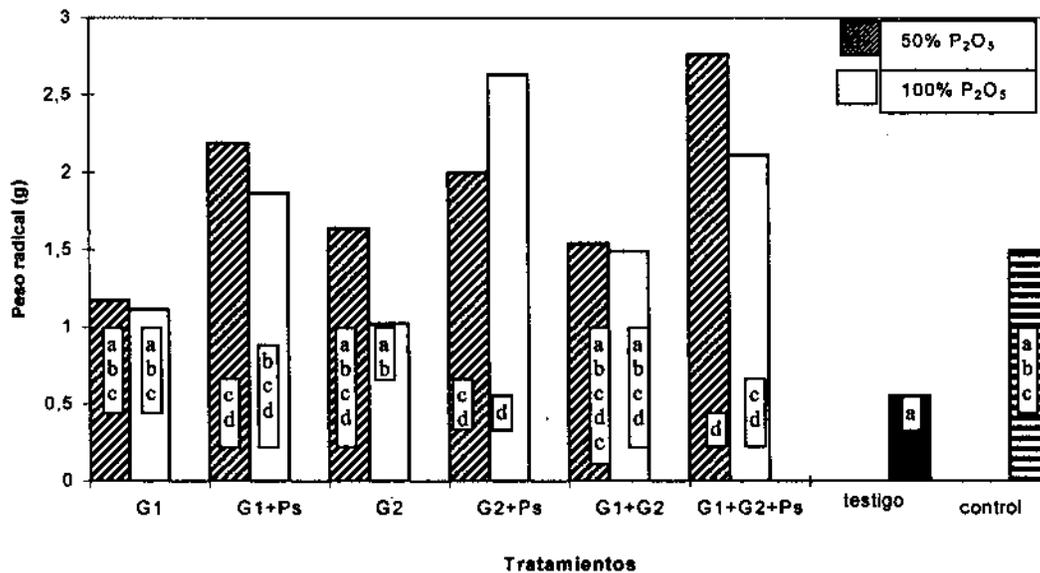


Figura 1. Efecto de la inoculación *Glomus spp./Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P₂O₅ sobre la materia seca radical de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*. Barras con distintas literales representan diferencias significativas (Tukey P<0.01).

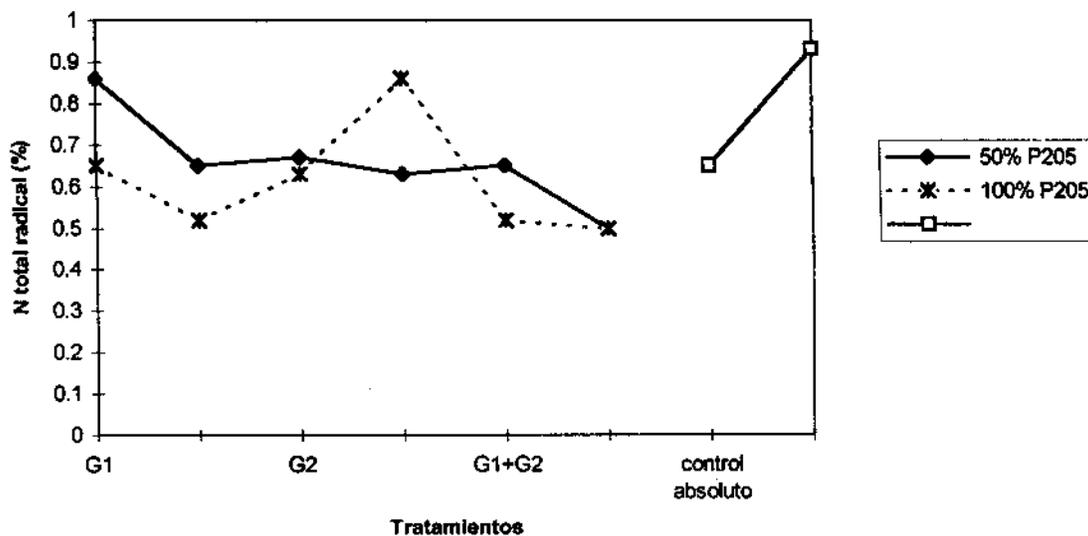


Figura 2. Efecto de la inoculación *Glomus spp./Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P₂O₅ sobre el N total radical de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*.

