

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Azospirillum brasilensis* EN LA
GERMINACIÓN Y EMERGENCIA DEL PIMIENTO PIMENTONERO
(*Capsicum annum* L.VAR. TROMPA DE ELEFANTE)**

Di Barbaro, G.; Pernasetti S. y Stegmayer A.

Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Catamarca. Belgrano y
Maestro Quiroga. San Fernando del Valle de Catamarca. E-mail: micro_fca@yahoo.com.ar

**EFFECTS EVALUATION OF *Azospirillum brasilensis* INOCULATION ON
PEPPER (*Capsicum annum* L.VAR. TROMPA DE ELEFANTE) SEEDS
GERMINATION AND PLANTS EMERGENCE**

SUMMARY

Rhizospheric bacteria inoculation technique is able to enhance crops performance, in several ways, from the early germination phase to their later development stages. That determines yield increases. *Azospirillum* is considered as a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) since it is an atmospheric nitrogen fixing microorganism and it is, also, able to synthesize plant growth regulators. It was reported that inoculated cereal seeds showed a higher germination percentage and increased plant dry matter, due to the bacterial production of plant growth promoting substances as Indol 3-acetic acid, citocinnins, giberelins and siderophores. This kind of substances induces lateral roots formation and growth, also increases root hair amount and length, therefore root volume obtained is bigger. This fact allows a nutrient and water higher root absorption potential. This enhanced absorption potential represents an advantage for arid and semiarid zones crops survival and growth. Pepper (*Capsicum annum* L. var. trompa de elefante) is one of the main alternative crop for argentine north wesr farmers.

Due to the regional importance of this crop and to evaluate techniques for improving its yield, this work was carried out. The objective of this work was to determine *Azospirillum brasilensis* inoculation effects on Pepper seed germination and plant emergence and growth.

Results showed higher seed germination and plant emergence percentage in *Azospirillum brasilensis* inoculated treatments.

In some parameters as dry matter and germination percentages high significant differences were found.

It is possible to conclude that *Azospirillum brasilensis* seeds pepper inoculation is an useful technique for seeds germination percentage and plant performance improve.

KEYS WORK: *Azospirillum brasilensis*, PGPR, *Capsicum annum*

RESUMEN

La práctica de la inoculación con bacterias rizosféricas puede aportar diferentes beneficios a los cultivos desde el momento de la germinación hasta los estadios de su desarrollo posterior, lo que determina incrementos en la producción primaria. El *Azospirillum*, es una rizobacteria considerada promotora de crecimiento vegetal por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas y otros reguladores del crecimiento vegetal. Se conoce que esta bacteria, inoculada a semillas de cereales, aumenta el porcentaje de germinación y la biomasa debido a que produce sustancias promotoras del crecimiento de las plantas, tales como ácido indol acético, citocininas, giberelinas y sideróforos, sustancias que estimulan la aparición de raíces laterales, aumentan la densidad y la longitud de los pelos radicales, incrementando así el volumen radical; lo que permite que el potencial de absorción de nutrientes y agua se eleve, beneficio que en el caso de cultivos de zonas áridas y semiáridas, constituye una ventaja aún mayor.

El pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. var. trompa de elefante) constituye una de las principales alternativas de producción de productores minifundistas del noroeste argentino. Dada la importancia de este cultivo en la región y a los fines de optimizar su producción, se fijó el objetivo de determinar la influencia de la bacteria *Azospirillum brasilensis* sobre la germinación, emergencia y desarrollo de plantines de pimiento pimentonero. Los resultados indicaron que los tratamientos inoculados con *Azospirillum brasilensis*, mostraron un mayor porcentaje de semillas germinadas que los restantes tratamientos. También se observó un mayor porcentaje de emergencia en los tratamientos inoculados. Estos resultados obtenidos en las condiciones ensayadas nos muestran en general cierta preponderancia, y en algunos parámetros diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos inoculados, por lo que se concluye que la inoculación de semillas de pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. Var.

