

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE (*Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*) EN LA ABSORCIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE GRANO EN TRIGO (*Triticum aestivum* L.).**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

BERTA ROCÍO MONTECINOS RIVERA

TEMUCO – CHILE

2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE (*Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*) EN LA ABSORCIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE GRANO EN TRIGO (*Triticum aestivum L.*).**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

BERTA ROCÍO MONTECINOS RIVERA  
PROFESOR GUIA: HERNÁN PINILLA QUEZADA  
TEMUCO – CHILE

2012

**EFFECTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE (*Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*) EN LA ABSORCIÓN DE NITRÓGENO Y PRODUCCIÓN DE GRANO EN TRIGO (*Triticum aestivum L.*).**

PROFESOR GUIA : HERNÁN PINILLA QUEZADA  
Ingeniero Agrónomo, Magíster en  
Fertilidad de Suelos  
Universidad de La Frontera.

PROFESORA CONSEJERA : MARIBEL PARADA IBÁÑEZ  
Profesora de Estado en Biología y  
Ciencias Naturales, Doctora en Biología  
Celular y Molecular  
Universidad de La Frontera.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS :

## DEDICATORIA

*Todo mi trabajo se lo dedico a mis amados padres Ireño Montecinos y Margot Rivera, quienes fueron, son y serán la fuerza que me impulsa cada día.*

*Para ellos todo mi esfuerzo y dedicación, porque cada suspiro encontré en ellos refugio, apoyo, aliento y motivación.*

## AGRADECIMIENTOS

*Doy gracias a todos quienes en el transcurso de mi odisea hacia el término de mi tesis colaboraron con una palabra, sabiduría, gesto y afecto para llegar a la cima.*

*... A mi familia entera por su incondicional amor y ánimo,  
... a Cristian quien me entregó amor, compañía y energía,  
... a mis amigas por depositar en mí confianza y fuerza.*

*Quiero agradecer además a mi profesor guía Hernán Pinilla por su disposición, experiencia y sabiduría, a mi profesora consejera por su motivación y conocimientos, al profesor Héctor Sanhueza por su laboriosa ayuda en terreno y al profesor Horacio Miranda por su voluntad y generosidad al colaborar con sus conocimientos de análisis estadístico.*

## INDICE

Capítulo		Página
1	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2	<b>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	3
2.1	Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	3
2.1.1	Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN)	4
2.1.2	Colonización diazotrofa	5
2.2	Inoculación de bacterias diazotróficas en plantas	7
2.2.1	Antecedentes de <i>Azospirillum spp.</i> y <i>Azotobacter spp.</i>	8
3	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	12
3.1	Ubicación del ensayo	12
3.1.1	Clima	12
3.1.2	Suelo	12
3.2	Cultivares	13
3.3	Diseño experimental	14
3.4	Manejo agronómico	16
3.5	Evaluaciones	16
3.6	Análisis estadístico	18
4	<b>PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS</b>	19
4.1	Índice de verdor	19
4.2	Absorción de Nitrógeno de la planta a Z-75	24
4.3	Rendimiento de grano	27
4.4	Contenido de gluten húmedo	30
4.5	Sobrevivencia de bacterias	32
5	<b>CONCLUSIONES</b>	35
6	RESUMEN	36
7	SUMMARY	37
8	<b>LITERATURA CITADA</b>	38
9	<b>ANEXOS</b>	41

## 1 INTRODUCCIÓN.

En los cultivares de trigo la fertilización se considera como uno de los principales factores que afecta su producción. Uno de los nutrientes más influyente es el nitrógeno, el cual es el más requerido por el cultivo. Su importancia recae en la determinación del crecimiento vegetativo de la planta, relacionado con el número de macollos/planta, y el desarrollo reproductivo que tendrá con posterioridad, como es el número de espigas/planta y número de granos/espiguilla. Por ende una fertilización nitrogenada óptima aumenta el rendimiento y calidad de trigo.

El uso continuo de fertilizantes en los cultivos trae consigo la contaminación de aguas subterráneas y alteración de los microorganismos nativos del suelo. Por lo cual la biofertilización es una alternativa a considerar en el manejo de la fertilización nitrogenada, ya que promueve ventajas en rendimiento y calidad sin provocar desmedro para el medio ambiente.

La aplicación de biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno tales como *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*, es una opción que busca optimizar la producción de cultivos, manteniendo la biodiversidad y reduciendo la contaminación ambiental.

Las especies *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* actúan fijando nitrógeno atmosférico, ya que constan de un sistema enzimático, la nitrogenasa, la cual es la responsable de la reducción del nitrógeno. De manera que el nitrógeno orgánico es transformado a inorgánico, fuente que sí puede ser asimilada por la planta.

Estas bacterias diazotróficas han demostrado sus efectos beneficiosos en numerosas investigaciones, sin embargo su efectividad a nivel de campo aún es incierta, ya que los resultados de su aplicación no siempre son los esperados, dado que inciden diversos factores, tales como la actividad microbiana del suelo, las características físicas y químicas del suelo, la concentración de bacterias del producto y las condiciones climáticas, entre otros.

De acuerdo a lo anterior se plantea como hipótesis que las bacterias *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp., que componen el biofertilizante Twin N, incrementan la absorción de nitrógeno del trigo (*Triticum aestivum*), el rendimiento de grano y el contenido de gluten húmedo.

Con el propósito de corroborar la hipótesis planteada se diseñó una investigación con el siguiente objetivo general:

Evaluar el efecto del biofertilizante comercial TwinN sobre la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum*).

Además en función a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos específicos:

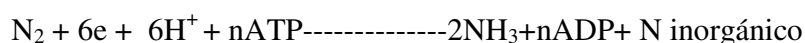
1. Evaluar mediante lecturas SPAD el índice de verdor de las plantas de trigo tratadas con *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp.
2. Determinar la absorción de N total en la planta de trigo en estado de grano lechoso por efecto del biofertilizante Twin N.
3. Cuantificar el rendimiento de grano de los cultivares según tratamiento.
4. Determinar el contenido de gluten húmedo del grano de trigo a cosecha obtenido por la aplicación de biofertilizante Twin N.
5. Determinar sobrevivencia de *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp. en el suelo una vez realizada la cosecha.



## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

Todos los microorganismos fijadores de nitrógeno convierten el N<sub>2</sub> a su forma inorgánica mediante la actividad del complejo enzimático nitrogenasa, proceso en el cual actúan además otras proteínas, como la ferredoxina y la flavodoxina, cuya función es donar electrones y actuar como reductores de la nitrogenasa (Baca *et al.*, 2000). El sistema requiere de una disponibilidad energética proporcionada por los ATPs y de un fuerte agente reductor. Mediante la acción de este sistema, una molécula de N<sub>2</sub> es convertida en dos moléculas de amonio, según la siguiente reacción general:



La fijación biológica nitrogenada tiene un gasto considerable de energía, por lo cual los microorganismos han seleccionado mecanismos para inactivar a la enzima cuando está disponible el nitrógeno combinado; esto le permite mantener las necesidades del microorganismo y evitar un gasto energético inútil (Baca *et al.*, 2000). La reducción de nitrógeno requiere un gasto energético de alrededor de 12 a 16 moléculas de ATP por cada molécula de nitrógeno fijada en condiciones de laboratorio, en cambio en condiciones naturales se ha estimado que la demanda energética es mucho mayor de 20-30 moléculas de ATP (Baca *et al.*, 2000).