bre la asimilación del fósforo de la solución del suelo. Nuestros resultados indican que la aplicación de 100% de P₂O₅ afectó negativamente el peso radical debido, probablemente, a que se modificó el patrón de producción de exudados radicales, lo que disminuyó la infección microbiana. En el caso de *Glomus sp.* G2 y *P. putida*, el pH alcalino del suelo impidió la absorción de la mayor parte del fósforo, sin embargo, es posible notar que la acción sinér-

gica de ambos microorganismos favoreció que una pequeña porción del fósforo fuese traslocado a la raíz. Lo anterior sugiere que la especie *Glomus sp.* G2 es distinta a la especie *Glomus sp.* G1, dado que su respuesta al incremento de P₂O₅ fue diferente.

No hubo diferencia estadística en el contenido de N total de la raíz en el trigo inoculado o coinoculado y fertilizado con 50 o 100% de P₂O₅ (Fig. 2), con respecto al trigo

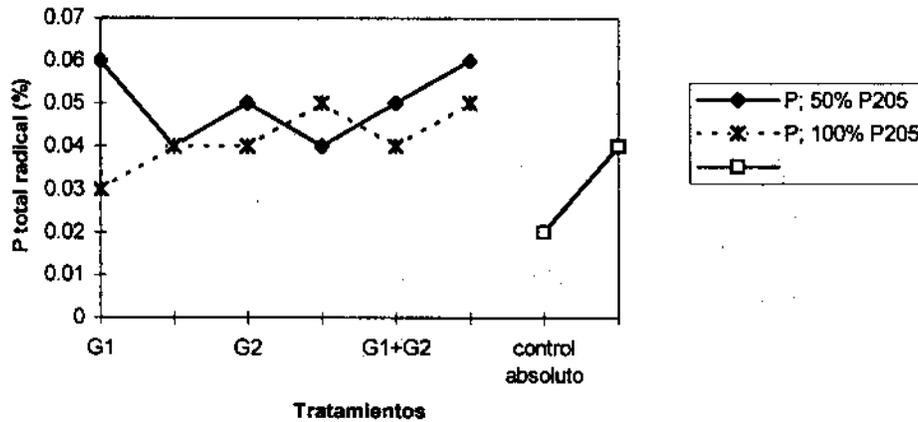


Figura 3. Efecto de la inoculación *Glomus spp/Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P₂O₅ sobre el fósforo total radical de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*.

usado como control, lo que sugiere que la asimilación de fósforo no fue suficiente para mejorar la eficiencia de asimilación del nitrógeno.

El contenido de P total radical aumentó en un 50% en el trigo inoculado con *Glomus sp.* G1 o coinoculado con *Glomus sp.* G1+*Glomus sp.* G2 y *P. putida*, ambos fertilizados con 50% de P₂O₅, en comparación con el trigo usado como control (Fig. 3). En este caso, fue evidente que los microorganismos mejoraron la eficiencia de asimilación del fósforo, mientras que con el 100% de P₂O₅, la interacción raíz-microorganismo fue inhibida parcialmente pues,

en general, los valores de P total radical fueron menores que con 50% del fertilizante fosforado. Al compararse con el testigo, se encontró que, independientemente de la dosis de P₂O₅, la inoculación hongo y/o bacteria mejoró la asimilación de fósforo. Lo anterior confirma que la asimilación de P a nivel radical puede ser mejorada mediante una coinoculación bacteria-hongo endomicorrízico, que refleja la acción solubilizadora de *Pseudomonas sp.* y el efecto de asimilación de *Glomus sp.*²¹

Efecto de la inoculación sobre el vástago de trigo. El trigo inoculado con *Glomus sp.* G2 o coinoculado con