Trompa de elefante) con la bacteria *Azospirillum brasilensis* constituye una metodología económicamente posible que puede optimizar la germinación y producir una mejor respuesta en el desarrollo de plantines.

PALABRAS CLAVES: *Azospirillum brasilensis*, PGPR, *Capsicum annuum*

INTRODUCCIÓN

Pocos cultivos tienen un uso tan universal como el pimiento (*Capsicum annum* L.) en sus variados tipos de frutos dulces o picantes utilizados como especia o como hortaliza (Nuez et al, 1998). En el noroeste de nuestro país, el pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. var. trompa de elefante) constituye una de las principales alternativas de producción de productores minifundistas de la región, se cultiva en los valles y bolsones bajo riego alcanzando una superficie cultivada de alrededor de 1.200ha (Paunero, 2001).

Algunas especies vegetales muestran indeseables condiciones de germinación, como una gran variación en el tiempo entre el momento de siembra y la emergencia, y pueden presentar bajos porcentajes finales de germinación (Killian et al, 1999). En el pimiento se puede observar una cierta disparidad en la energía germinativa en un mismo lote de semillas (Pilatti y Favaro, 2000) por lo que se han probado diversas sustancias con el objetivo de optimizar la germinación, la más usada es una solución al 0,2% de KNO₃ disuelto en agua (I.S.T.A., 1993).

Diversas bacterias rizosféricas son actualmente utilizadas como biofertilizantes. La práctica de la inoculación puede aportar diferentes beneficios a los cultivos en el momento de la germinación y en los estadios de su desarrollo posterior, lo que determina incrementos en la producción primaria.

Entre las bacterias del suelo de vida libre, se encuentra el género *Azospirillum*, rizobacteria considerada promotora de crecimiento vegetal por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y producir fitohormonas, producción de sideróforos y mejoramiento del sistema de absorción radical y relación agua/planta. (Tarrant, 1978; Dobereiner, 1991; Okon y Labandera, 1994; Baldani, 1999; Cassán, et al., 2003).

La inoculación de semillas de cereales con la bacteria *Azospirillum* puede incrementar la germinación y la biomasa del cultivo (Bellone, 1997). Esto es debido a que *Azospirillum* produce sustancias promotoras del crecimiento, tales como ácido indol acético, citocininas, giberelinas (Monzón de Asconegui, 2003; Cacciari et al, 1989), sustancias que estimulan la

densidad y largo de los pelos radicales, la aparición de raíces laterales y el volumen radical; esto permite que el potencial de absorción de nutrientes y agua se eleve, beneficio que en el caso de los cultivos de zonas áridas y semiáridas constituye una ventaja aún mayor.

La introducción, por medio de la inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) se perfila como una tecnología económica para incrementar la producción de cultivos y a su vez, reducir el uso masivo de fertilizantes con la consiguiente protección al agroecosistema. Numerosos experimentos de campo confirman el efecto beneficioso de la inoculación de *Azospirillum sp.* sobre diferentes cultivos (Bashan, 1993; Okon y Labandera, 1994; Fornasero, et al., 2001; Puente y Peticari, 2001; Iglesias, 2001; Fernandez Hernandez, et al., 2000).

Dada la importancia de este cultivo en la región y en especial por sus perspectivas de exportación, es necesario trabajar en la optimización de su producción y se fijó como objetivo, determinar la influencia de *Azospirillum brasilensis* sobre la germinación y emergencia de plantines de pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. var. trompa de elefante)

MATERIAL Y MÉTODO

Bioensayo de germinación

En este bioensayo de germinación se trabajó con semillas de pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. variedad trompa de elefante) y dos cepas de *Azospirillum brasilensis*, la cepa Pi 3 aislada de la endorizósfera de Pimiento y Op 8 aislada de la endorizósfera de Tuna (*Opuntia ficus indica*).