La fijación biológica de nitrógeno molecular la llevan a cabo diversos géneros de bacterias, algunos de estos se encuentran en la rizósfera en vida libre, y otros géneros bacterianos forman asociaciones mutualistas con plantas (Saribay, 2003).

Existen factores que inciden en la actividad del complejo de la nitrogenasa, tales como: la presencia de O<sub>2</sub>, no obstante algunos microorganismos han desarrollado adaptaciones metabólicas y estructurales para llevar a cabo la fijación de nitrógeno; la presencia de formas reducidas de

nitrógeno en el ambiente; la presencia de altas concentraciones de amoníaco, nitrato, urea y ciertos aminoácidos inhiben la actividad de la nitrogenasa. El grado de inhibición que causan los últimos tres depende de la facilidad con que un organismo en particular pueda convertirlos a amoníaco (Fuentes y Massol, 2002).

**2.1.1 Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).** Presentan una muy amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y de asociación con las plantas. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de especies son capaces de realizar la fijación; 87 especies en dos géneros de arqueobacterias, 38 de bacterias, y 20 géneros de cianobacterias se han identificado como diazótrofes (Baca *et al.*, 2000).

Las bacterias diazótrofes asimbióticas son aquellas que pueden fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas. Estas bacterias se encuentran en la mayoría de los hábitats. Pueden ser de vida libre, o bien, de asociación, refiriéndose a esta última a endófitas del tipo facultativa.

Entre los principales géneros bacterianos diazótrofes asimbióticos se encuentran las especies *Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, *Azotococcus spp.*, *Azotomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Beijerinckia spp.*, *Bacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Chromatium spp.*, *Chlorobium spp.*, *Desulfovibrio spp.*, *Desulfomonas spp.*, *Gluconacetobacter spp.*, *Herbaspirillum spp.* y *Klebsiella spp.* (Rodríguez *et al.*, 2003).

El género *Azotobacter spp.* es aerobio estricto, pertenece al grupo de bacterias Gram<sup>-</sup>, posee mecanismos de protección de la nitrogenasa, lo cual le otorga la capacidad de fijar N<sub>2</sub> en condiciones ambientales en presencia de oxígeno. *Azospirillum spp.* también corresponde a Gram<sup>-</sup>, pero a diferencia de *Azotobacter spp.*, no posee mecanismos para proteger la nitrogenasa, y puede comportarse como aerobio cuando no fija nitrógeno y está en presencia de nitrógeno combinado (Frioni, 1999).

De acuerdo a la eficiencia de fijación de nitrógeno, los microorganismos fijadores de vida libre, como el género *Azotobacter spp.*, tienen un escaso rendimiento fijador, debido a que

consumen mucha energía en el proceso y los substratos necesarios para obtener tal energía son poco abundantes en la biosfera circundante (Rodríguez *et al.*, 1984).

**2.1.2 Colonización diazótropa.** Las condiciones ambientales y las características de los microorganismos nativos e introducidos son factores determinantes para la sobrevivencia y actividad en la rizósfera (Kozdroj *et al.*, citado por Abril *et al.*, 2006). Tal es el caso de *Azotobacter* que crece mejor en suelos neutros a alcalinos mesofílicos, siendo el pH óptimo de 7,0-7,5 y su límite inferior de 5,5 (Carrillo, 2003). Por otra parte existen factores bióticos que influyen sobre la supervivencia de los microorganismos en el suelo, tales como la predación por protozoarios, el antagonismo microbiano y la competencia, así como el estado fisiológico en el que se introduce la bacteria (Vandenhove *et al.*, 1993).

En el suelo existen diversos microorganismos que pueden interactuar con las bacterias diazotróficas, algunos estudios han demostrado que la interacción entre *Azospirillum* y la flora nativa en el suelo, teniendo en consideración que la población de *Azospirillum* es sólo una diminuta fracción de la comunidad microbia en la rizósfera, es plausible suponer que muchos otros microorganismos afectarán su competencia positiva o negativamente. De hecho la asociación con las raíces sólo puede tener éxito si es capaz de mantener una población significativa en el entorno rizosférico.

Las bacterias mediante la quimiotaxis y movilidad pueden acercarse a las raíces para obtener los exudados radicales para su alimentación, ya que estos son su fuente de carbono y energía. No obstante el mecanismo exacto del género *Azospirillum* para la interacción con la raíz aún no es bien conocido (Steenhoudt y Vanderleyden, citado por Collados, 2006).

Bashan *et al.*, (2007) menciona que la adhesión de las bacterias con las raíces de la planta es un factor determinante para una asociación permanente. Si *Azospirillum* no se adhiere a las células radicales, las sustancias excretadas por las bacterias no son aprovechadas por la planta objetivo, y si esta adhesión es débil, estas pueden ser fácilmente removidas por el agua, dejando sitios que pueden ser colonizados por otras bacterias del tipo no benéficas.

Los efectos beneficiosos para las plantas al introducir bacterias benéficas dependen, en gran medida, de un establecimiento oportuno y de su persistencia a lo largo de la estación de crecimiento de la raíz (Schippers *et al.*, citado por Loredo *et al.*, 2004b).

**Cuadro 1.** Distribución de las bacterias aerobias y anaerobias en un suelo expresado como miles por gramo.

Profundidad (cm)	Bacterias	
	Aerobias	Anaerobias
3-8	7.800	1.950
20-25	1.800	379
35- 40	472	98

Fuente: Carrillo, 2003.

En el Cuadro 1 se puede observar que la flora nativa es más abundante y/o activa en los primeros centímetros del suelo, a nivel de la rizósfera mayoritariamente, lo que supone que la competencia o interacción con las bacterias diazotróficas es mayor en el rango de los 3-8 centímetros.

Abril *et al.*, (2006) demostró que no existe diferencia en el grado de colonización entre cultivos de verano e invierno, al igual que entre los cultivos trigo, maíz y pasturas. Sin embargo en esta misma investigación se presentaron diferencias en el grado de colonización entre los cultivares de trigo agrupados según duración del ciclo fenológico.

## 2.2 Inoculación de bacterias diazotróficas en plantas.

La inoculación de bacterias es una práctica que se efectúa con la finalidad de otorgar al cultivo aportes nutricionales mediante la fijación de nitrógeno y otros beneficios como los bioestimuladores de crecimiento.

Los bioinoculantes o biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera (Vessey, 2003).

Los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, (1996) señalaron que la respuesta a la inoculación varía en función del grado de fertilidad y la disponibilidad de agua de los suelos, observando la gran importancia que puede adquirir la relación cepa-cultivar. Reyes *et al.*, (2008) encontraron que al inocular pimentón y maíz con *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* se expresó cierta especificidad según cepa, aunque algunas cepas fueron compatibles con ambos cultivos.

De acuerdo a los beneficios que pueden provocar estos microorganismos en el trigo, se ha observado que las bacterias diazotróficas tienen efecto sobre el crecimiento de la raíz y resistencia al estrés osmótico por aumento de clorofila, K, Ca, azúcares solubles (Vessey, 2003), además, se ha reportado incremento del contenido de nutrimentos en plantas de trigo y algodón (Narula *et al.*, citado por Reyes y Valery, 2007). En particular, el género *Azospirillum* ha sido utilizado como agente promotor del crecimiento vegetal debido a su capacidad para fijar nitrógeno (Acebo *et al.*, 2007).