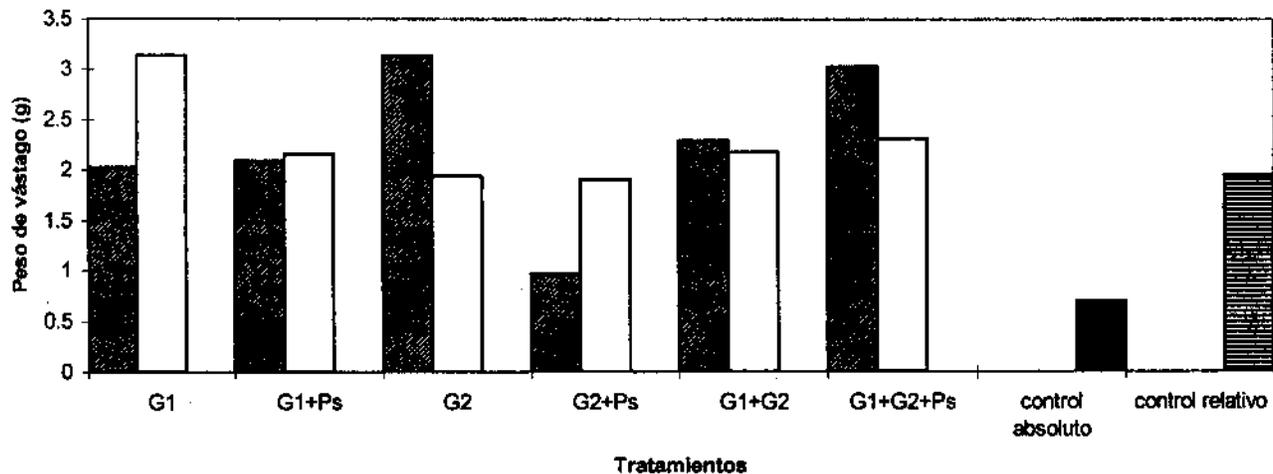


Figura 4. Efecto de la inoculación *Glomus spp/Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P₂O₅ sobre la materia seca de vástago de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*. Barras con distintas literales representan diferencias significativas (Tukey P<0.01).

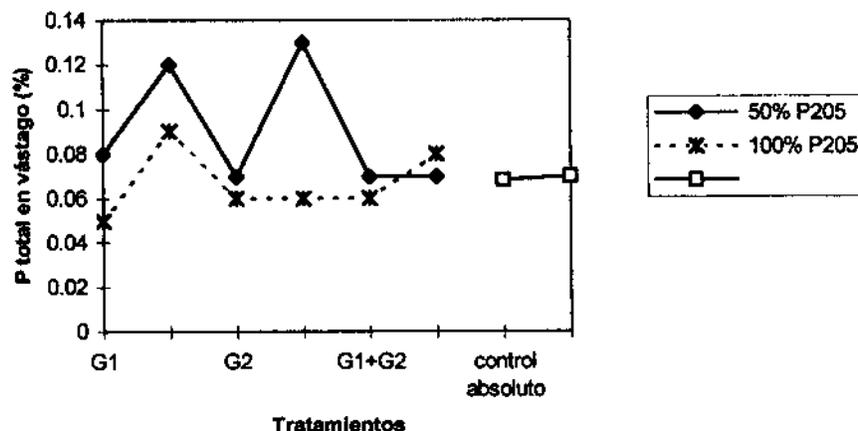


Figura 6. Efecto de la inoculación *Glomus spp./Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P_2O_5 sobre el fósforo total de vástago de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*.

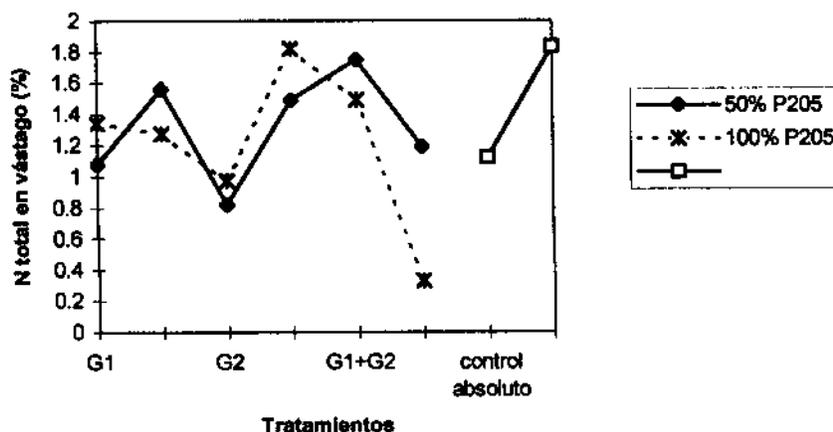


Figura 5. Efecto de la inoculación *Glomus spp./Pseudomonas putida*, 50% de nitrógeno y dos dosis de P_2O_5 sobre el N total de vástago de trigo var. Pavón F-76. G1, *Glomus spp.* aislado de *Reseda luteola*; G2, *Glomus spp.* aislado de *Eruca sativa*; Ps, *P. putida*.