Se estableció un diseño completamente aleatorizado de 4 tratamientos, con 4 repeticiones de 50 semillas cada uno. Los tratamientos fueron:

T1. Semillas tratadas con *A. brasilensis* Pi 3;

T2. Semillas tratadas con *A. brasilensis* Op 8;

T3. Semillas tratadas con KNO₃

T4. Tratamiento testigo, semillas tratadas con agua destilada estéril.

En los tratamientos inoculados con *Azospirillum brasilensis* se utilizaron cultivos de 72 h. en el medio MPSS caldo, con títulos de $6,125 \times 10^9$ azosp/ml de la cepa Pi 3 y de $9,65 \times 10^8$ azosp./ml de la cepa Op 8 según recuento microscópico en cámara de Neubauer. En el tratamiento **T3** se utilizó una solución acuosa de KNO₃ al 0,2 % (I.S.T.A., 1993). Se colocaron las semillas en cajas de Petri estériles con papel de filtro y se las incubó a 28°C. Se registró el número de semillas germinadas diariamente.

Bioensayo de emergencia

Se llevó a cabo en bandejas de plástico transparentes (de 23x 16 x 10 cm), con sustrato estéril de Terra Fertil en solarío a una temperatura de 28 °C y con un diseño completamente aleatorizado.

Se utilizó semillas de pimiento pimentonero de la variedad trompa de elefante y la cepa de Pi 3 de *Azospirillum brasilensis*, aislada de la endorizósfera de pimiento (*Capsicum annum*).

Se realizaron 4 tratamientos con 3 repeticiones. Se sembraron 100 semillas por bandeja (300 por tratamiento). Los tratamientos aplicados fueron:

I 1: Inoculado en el momento de la siembra

I 2: Inoculado en el momento de la siembra más una segunda inoculación a los 7 días

I 3: Inoculado a los 7 días de la siembra

T: Testigo sin inocular.

Los tratamientos con inoculación inicial se los realizó con un cultivo de *Azospirillum brasilensis* de 72 hs. en medio MPSS caldo con un título de $1,23 \times 10^7$ azosp./ml., el cual se añadió en razón de 20 ml por repetición. Los tratamientos con inoculación a los 7 días de la siembra, se les agregó sobre la línea de siembra 20 ml. del cultivo de *A. brasilensis* de 72 hs. con un título de $1,2 \times 10^8$ azosp./ml.

El sustrato estéril de las bandejas, de alto contenido de materia orgánica, se le efectuó un riego a saturación, previo a la siembra y luego se realizaron riegos periódicos.

Se registró periódicamente: -número de semillas emergentes, realizándose el primer conteo a los 7 días de la siembra y el conteo final a los 14 días (I.S.T.A., 1993); - número de nomófilos; - altura de plántulas y - peso seco.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS 9.0 para Windows. El cual se inició con la estadística descriptiva, luego la estadística inferencial utilizando como herramienta un tests de hipótesis, determinando la significación estadística con el método del p-valor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de germinación

La primera semilla germinada se detectó a las 72 hs. de iniciado el ensayo, en el tratamiento con Pi 3. Los tratamientos con Op 8, Pi 3 y agua destilada presentaron similares velocidades de germinación. En cambio, la germinación de las semillas tratadas con KNO_3 fue muy lenta, al séptimo día germinó menos del 5 %. (Gráfico 1)