Por otra parte es importante conocer la concentración de bacterias del producto, cuantas unidades formadoras de colonia por ml. se están inoculando. En general para *Azospirillum* se ha observado que el nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivos comerciales, es de alrededor de  $10^5$ -  $10^6$  ufc/ml (Bashan, 1989). En

caso contrario una concentración de inóculo de  $10^8$ - $10^{10}$  ufc/ml, generalmente inhibe el desarrollo radicular (Bashan, 1990).

**2.2.1 Antecedentes de *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*** En los cultivos sometidos a inoculaciones a nivel de campo de *Azotobacter* y *Azospirillum*, el incremento de rendimiento generalmente oscila entre un 10-30% (Fulchieri y Frion citados por Bashan *et al.*, 2007). En trigo la inoculación con *Azospirillum* incrementó significativamente el rendimiento a la cosecha, desde 23% hasta 63% (Caballero *et al.*, citado por Bashan *et al.*, 2007). Los resultados con altos rendimientos se han debido en gran parte a la utilización de parcelas de características no usuales, tales como suelos pobres en nutrientes, riego ineficiente, condiciones climáticas inapropiadas para el cultivo en particular (Bashan *et al.*, 2007). La evaluación de datos de 20 años de experimentos de campo mostró que fueron exitosos un 60-70% de todos, con un aumento de rendimiento entre el 5 y 30% (Frioni, 1999).

El mejor desempeño de *Azospirillum* en condiciones de campo está usualmente asociado con condiciones de deficiencia de agua y fertilización para la planta, y ocurre principalmente bajo condiciones adaptadas para agricultura de zonas semi-áridas.

Han sido numerosas las investigaciones que demuestran que la inoculación con *Azospirillum spp.* es beneficiosa, sin embargo la respuesta en condiciones de campo a menudo es poco consistente (Kozdroj *et al.*; Schulze y Pschel, citados por Abril *et al.*, 2006). De manera que, la inoculación con *Azospirillum spp.* está asociada a resultados impredecibles e inconstantes (Kaushik *et al.*; Saubidet *et al.*, citados por Abril *et al.*, 2006).

También se debe considerar que según el escenario en el cual se encuentre la planta, los resultados pueden variar. Jofré *et al.*, citado por Diaz *et al.* (2004), indica que en condiciones adversas como estrés salino severo, *Azospirillum sp.* no puede ni siquiera adherirse a la raíz de la planta. Además la inoculación con *Azospirillum* puede provocar cambios significativos en varias variables del crecimiento de la planta, las cuales pueden o no afectar el rendimiento (Bashan *et al.*, 2007).

Estudios experimentales que se han realizado en Argentina muestran antecedentes contradictorios en relación a los resultados en cuanto a la aplicación de *Azospirillum brasilense*, en la región semiárida los resultados fueron positivos (Rodríguez *et al.*, 1996), en cambio en Córdoba hubo ausencia de respuesta frente a las inoculaciones (Olmedo *et al.*, citado por Díaz *et al.*, 2004).

En el caso de *Azotobacter sp.*, existen experimentos que no siempre dan resultados esperados. Aún cuando se reconoce su beneficio potencial en la fijación de nitrógeno al asociarse con gramíneas, la literatura señala que, en general, este beneficio se debe a una asociación espontánea, que raramente puede ser manejada como una práctica agrícola más, en especial en las zonas áridas (Kennedy y Tchan, 1992).

Dibut (2006), realizó en Rusia inoculación de *Azotobacter spp.*, sus resultados fueron variables de acuerdo a la especie y localidad (Dibut, 2006). En el cuadro 2 se observan los incrementos de rendimiento de la aplicación del producto Azotobakterin en distintas especies gramíneas cultivadas.

**Cuadro 2.** Promedio de incremento de rendimiento obtenido por la aplicación de Azotobacterin en especies gramíneas.

Cultivo	Nº de experimentos	Promedio de incremento del rendimiento (%)
Trigo	164	7,7
Avena	77	8,0
Cebada	60	12,8
Centeno	15	6,6
Maíz	9	15,5

Fuente: cuadro modificado y extraído de Dibut, 2006.

Las grandes variaciones en la efectividad del biofertilizante se debieron a errores cometidos en la elección de cepas, ya que estas no tenían la misma capacidad de adaptación para todos los tipos de suelos existentes en Rusia.

En el Cuadro 3 se observan los resultados de rendimiento de la inoculación de *Azospirillum* en trigo, obtenidos por Ventimiglia *et al.*, (2000).

**Cuadro 3.** Efecto de la inoculación de *Azospirillum* en el rendimiento de trigo.

Tratamientos	Rendimiento (kg/ha)
Testigo	3.570 b
Testigo + <i>Azospirillum</i>	3.873 b
FDA + Urea	4.304 ab
FDA + Urea + <i>Azospirillum</i>	4.908 a

D.MS. (5%) kg/ha CV (%)=9,9. Letras distintas indican diferencias significativas.

Fuente: Ventimiglia *et al.*, 2000.

En el Cuadro 3 Ventimiglia *et al.*, (2000), al comparar el testigo versus el testigo inoculado, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, obtuvieron que el agregado de *Azospirillum* produjo un incremento del 8,5% en el rendimiento. El efecto de esta bacteria sobre



el trigo fertilizado con un esquema de fertilización medio, originó un aumento de rendimiento de 600 kg/ha, es decir, un 14% más respecto al tratamiento fertilizado pero no inoculado.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Ubicación del ensayo.

La investigación fue realizada durante la temporada 2010 - 2011, en el Campo Experimental Maquehue perteneciente a La Universidad de La Frontera, ubicado en la IX región de La Araucanía, comuna de Freire, sector Maquehue, a 15 kilómetros de Temuco, en las coordenadas 38°45` Latitud Sur y 72°38` longitud oeste, a 74 m.s.n.m.

**3.1.1 Clima.** El clima del área agroclimática del Llano central de la región de La Araucanía corresponde a mediterráneo frío, se caracteriza por presentar bajas temperaturas en invierno, período libre de heladas desde el mes de diciembre hasta el mes de febrero y un déficit hídrico que oscila entre 3 a 4 meses (Rouanet, *et al.*, 1988).

**3.1.2 Suelo.** La investigación se realizó en un suelo Andisol de la serie Freire, de origen volcánico, con alto potencial productivo para trigo. Corresponde a suelos de posición baja, topográficamente planos a ligeramente ondulados, que ocupan terrazas fluviales o terrazas remanentes. La densidad aparente ( $D_a$ ) de la serie Freire es igual a 0,82 g cc<sup>-1</sup>, propio de un suelo andisol (Tosso, 1985). Las principales características químicas del suelo utilizado se presentan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Caracterización química del suelo del lugar de los ensayos.