Glomus sp. G1+*Glomus sp.* G2 *P. putida* y fertilizado con 50% de P_2O_5 , alcanzó un peso seco de vástago 55.4% superior al trigo control (Fig. 4). Los resultados sugieren que las especies de *Glomus* son diferentes, ya que *Glomus sp.* G1 responde a un 100% de P_2O_5 , aumentando el peso seco del vástago y *Glomus sp.* G2 causó un efecto menor. Por otra parte, *Glomus sp.* G1 *P. putida* y *Glomus sp.* G1+*Glomus sp.* G2 no causaron efecto sobre el peso seco de vástago, lo que sugiere que al interactuar redujeron su eficiencia de asimilación en una aparente competencia. En general, la eficiencia de asimilación fue mayor con la dosis 50% de P_2O_5 que con 100%, excepto el trigo inoculado con

Glomus sp. G1 y el coinoculado con *Glomus sp.* G2 *P. putida*. Esto sugiere que *Glomus sp.* G1 y *Glomus sp.* G2 *P. putida* pueden solubilizar y asimilar fósforo aún a altas dosis de fertilizante fosforado.

Con respecto al contenido de N total de vástago (Fig. 5), se observó que el trigo coinoculado con *Glomus sp.* G1+*Glomus sp.* G2 y fertilizado con 50% de P_2O_5 , y el coinoculado con *Glomus sp.* G2 y *P. putida* y adicionado con 100% de P_2O_5 , alcanzó un valor similar al trigo usado como control. Esto indica que las especies de *Glomus* y *P. putida* no influyeron en la asimilación y translocación de N en trigo, a diferencia de lo reportado por otros investigado-



res al estudiar el incremento del crecimiento vegetal causado por *Pseudomonas cepacia*²⁰ o por VAM¹⁶ en trigo. En ambos casos, las plantas fueron sometidas a estrés hídrico, lo que estimuló la interacción microbiana de la rizósfera, condición que no se presentó en nuestro estudio.

El trigo coinoculado con *Glomus* sp. G1 y *P. putida* o con *Glomus* sp. G2 y *P. putida*, ambos con 50% de P₂O₅, alcanzó un contenido de P total de vástago significativamente superior (86%) al trigo control (Fig. 6), sin embargo, al fertilizar con 100% de P₂O₅, sólo el trigo coinoculado con *Glomus* sp. G1 *P. putida* logró un contenido de fósforo mayor al control. Esto reafirma el efecto inhibitorio de las altas dosis de P₂O₅ sobre la actividad de solubilización y asimilación del fósforo del suelo de las especies de *Glomus* y *P. putida*. Además, se observó que el trigo usado como testigo (sin inocular ni fertilizar) y el usado como control, alcanzaron el mismo valor con respecto al contenido de P total de vástago, lo que indica que la ausencia de estos microorganismos impide la solubilización del fósforo del suelo debido al pH alcalino. Concluimos que el efecto sinérgico de *Glomus* sp. G1+*Glomus* sp. G2 *P. putida* se manifestó como el incremento significativo de materia seca total de trigo a dosis reducida (50%) de fertilizante nitrogenado y fosforado, comparado con el trigo usado como control y que el 100% de P₂O₅ inhibió la relación *Glomus* sp./*P. putida*. Nuestros resultados refuerzan la necesidad de inocular trigo con microorganismos adecuados para aumentar la asimilación y solubilización de fósforo en suelos donde el pH limita la disponibilidad de este elemento.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue parcialmente financiada por el Instituto de la Potasa y el Fósforo, A. C., México y Norte de Centro América y la Agencia Internacional de Energía Atómica, contrato de investigación D1-MEX-1994.