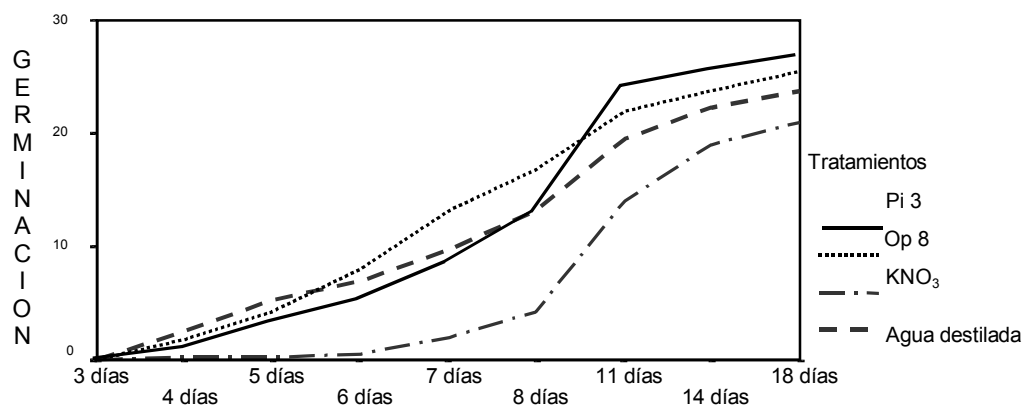


GRÁFICO N°1: Dinámica de la germinación de semillas de pimienta.

CUADRO N°1: Germinación de pimienta: datos medios y porcentajes por día.

Tiempo (días)	Agua destilada		KNO ₃		Op 8		Pi 3	
	media	%	media	%	media	%	media	%
3	-	-	-	-	-	-	0,25	0,5
4	2,5	5	0,25	0,5	1,75	3,5	1,25	2,5
5	5,25*	10,5	0,25	0,5	4,25*	8,5	3,50	7,0
6	7**	14	0,5	1	8,00**	16	5,50*	11,0
7	9,75**	19,5	2,25	4,5	13,25**	26,5	8,75*	17,5
8	13,25**	26,5	4,5	9	16,75**	33,5	13,25*	26,5
11	19,5**	39	14	28	22,00*	44	24,25	49,5
14	22,25	44,5	19	38	23,75	47,5	25,75	51,5
18	23,75	47,5	21	42	25,50	51	27,00	54

Según las normas de la Asociación internacional para pruebas de semillas (I.S.T.A., 1993) el primer conteo de semillas germinadas de pimienta debe realizarse a los 7 días y el conteo final a los 14 días de iniciado el tratamiento para obtener el porcentaje de germinación total. Por lo que el análisis estadístico de comparación de medias entre los tratamientos se realizó con los datos obtenidos en ese período, en el cual no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos planteados, en lo que se refiere al número de semillas germinadas. Pero si se pudo observar que con la inoculación con *Azospirillum brasilensis*, en especial con la cepa Pi 3, mostraron un mayor porcentaje final de semillas germinadas, siendo este incremento del orden del 12% con respecto al tratamiento con KNO₃ y de 6,5 % más que en el tratamiento testigo.

En el análisis estadístico de diferencias de medias se determinó diferencias significativas y altamente significativas entre el tratamiento con KNO_3 y los tres restantes entre el quinto y el décimo primer día, pasado este período disminuyen estas diferencias sin llegar a ser significativas. (Gráficos Boxplot 2 y 3).

Es importante destacar que en las semillas inoculadas, y en especial las inoculadas con la cepa Pi 3, no se observaron signos de infección fúngica, a diferencia de las semillas tratadas con KNO_3 y con agua destilada que a partir del sexto día y en forma paulatina mostraron un gran desarrollo de micelio fúngico.