<b>Característica</b>	<b>Contenido</b>
pH (en agua)	5,72
Fósforo (mg/kg)	14
Potasio (mg/kg)	149
Sodio (cmol+/kg)	0,15
Calcio (cmol+/kg)	4,2
Magnesio (cmol+/kg)	0,53
Aluminio (cmol+/kg)	0,06
Saturación de Al (%)	1,13
Suma de bases (cmol+/kg)	5,29

\* A una profundidad de suelo de 0-20 cm.

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico de Suelos y Plantas del Instituto de Agroindustria, Universidad de La Frontera.

### **3.2 Cultivares.**

Se utilizaron los cultivares Kumpa y Puelche, el primero posee un hábito de desarrollo invernal, crecimiento muy rastrero al estado de plántula, abundante y vigorosa macolla. Sus hojas son de color verde muy oscuro y hoja bandera semierecta. El trigo Puelche posee hábito de desarrollo alternativo, crecimiento semirastrero y tolerancia a la acidez del suelo.

### 3.3 Diseño experimental.

El diseño experimental de establecimiento consistió de un diseño factorial de AxB distribuido en bloques completamente al azar. El diseño constó de 48 parcelas experimentales de 2 x 6 metros.

Los factores evaluados fueron:

A. Biofertilizante: - Con Twin N  
- Sin Twin N

B. Dosis de nitrógeno: - 100 kg N  
- 150 kg N  
- 200 kg N

Twin N es un fertilizante biológico desarrollado en base a bacterias fijadoras de nitrógeno, presentadas en una formulación liofilizada. La composición del producto es de 1.000.000 ufc/gr. de *Azotobacter spp.* y 1.000.000 ufc/gr. de *Azospirillum spp.*

La preparación del biofertilizante Twin N consistió en la rehidratación de las bacterias liofilizadas contenidas en el envase en 50 ml de agua destilada, luego se diluyeron en 200 litros de agua por hectárea, para asperjar 250 cc de la solución por parcela experimental. Las inoculaciones se realizaron en estado de primer macollo para el cultivar Kumpa y en estado de 5 hojas desplegadas para el cultivar Puelche.

El momento de aplicación de los tratamientos son indicados en los cuadros 5 y 6.

**Cuadro 5.** Aplicación de Twin N y cantidad de N ha<sup>-1</sup> en trigo Kumpa según tratamiento y estado fenológico.

<b>Tratamientos</b>	<b>N a la siembra ( Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>N a Z-21 (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>N a Z-30 ( Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrógeno Total (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>
100 kg N	30	30	40	100
100 kg N + Twin N	30	30	40+Twin N	100
150 kg N	30	50	70	150
150 kg N + Twin N	30	50	70+Twin N	150
200 kg N	30	70	100	200
200 kg N+ Twin N	30	70	100+Twin N	200

\* Z-21 corresponde al estado fenológico de primer macollo y Z-30 a la erección del pseudotallo.

**Cuadro 6.** Aplicación de Twin N y cantidad de N ha<sup>-1</sup> en trigo Puelche según tratamiento y estado fenológico.

<b>Tratamientos</b>	<b>N a la siembra ( Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>N a Z-21 (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>N a Z-30 ( Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrógeno Total (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>
100 kg N	30	30	40	100
100 kg N + Twin N	30	30+Twin N	40	100
150 kg N	30	50	70	150
150 kg N + Twin N	30	50+Twin N	70	150
200 kg N	30	70	100	200
200 kg N+ Twin N	30	70+Twin N	100	200

\* La aplicación de Twin N fue a Z-15, estado cercano a Z-21.

### 3.4 Manejo agronómico.

De acuerdo al hábito de desarrollo de cada cultivar la siembra se realizó el 13 de mayo para el cultivar Kumpa y el 08 de junio para el cultivar Puelche, siendo ambas efectuadas en la temporada 2010. La dosis de semilla fue de 180 kilos  $\text{ha}^{-1}$  con un sistema de siembra en surcos en línea continua a una distancia entre hilera de 17,5 cm.

La fertilización base utilizada en la siembra fue de 30 unidades de nitrógeno aplicadas al voleo para cada una de las parcelas experimentales, vía Urea. Además se aplicaron  $\text{P}_2\text{O}_5$  166 unidades/ha, CaO 72 unidades  $\text{ha}^{-1}$  y B 2,0 unidades  $\text{ha}^{-1}$ . Los productos comerciales utilizados fueron Superfosfato triple y Boronatrocaltita, respectivamente.

Como medida fitosanitaria se aplicó Iodosulfuron-metil-sodium + Mesosulfuron-meti (Cossack) en dosis de 400 g  $\text{ha}^{-1}$  para el control de malezas y Prothioconazole + Tebuconazole (Prossaro) en dosis de 800 cc  $\text{ha}^{-1}$  para prevenir enfermedades fúngicas.

### 3.5 Evaluaciones.

**Lecturas SPAD.** Se determinó el índice de verdor (I.V.) de las plantas en distintos estados fenológicos según la escala de Zadoks, en Z-32, Z-45 y Z-59, a través de clorofilómetro N- tester Minolta- 502, aparato no destructivo que mide el I.V. en unidades SPAD, estas lecturas instantáneas corresponde al contenido de clorofila presente en la hoja (Takebe y Yoneyama, citado por Marques *et al.*, 2003). La medición se realizó de manera homogénea, muestreando 30 plantas por parcela experimental, específicamente sobre la última hoja expandida o en la hoja bandera a partir de espigazón, a nivel medio de la lámina para ambos casos.

**Nitrógeno total.** Se determinó el contenido de nitrógeno total absorbido por la planta a Zadoks 75. Se procedió a cortar manualmente la planta entera a nivel del suelo, un metro lineal por parcela, posteriormente cada muestra fue sometida a la estufa a una temperatura de 65°C hasta

obtener peso constante, luego se realizó su molienda en un micromolino, obteniendo así una muestra compuesta de las cuatro repeticiones de cada tratamiento por cultivar.

**Rendimiento de grano.** Se cortaron de forma manual las seis hileras centrales de trigo de cada parcela experimental y se trillaron en una máquina estacionaria, diseñada para bajos volúmenes. Los kilos de grano total promedio fueron expresados en  $\text{qqm}^{-1}$  y estandarizados a 14% de humedad.

**Contenido de gluten húmedo.** Se obtuvo una muestra compuesta de grano a partir de las cuatro repeticiones de cada tratamiento por cultivar. En el laboratorio se obtiene mediante un centrifugado de 1 minuto a 6.500 rpm que permite eliminar de igual manera toda el agua residual. Los resultados de gluten húmedo, siendo éste la proteína insoluble, están correlacionados con el contenido en proteína total de la muestra.

**Sobrevivencia *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*** Posterior a la cosecha se obtuvo de cada parcela experimental de trigo Kumpa, a 20 cm. de profundidad una muestra de suelo constituida de 6 submuestras que fueron extraídas de la líneas de surco cerca de la base de la planta.

Las muestras de suelo de las cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron mezcladas, obteniendo así una muestra representativa por tratamiento, estas fueron puestas en bolsas plásticas y rotuladas para su identificación. En el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*, se utilizaron los medios de cultivo FBN y Ashby, respectivamente, debido a la especificidad de cada uno con el género correspondiente. Al sexto día de la siembra de cultivo se contabilizaron las muestras obtenidas.

El análisis de nitrógeno total de la planta fue realizado en el Laboratorio de Análisis Químico de Suelos y Plantas del Instituto de Agroindustria de la Universidad de La Frontera.