REFERENCIAS

1. Alagawadi, A. y C. Gaur. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) in Dry Land. Trop. Agric. 69:347-350.
2. Al-Nadidh, S. y A. H. M. Gomah. 1991. Response of wheat to dual inoculation with VA-mycorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. Arid Soil Res. Rehabil. 5:83-96.
3. Berge, O., J. Fages, D. Mulard y J. Balandreau. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop yield in field grown maize. Symbiosis 9:259-266.
4. Bethlenfalvay, G. J. y R. G. Linderman. 1992. Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. Amer. Soc. Agron. Spec. Publi. No. 54, Madison, WI, USA.
5. Bolan, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant Soil 132:189-207.
6. Colle, C. V. y R. D. Heil. 1981. Phosphorus effects on terrestrial nitrogen cycling. Ecol. Bull. 33:363-374.
7. Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez-Moreno. 1994. Mycorrhizal Interactions with Plants and Soil Organisms in Sustainable Agroecosystems. 15° Congreso Mundial de la Ciencia de Suelo, Acapulco, México. 53-54.
8. Ishac, Y. Z., M. E. El-Haddad, M. I. El-Kharabawy, E. A. Saleh, M., A. El-Borollosy y M. E. El-Demerdash. 1986. Effect of seed bacterization and phosphate supplementation on wheat yield and mycorrhizal development. Transactions of the XIII Congress of International Society of Soil Science, Hamburg. p. 588.
9. Kumar, B. S. y H. C. Dube. 1992. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. Soil Biol. Biochem. 24:539-542.
10. Hedley, M. J., J. W. B. Stewart y B. S. Chauhan. 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. Soil Sci. Soc. Am. J. 46:970-976.
11. Hera, C., G. Cioban, F. Zapata y H. Auxman. 1996. Improving the nitrogen use efficiency of irrigated wheat. International Atomic Energy Agency, Vienna. Research Coordinating Meeting on the use of nuclear techniques for optimizing fertilizer application under irrigated wheat. p. 1-16.
12. Large, E. C. 1954. Growth stages in cereals. Plant Pathol. 3: 128-129.
13. López, J. R. y J. M. López. 1990. El Diagnóstico de Suelos y Plantas. Mundi-Prensa. p. 95-98.
14. Luna Olvera, H. A. y J. M. Sánchez Yáñez. 1991. Manual de Microbiología de Suelos, 3° Ed. Fac. de C. Biológicas, UANL. p. 101-104.
15. Morton, J. B. 1988. Taxonomy of mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon 32:267-324.
16. Olson, S. R. y F. E. Khasawneh. 1980. Use and limitations of physico-chemical criteria for assessing the status of phosphorus in soils. In: Role of Phosphorus in Agriculture. Eds. F.E.
17. Pan, W. L., M. J. Mohammad y A. C. Kennedy. 1995. Wheat responses to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal inoculation of soils from eroded toposequence. Soil Sci. Soc. Am. J. 59:1086-1090.
18. Phyllips, J. M. y D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trends. Br. Mycol. Soc. 55:158-161.
19. Rennie, R. J., H. J. Jansen, E. M. Bremer y K. Volkmar. 1993. The effect of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield of hard red spring wheat. FAO/IAEA. First Coordinated Meeting, Vienna,



- Austria pp 3-4.
20. Singh, C. S., J. S. Amawate, S. P. Tyagi y A. Kapoor. 1990. Interaction effects of *Glomus fasciculatum* and *Azospirillum brasilense* on yields of various genotypes of wheat (*Triticum aestivum*) in pots. *Z. Mikrobiol.* 145:203-208.
21. Tabacchioni, S., A. Bevivino, L. Chiarini, P. Visca y M. Del Gallo. 1993. Characteristics of two rhizosphere isolates of *Pseudomonas cepacia* and their potential plant growth promoting activity. *Microb. Releases* 2:161-168.
22. Tinker, P. B. 1984. The role of microorganisms in mediating and facilitating uptake of plant nutrients from soil. *Plant Soil* 76:77-91.
23. Van Cleemput, O. y C. Hera. 1996. Fertilizer nitrogen use and efficiency in different cropping systems. *Terra* 14:40-58.
24. Vera, N. 1994. Efecto de la fumigación del suelo sobre el aprovechamiento del nitrógeno por el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el Bajío de Guanajuato. Escuela de Agronomía y Zootecnia, Ex hacienda "El Copal", Universidad de Guanajuato.
25. Watanabe, F. S. y S. R. Olsen. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHC_3 . *Soil Sci. Soc. Proceed.* 677-678.