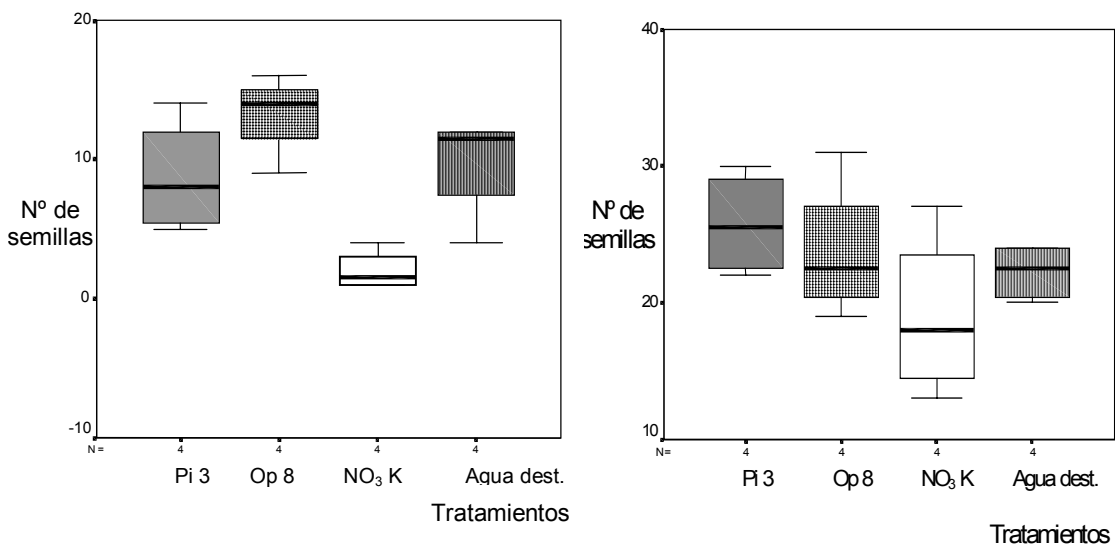


GRÁFICO N°2: Número de semillas germinadas a los 7 días.

GRÁFICO N°3: Número de semillas germinadas a los 14 días.

Bioensayo de emergencia

En este ensayo, los resultados del cuadro N° 2 de porcentajes de semillas emergentes a los 7 días no muestran ninguna diferencia entre tratamientos. A los 14 días se observa una leve diferencia a favor de los tratamientos inoculados 2 y 3, y el testigo e inoculado 1, sin embargo esas diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas.

El número de nomófilos evaluados a los 14 días tampoco mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos, no obstante, los tratamientos inoculados presentaron un mayor número de nomófilos que el testigo.

CUADRO N° 2: Porcentajes de emergencia de plántulas y N° de nomófilos.

Tratamientos	Testigo		Inoculado 1		Inoculado 2		Inoculado 3	
	7 días	14 días	7 días	14 días	7 días	14 días	7 días	14 días
EMERGENCIA %	19.33	76.3	18.66	78.6	16.6	85.6	14.3	81.6
N ° DE NOMÓFILOS	-	23.66	-	30.66	-	25.0	-	28.66

Las evaluaciones de alturas de plantines (gráfico N° 4) realizadas a partir del día 20 de iniciado el ensayo, mostraron desde su inicio, una leve preponderancia del tratamiento 2 (Inoculado en siembra y a los 7 días), que luego se acentuó en función del tiempo con un resultado final a los 40 días, momento en que se define una diferencia estadística altamente significativa para este tratamiento; mientras que en los tratamientos testigo (T) e inoculado en el momento de la siembra (I 1) no se observaron diferencias y tienen el mismo comportamiento. El tratamiento I 3 (inoculado a los 7 días) es el que revela los valores más bajos en altura de plantines.