El análisis de gluten húmedo del grano fue realizado en el Laboratorio de Calidad de Trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA Carillanca).

Los análisis de sobrevivencia de *Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*. fueron realizados en el laboratorio de Microbiología y Rizobiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera.

### **3.6 Análisis estadístico.**

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de grano y contenido de clorofila (I.V.), los resultados fueron sometidos al Análisis de Varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando el programa estadístico computacional JMP.



## 4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 4.1 Índice de Verdor.

En el cuadro 7 se presenta el índice de verdor (I.V.) promedio de los cultivares Kumpa y Puelche a Z-32, mediante lecturas SPAD.

**Cuadro 7.** Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el índice de verdor de los cultivares Kumpa y Puelche a Z-32.

		Índice de verdor promedio (unidades SPAD)		
Cultivar	Dosis N (kg ha <sup>-1</sup> )	Sin Twin N	Con Twin N	
Kumpa	100	599,25	624,50	612,00 b
	150	622,00	639,50	630,75 ab
	200	645,25	643,75	644,50 a
		622,16	636,00	
Puelche	100	615,50	612,00	613,75
	150	613,25	634,25	623,75
	200	630,00	627,50	628,75
		619,58	624,58	

Cifras con letras distintas son diferentes según prueba de Tukey (p<0,05).

Las lecturas SPAD promedio del trigo Kumpa y Puelche no presentaron diferencia significativa por efecto de la aplicación de Twin N. Estos resultados difieren con lo mencionado por Vessey (2003), quien señala que las bacterias diazotróficas aumentan la cantidad de clorofila.

Una posible causa de la inexistencia de respuesta a la inoculación de bacterias en los cultivares Kumpa y Puelche pudo ser la aplicación de nitrógeno con urea a la siembra, a Z-21 y

Z-30, ya que la presencia de altas concentraciones de amonio y nitrato inhiben la actividad de la nitrogenasa (Fuentes y Massol, 2002).

En el cultivar Kumpa se produjo diferencia significativa en función de la dosis nitrogenada, el índice de verdor aumentó a mayor dosis de este nutriente. En cuanto al cultivar Puelche no existió diferencia significativa.

En el cultivar Kumpa los resultados concuerdan con lo mencionado por Gandrup *et al.*, (2004), quienes monitorearon mediante clorofilómetro el contenido de nitrógeno del cultivo de trigo, obteniendo los valores más altos de índice de verdor en el sitio de mayor fertilidad nitrogenada.

El índice de verdor es afectado por numerosos factores como genotipos, estado de crecimiento, nutrientes, enfermedades o ataques de insectos y, condiciones ambientales al momento de la medición (Fox *et al.*, citado por Gandrup *et al.*, 2004). De estos factores el genotipo pudo ser determinante en el índice de verdor de los cultivares Kumpa y Puelche, fundamentando la diferencia de los resultados.

Además Quemada *et al.*, (2005), menciona que el verdor de las hojas y por tanto la lectura del clorofilómetro puede verse afectado por las diferencias genéticas de las variedades. De acuerdo a las características genotípicas, el cultivar Kumpa es más exigente en cuanto a requerimiento nitrogenado que el cultivar Puelche (1), lo que fundamenta los resultados distintos frente a la dosis nitrogenada. El cultivar Kumpa al ser más exigente responde de manera más notoria frente al incremento de dosis de nitrógeno, lo que explica las diferencias significativas en el índice de verdor.

(1) Comunicación personal: Hernán Pinilla Quezada, Ingeniero Agrónomo, Magíster en Fertilidad de Suelos.

En el cuadro 8 se presenta el índice de verdor promedio a Z-44 de los cultivares Kumpa y Puelche con y sin aplicación de Twin N a distintas dosis de nitrógeno.

**Cuadro 8.** Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el índice de verdor de cultivares Kumpa y Puelche, expresado en unidad SPAD a Z-44.

		Índice de verdor promedio (unidades SPAD)		
Cultivar	Dosis N (kg ha <sup>-1</sup> )	Sin Twin N	Con Twin N	
Kumpa	100	595,50	608,00	601,75 b
	150	638,75	645,25	642,00 a
	200	653,00	665,00	659,00 a
		629,08	639,41	
Puelche	100	515,25	524,50	519,87 b
	150	524,50	526,50	525,50 b
	200	559,50	555,00	557,25 a
		533,08	535,33	

Cifras con letras distintas son diferentes según prueba de Tukey (p<0,05).

En ambos cultivares no se presentaron diferencias significativas en el I.V. por efecto de la aplicación de Twin N.

Al igual que las lecturas SPAD en Z-32 no hubo efecto de la inoculación de las bacterias en el índice de verdor, lo que nuevamente puede ser atribuido a la aplicación de nitrógeno, que inhibe el complejo nitrogenasa que fija el nitrógeno (Fuentes y Massol, 2002).

En función de la dosis nitrogenada sí hubo diferencia significativa para los cultivares Kumpa y Puelche, obteniéndose la mayor lectura SPAD al aplicar 200 kg de nitrógeno.

Los resultados de ambos cultivares concuerdan con lo mencionado por Gandrup *et al.*, (2004), quienes obtuvieron los valores más altos de índice de verdor en trigo en el sitio de mayor

fertilidad. Además concuerdan con lo mencionado por Melchiori *et al.*, (2003), quienes evidenciaron diferencia significativa en las lecturas SPAD en función del incremento de dosis de nitrógeno.

En el cuadro 9 se presenta el efecto de la aplicación de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el I.V. de los cultivares Kumpa y Puelche, obtenido a Z-59, mediante lecturas SPAD.

**Cuadro 9.** . Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el índice de verdor de cultivares Kumpa y Puelche, expresado en unidad SPAD a Z-59.

Cultivar	Dosis N (kg ha <sup>-1</sup> )	Índice de verdor promedio (unidades SPAD)		
		Sin Twin N	Con Twin N	
Kumpa	100	552,25	553,50	552,87 c
	150	594,25	593,00	593,62 b
	200	609,25	612,50	610,87 a
		585,25	586,33	
Puelche	100	501,75	508,25	505,00 c
	150	528,00	529,50	528,75 b
	200	555,25	552,00	553,62 a
		528,33	529,91	

Cifras con letras distintas son diferentes según prueba de Tukey (p<0,05).

Los resultados de índice de verdor promedio de ambos cultivares al aplicar Twin N no presenta diferencia significativa.

La aplicación del biofertilizante con dosis completa de fertilizante nitrogenado no permite fijar N, porque las plantas utilizan el que tienen a su alcance y las bacterias no gastan energía en la fijación (Dibut, 2006), lo que limitaría el efecto de las bacterias en el índice de verdor.

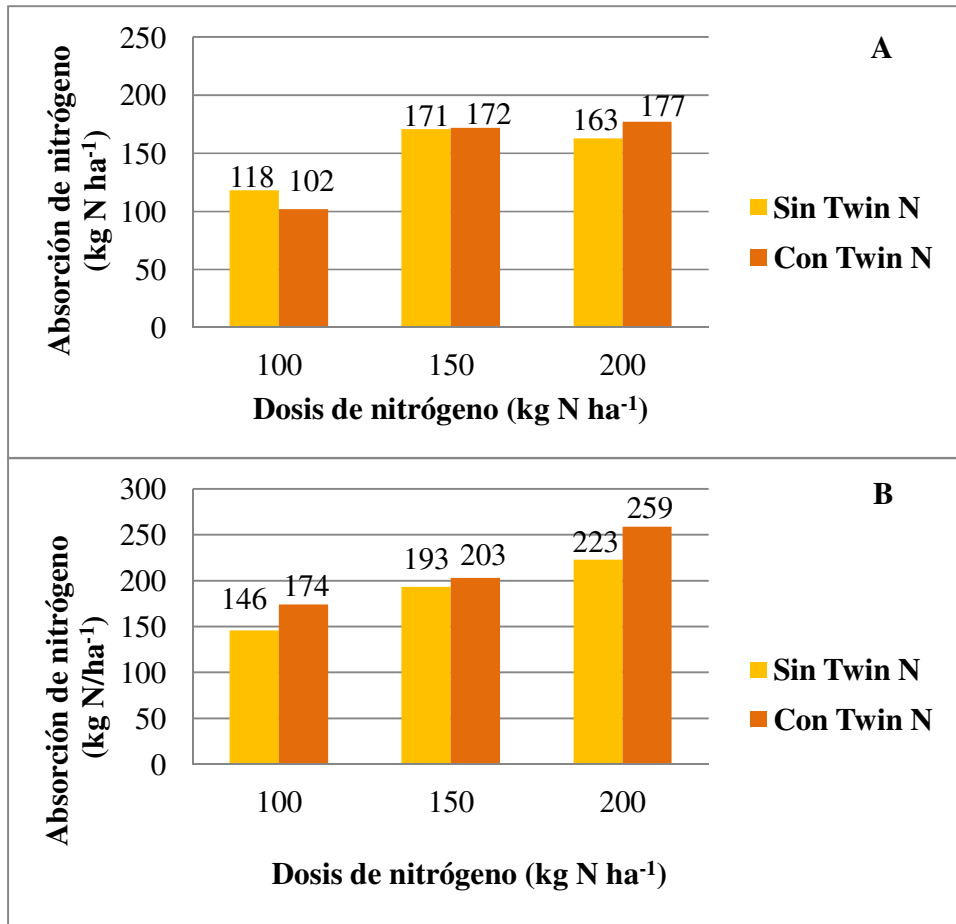
En función a la dosis nitrogenada existen diferencias significativas en el índice de verdor de los cultivares Kumpa y Puelche.

Los resultados de ambos cultivares al igual que en Z-44 coinciden con lo mencionado por Melchiori *et al.*, (2003), quienes evidenciaron diferencia significativa en las lecturas SPAD a Z-60 en función del aumento de dosis de nitrógeno. También concuerdan con Gandrup *et al.*, (2004), quienes obtuvieron valores de índice de verdor significativamente más altos en sitios de mayor fertilidad.

Por otra parte trabajos recientes en trigo harinero han demostrado que el índice de verdor de la hoja bandera determinado por el clorofilómetro Minolta SPAD 502 puede ser utilizado para predecir el contenido de proteína en grano (Echeverría y Studert, citado por García 2003). De acuerdo a los resultados de las lecturas SPAD, Quemada *et al.*, (2005), señala que con índice de verdor entre 600 y 700, existe una alta probabilidad de que el contenido de proteína en grano estará en el rango de 12 a 14,8%, en cambio si el índice de verdor es menor a 600, el contenido de proteína en grano probablemente será de un 12%. Por lo cual los cultivares Kumpa y Puelche poseen una alta probabilidad de tener un 12% de contenido de proteína en grano.

#### 4.2 Absorción de nitrógeno de la planta en Z-75.

En la Figura 1 se presenta el efecto de la aplicación de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en la absorción de nitrógeno a Z-75 de los cultivares Kumpa (A) y Puelche (B).



**Figura 1.** Efecto de Twin N y dosis de nitrógeno en la absorción de nitrógeno de cultivares Kumpa (A) y Puelche (B) a Z-75.

De acuerdo a los resultados de la Figura 1 A se observa que la absorción de nitrógeno del cultivar Kumpa no aumentó al aplicar Twin N, el promedio de absorción de N al aplicar Twin N es de 150,3 kg N ha<sup>-1</sup> el cual es similar al promedio sin aplicación de Twin N de 150,6 kg N ha<sup>-1</sup>.

Los resultados difieren por lo señalado por Andrews *et al.*, citados por Bashan *et al.*, (2007), quienes mencionan que después de la inoculación con *Azospirillum* existe un incremento en el nitrógeno total de brotes. Además difieren por lo señalado por López *et al.*, (2008), quien obtuvo resultados iguales en el contenido de nitrógeno en la planta de un tratamiento A con 70% de N en forma de urea más *Azotobacter spp.*, respecto a un tratamiento B con 100% de urea sin inocular, atribuyendo estos a la actividad fijadora por parte de las bacterias.

De acuerdo a lo mencionado por Loredó *et al.*, (2004a), la inoculación con bacterias diazotróficas incrementa la concentración de N en la planta, cuando las condiciones de N mineral son muy deficientes. Si la planta tiene cubiertos los requerimientos de N, el efecto de la inoculación no es evidente sobre la concentración de N. Por ende se puede decir que el contenido de nitrógeno de la planta no aumentó al inocular, debido a que se aplicó fertilización química vía Urea.

Además Fuentes y Massol, (2002), señalan que la presencia de formas reducidas de nitrógeno en el ambiente, tal como la presencia de altas concentraciones de urea, inhibe la actividad de la nitrogenasa.

En la Figura 1 B la absorción de nitrógeno del cultivar Puelche incrementa al aplicar Twin N, el valor promedio de 187,3 kg N ha<sup>-1</sup> sin Twin N es menor a 212 kg N ha<sup>-1</sup> con Twin N, produciéndose un aumento de un 13,2%.

Los resultados de absorción de nitrógeno del cultivar Puelche concuerdan con lo mencionado por Andrews *et al.*, citados por Bashan *et al.*, (2007), quienes aseveran que después de la inoculación con *Azospirillum* existe un incremento en el nitrógeno total de brotes.

Se ha sugerido que la absorción de nitrógeno de una planta inoculada con *Azospirillum* está asociada a un incremento general en el volumen del sistema radical y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz (Murty y Ladha, citados por Bashan *et al.*, 2007). Por otro lado, se sugiere que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo

sea más eficiente (Bashan *et al.*, 2007). De manera que para el cultivar Puelche es plausible suponer que estos efectos inciden en el incremento de la absorción de nitrógeno.

En la figura 1 al comparar los resultados de absorción de nitrógeno en función de la dosis nitrogenada, se puede observar que en ambos cultivares se produjo un incremento sostenido. En Kumpa (A) los incrementos medios fueron de 36% de la dosis 100 a 150 kg, y de 45% de la dosis 100 a 200 kg de N, para el cultivar Puelche (B) los incrementos fueron de 19% de la dosis 100 a 150 kg, y de 34% de la dosis 100 a 200 kg de N.