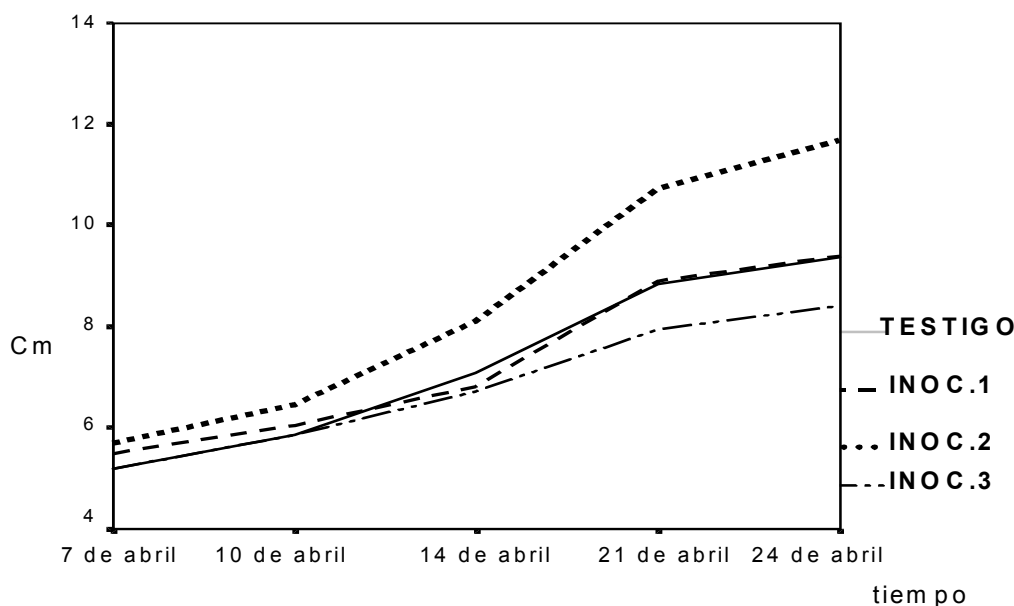


GRÁFICO N°4: Dinámica del crecimiento en altura de plantines de pimienta (*Capsicum annum* L.).

CUADRO N° 3: Valores medios de Altura y Peso seco de plantines de pimiento (*Capsicum annuum*) a los 40 días de emergencia.

Variable	Testigo	Inoculado 1 (en siembra)	Inoculado 2 (en siembra y a los 7 días)	Inoculado 3 (a los 7 días)
Altura (cm)	9.35	9.40	11.77 (* *)	8.40
Peso Seco (gr)	0.08	0.08	0.11 (* *)	0.15 (* *)

Los valores medios de Peso Seco resultaron con diferencias altamente significativas para los tratamiento **I 2** e **I 3** con respecto a los otros dos tratamientos. Estos resultados acompañan los valores de altura media del tratamiento **I 2** marcando las diferencias de este tratamiento con respecto a los demás; sin embargo, el tratamiento **I 3** que tiene los valores medio más bajos en altura revelan los valores medios más altos en peso seco. Estos resultados podrían estar ligados a un mayor crecimiento de la masa radical en este tratamiento (Cuadro N°3).

Estos resultados indicarían que la inoculación posterior a la siembra es más eficiente, ya que los tratamientos **I 2** e **I 3** presentaron la mejor evaluación en los parámetros altura y peso seco (Foto 1 y 2).

Hay que tener en cuenta que los valores de peso seco en este estadio de la planta constituye un parámetro de gran importancia, ya que el aumento del peso de los mismos, implica tener un plantín en mejores condiciones para el transplante.



FOTO 1: Altura de plantines de pimiento a los 40 días.



FOTO 2: Desarrollo radical de plantines de pimiento a los 40 días.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las condiciones ensayadas muestran en general cierta preponderancia, y en algunos parámetros diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos inoculados, por lo que se concluye:

- La inoculación de semillas de pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. Var. Trompa de elefante) con la bacteria *Azospirillum brasilensis* constituye una metodología económicamente posible que puede optimizar la germinación en lo que se refiere a velocidad, uniformidad y porcentajes finales; características que influyen directamente en el futuro productivo del cultivo.
- La inoculación repetida con *Azospirillum brasilensis*, en semilla y a los siete días posteriores a la siembra, produce una mejor respuesta en el desarrollo de plantines de pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L var. trompa de elefante)

BIBLIOGRAFÍA

- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.; REIS, V.; TEIXEIRA, K.; OLIVARES, F.; GOI, S.; BALDANI, V. y DOBEREINER, J. 1999. Fixação Biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. Inter-relação fertilidade biológica do solo e nutrição de plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Ciencia do Solo. LAVRAS - MG : 621-666.
- BASHAN, Y. 1993. "Potential use of *Azospirillum* as Biofertilizer". Turrialba: Vol. 43, Num.4. :286-291.
- BELLONE, C.H. 1997. Recuperación de la germinación de semillas de soja por inoculación con *Azospirillum*. Iº Biología del suelo. Fijación Biológica del Nitrógeno. Tucumán. Argentina.:123-125.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T. and PIETROSANTI, W. 1989. Phytohormone - like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. Plant Soil. 115: 151-153.
- CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Y BOTTINI, R. 2003. Promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum* sp. A través de la producción de giberelinas. ¿Un modelo alternativo para incrementar la producción agrícola?. Microbiología Agrícola. Un Aporte de la Investigación Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero.: 143-158.
- DOBEREINER JOHANNA..1991. "The Genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*". The Prokaryotes. Second Edition. Vol III- Chapter 109: 2236-2249.