Paralelamente en el suelo, la cantidad de nitrógeno aumenta desde la siembra hasta que comienza la fase exponencial de absorción, debido a que se mineraliza más nitrógeno de la urea, quedando disponible para la planta (Álvarez, 2006). A mayor cantidad de urea aplicada, mayor disponibilidad de nitrógeno y por ende mayor absorción de este nutriente.



### 4.3 Rendimiento de grano.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de rendimiento de grano promedio de los cultivares Kumpa y Puelche.

**Cuadro 10.** Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el rendimiento de los cultivares Kumpa y Puelche, expresados en qqm ha<sup>-1</sup>.

		Rendimiento promedio (qqm ha <sup>-1</sup> )		
Cultivar	Dosis N (kg ha <sup>-1</sup> )	Sin Twin N	Con Twin N	
Kumpa	100	93,05	97,89	95,47
	150	100,19	107,38	103,78
	200	110,22	106,19	108,20
		101,15	103,82	
Puelche	100	99	103	102,10
	150	102	110	105,82
	200	100	108	104,65
		100,71 a	107,67 b	

Cifras con letras distintas son diferentes según prueba de Tukey (p<0,05).

En el cultivar Kumpa no se presentó diferencia significativa en el rendimiento, no obstante en el cultivar Puelche sí se produjo diferencia significativa en esta variable, donde hubo un incremento de 6,5% al aplicar las bacterias.

Los resultados para el cultivar Kumpa y Puelche no concuerdan con los obtenidos por Ventimiglia *et al.* (2000), quienes obtuvieron incrementos de 14% al inocular el trigo fertilizado en comparación al trigo sin inocular. No obstante los resultados del cultivar Puelche se acercan a los resultados obtenidos por Ventimiglia *et al.*, (2000), en los cuales se observó un incremento de rendimiento de 8,5% al comparar el trigo inoculado sin fertilizante versus un testigo.

Los resultados del cultivar Kumpa concuerdan con lo señalado por Bashan *et al.* (2007), quienes mencionan que la inoculación con *Azospirillum sp.* puede provocar cambios significativos en varios parámetros de su crecimiento, los cuales pueden o no afectar el rendimiento. Por otra parte Aguirre *et al.*, (2009), dice que los rendimientos pudiesen ser afectados por la aplicación previa de fertilizante químico, urea, lo que supone que la fijación de N<sub>2</sub> por las bacterias del género *Azospirillum* disminuye ante la presencia de fuentes nitrogenadas en el suelo.

Aguirre *et al.*, (2009) menciona que niveles menores a 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno aplicados a los cultivos junto con los microorganismos indujeron una mejor respuesta en rendimiento en comparación con los niveles superiores, que no presentaron diferencias con los tratamientos biofertilizados. De acuerdo a esto se puede decir que los resultados en Kumpa no obtuvieron efecto de las bacterias *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.*, ya que se aplicaron dosis nitrogenadas de 100 kg hasta 200 kg ha<sup>-1</sup>.

Algunos trabajos han demostrado que la inoculación con *Azospirillum sp.* aumenta el rendimiento de plantas cultivadas aún con nivel de fertilización al 100% (Del Gallo y Fabbri, citados por Bashan *et al.*, 2007), concordando con los resultados del cultivar Puelche.

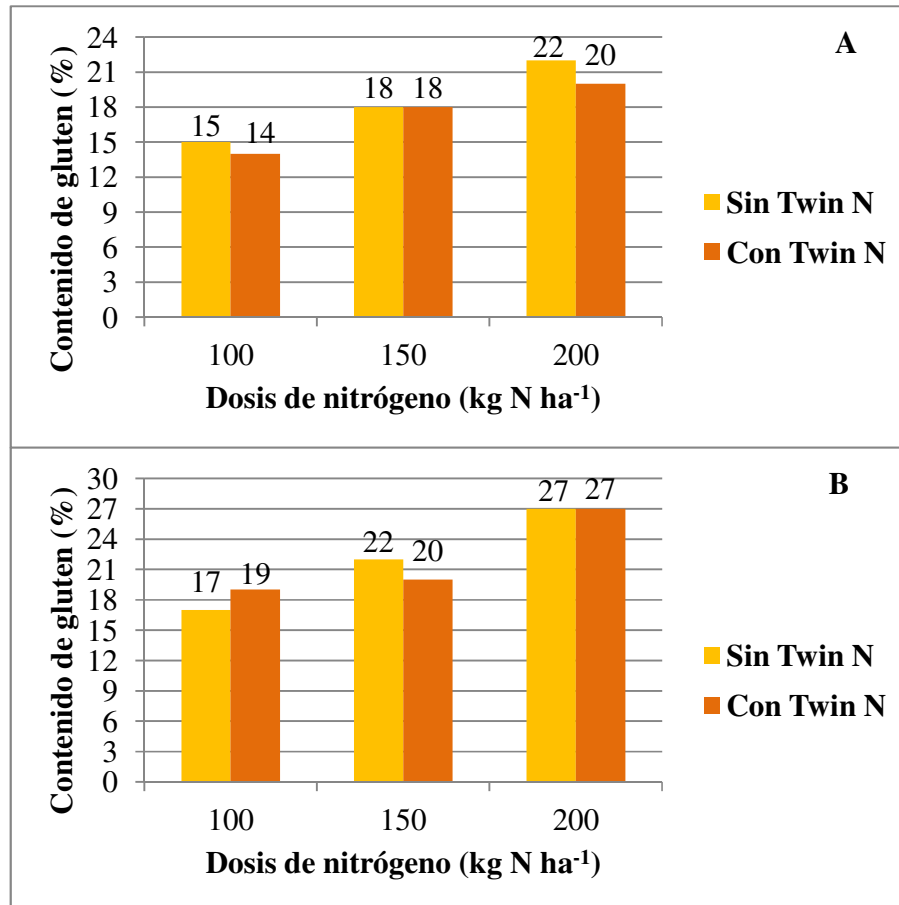
Dibut, (2006), menciona que aún cuando no existe fijación nitrogenada por parte de las bacterias al satisfacer los requerimientos con fertilizante químico, el rendimiento puede verse incrementado producto de la acción de sustancias activas. Razón que puede justificar el aumento de rendimiento del cultivar Puelche.

Es necesario enfatizar que una especie microbiana tiene distintos tipos de cepas, lo que implica que no todas se comportan de la misma forma en cuanto a su atracción por los exudados de las raíces de una especie vegetal. Estas diferencias se deben tanto a las peculiaridades de las plantas como de las cepas microbianas (Dibut, 2006). La incomprensión de este principio ha sido la causa de la inconsistencia de los resultados obtenidos por distintos investigadores. De acuerdo a esto se puede deducir que cultivares distintos pueden obtener resultados diferentes.

Por otra parte la dosis de nitrógeno no produjo diferencia significativa en el rendimiento de los cultivares Kumpa y Puelche. Estos resultados coinciden con Ventimiglia *et al.* (2007), quienes no obtuvieron diferencia significativa en rendimiento al aplicar dosis crecientes de nitrógeno.

#### 4.4 Contenido de gluten húmedo.

En la Figura 2 se presenta el efecto de la aplicación de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en el contenido de gluten promedio de grano de los cultivares Kumpa (A) y Puelche (B).