- FERNANDEZ HERNANDEZ, R.; SAURA LARÍA, G.; MICHELENA, G.; DALLA SANTA, O. y SOCCOL, R. 2000. "Obtención de inoculante *Azospirillum* y su implicación agronómica en cultivos de interés económico para Cuba y Brasil". XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y Defensa del Medio Ambiente. Arequipa. Perú. *Annales Científicos XX RELAR.*: 250 - 258.
- FORNASERO, L.V.; TONUETTI, M.; GAMBAUDO, S. y MICHELOUD, H. 2001. "*Azospirillum* y *Azorhizobium*: se efecto sobre el rendimiento del cultivo de maíz". III Reunión Nacional Científica y Técnica de Biología del Suelo. III Encuentro sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Universidad Nac. de Salta. Facultad de Ciencias Naturales: 65.
- I.S.T.A. (International Seed Testing Association). 1993. *Seed Sci. & Technol.*, 21, Supplement international rules for seed testing rules 1993. International Seed Testing Association Zürich, Switzerland. :160-165.
- IGLESIAS, M. C.; LIFSCHITZ, V.; MICELLI, G.; ROMERO, E. y DÍAZ I. "Inoculación y coinoculación con *Azospirillum sp* y *Saccharomyces sp* el transplante de tomate"[4p] [en línea] (2001)<http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/5-Agrarias/A-077.pdf> [Consulta:5 Mayo de 2002]
- KILLIAN, S.; PAZ, I. y TAPIA, A.M. 1999. Efecto de la escarificación y la preincubación en sales de K sobre la evolución del CO₂, la germinación y la emergencia en *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz. II° Biología del suelo. Fijación biológica del nitrógeno. Catamarca. Argentina. :139-141.
- MONZÓN DE ASCONEGUI, M. A. 2003. *Azospirillum* y su interacción con las plantas. Microbiología Agrícola. Un Aporte de la Investigación Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero.: 131-142
- NUEZ, F.; DIEZ, M.J.; RUIZ, J.J.; FERNÁNDEZ de CÓRDOVA, P.; COSTA, J.; CATALÁ, M.S.; GONZALEZ, J.A. y RODRIGUEZ, A. 1998. Catálogo de semillas de Pimiento. Banco de Germoplasma de la Universidad Politécnica de Valencia. España. :13.
- OKON Y. and LABANDERA-GONZALES. 1994. "Agronomic Application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Review. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 26, N° 12:1591-1601.
- PAUNERO, I. "Pimentón argentino: calidad de exportación". [4p.]. [en línea]. (2001, jun.). <<http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.8FC87E50-47CA-4440-AC4B84C75B97494A/>>. [consulta: 5 abr. 2002].
- PILATTI, R.A. y FAVARO, J. C. 2000 "Cultivo de pimiento bajo invernadero"[3p]. [en línea]. <<http://www.e-campo.com/media/news/ni/althorticultura18.htm>>.[consulta: 4 de sept. 2002].

- PUENTE, M. L. y PERTICARI A. .2001. "Evaluación de *Azospirillum* como potencial Biofertilizante en gramíneas forrajeras subtropicales. Experimentos preliminares". III Reunión Nacional Científica y Técnica de Biología del Suelo. III Encuentro sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Universidad Nac. de Salta. Facultad de Ciencias Naturales: 63.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. and DOBEREINER, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilensis* sp. nov. Can. J. Microbiol, 24: 967-980.