**Figura 2.** Efecto de Twin N y dosis de nitrógeno en el contenido de gluten de los cultivares Kumpa (A) y Puelche (B).

Los resultados de contenido de gluten del trigo Kumpa (A) y Puelche (B) no presentan diferencias al aplicar Twin N, estos se mantienen constantes, lo que demuestra que la aplicación de *Azotobacter spp.* y *Azopirillum spp.* no son influyentes en el contenido de gluten.

Los resultados coinciden con lo expresado por Díaz, *et al.*, (2008), quienes aluden que las bacterias *Azospirillum sp.* inoculadas en sorgo no mostraron un aporte significativo en las características del grano.

Referente a la dosis de N, sí se observa en ambos cultivares un incremento sostenido del contenido de gluten húmedo al aumentar la dosis nitrogenada.

Los resultados para ambos cultivares concuerdan con Bergh *et al.*, (2007), quienes señalan que la dosis de nitrógeno afecta a la calidad panadera del trigo, obteniendo incrementos en la proteína y contenido de gluten al aumentar la dosis de nitrógeno de 120, a 160 y 200 kg N ha<sup>-1</sup>. Hirzel *et al.* (2010), también reportó aumentos en el contenido de gluten al incrementar la dosis de nitrógeno.

Los factores que se interrelacionan para la determinación de la calidad del trigo son diversos, siendo los más relevantes, la genética del cultivar, las variables climáticas y edáficas y el manejo del cultivo. Dentro del manejo, la fertilización nitrogenada tiene la mayor influencia sobre la calidad en general y el porcentaje de proteína en particular (Bergh *et al.*, 2007).

#### 4.5 Sobrevivencia de bacterias.

En los Cuadros 11 y 12 se presentan los resultados obtenidos del análisis de sobrevivencia de *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*, respectivamente.

**Cuadro 11.** Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en la sobrevivencia de bacterias *Azotobacter spp.*

			<b>Sobrevivencia de bacterias (ufc/ml)</b>	
<b>Dosis N (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Sin Twin N</b>	<b>Con Twin N</b>
100	Ashby	5	S/C	0,0002
150	Ashby	5	0,00015	0,00017
200	Ashby	5	0,0001	0,0001

S/C significa sin crecimiento.

**Cuadro 12.** Efecto de Twin N y distintas dosis de nitrógeno en la sobrevivencia de bacterias *Azospirillum spp.*

			<b>Sobrevivencia de bacterias (ufc/ml)</b>	
<b>Dosis N (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Sin Twin N</b>	<b>Con Twin N</b>
100	FBN	5	0,0035	0,0019
150	FBN	5	0,0006	0,00017
200	FBN	5	0,0003	0,0002

Los resultados de los Cuadros 11 y 12 muestran que las unidades formadoras de colonias (ufc) por ml. obtenidas en el laboratorio están entre 0,0001 y 0,0035 ufc/ml, lo que revela que la colonización radicular no fue efectiva.

Kennedy y Tchan, (1992), afirman que la asociación de *Azospirillum spp.* con gramíneas es de carácter espontáneo y raramente puede ser manejada como una práctica agrícola más, lo que justificaría la inefectiva sobrevivencia de bacterias.

Al observar el Cuadro 12 se puede decir que la población de *Azospirillum spp.* disminuyó a medida que aumentó la dosis de nitrógeno, esto se puede deber a lo mencionado por Fuentes y Massol (2002), quien supone que la fijación de N<sub>2</sub> por las bacterias del género *Azospirillum sp.* disminuye ante la presencia de fuentes nitrogenadas en el suelo, lo que se asocia a la disminución de la población bacteriana.

De acuerdo a los resultados de ufc de *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.* es plausible suponer que la población obtenida en el análisis de sobrevivencia de bacterias sea de origen nativo, y no proveniente de la inoculación aplicada, ya que tanto los tratamientos con o sin aplicación de Twin N poseen ínfimas unidades formadoras de colonias, siendo estas no muy variables entre tratamiento de igual dosis de nitrógeno.

Otro posible factor que pudo incidir en la población de las rizobacterias es la toma del inóculo, esta corresponde a una etapa de la formación del producto, debido a esto se desconoce la fase en la cual se preparó el cultivo de bacterias, si el inóculo de la bacteria es tomado en la fase exponencial del cultivo, las bacterias sobreviven mejor en el suelo, que si se toma en la fase estacionaria (Vanderhove *et al.*, citado por Bashan *et al.*, 2007).

Existen diversos factores que pudieron afectar la colonización, tales como, el tipo de cepa, la cual no está identificada, las condiciones ambientales, factores químicos, fisiológicos, nutricionales y otros no identificados (Parra y Cuevas, 2001).

Además puede considerarse que el pH ácido del suelo donde se realizaron los ensayos, pudo afectar negativamente, impidiendo el normal crecimiento y desarrollo de las bacterias, tal como menciona Carrillo (2003), *Azotobacter sp.* crece mejor en suelos neutros a alcalinos mesofílicos, siendo el pH óptimo de 7,0-7,5, al igual que *Azospirillum sp.* que también prefiere suelos con pH cercano a neutro.

Por otra parte Dibut, (2006) menciona que *Azotobacter sp.* en muchos casos se encuentra ausente en la rizósfera de especies vegetales de importancia como el trigo, e incluso mediante la inoculación no es posible lograr que se establezcan en la zona rizosférica de esta especie.

Otro factor que pudo incidir es la forma de aplicación del producto, Dibut, (2006) detectó que los biofertilizantes rizosféricos al ser asperjados sobre el suelo y la planta se asocian a las hojas de las plantas a expensas de los exudados liberados en la superficie foliar. Esto infiere que parte de las bacterias pudiesen haber quedado en la parte aérea de la planta.



## 5 CONCLUSIONES.

La aplicación del producto Twin N compuesto por bacterias diazotróficas *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.* no provocaron diferencias significativas en el índice de verdor de los cultivares Kumpa y Puelche. La existencia de aumento de esta variable en los estadios más avanzados está en función del aumento de la dosis de nitrógeno.

La absorción de nitrógeno de la planta entera, parte aérea, en el cultivar Kumpa no aumentó al inocular, en cambio sí se incrementó en el cultivar Puelche. En cuanto a la dosis nitrogenada la absorción de nitrógeno aumentó notoriamente en ambos cultivares.

La inoculación en el cultivar Kumpa no presentó incidencia en el rendimiento de grano. No obstante en el cultivar Puelche si se observó efecto del Twin N en esta variable, existiendo diferencia significativa. La dosis nitrogenada no produjo diferencia significativa en el rendimiento de ambos cultivares.

En el contenido de gluten de los cultivares Kumpa y Puelche no hubo incremento por efecto de la inoculación de las bacterias diazotróficas. No obstante el contenido de gluten en ambos cultivares aumentó por efecto del incremento de la dosis de nitrógeno.

De los resultados del análisis de sobrevivencia de bacteria de *Azospirillum spp.* y *Azotobacter spp.* se obtuvo bajas unidades formadoras de bacterias, lo que implica una escasa o casi nula colonización a nivel de la rizósfera.

## 6 RESUMEN.

La aplicación del biofertilizante Twin N, compuesto por bacterias diazotróficas *Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*. en trigo (*Triticum aestivum*), tiene como propósito obtener una vía alternativa de nutrición para la planta, para disminuir el uso de fertilizantes químico, lo que conlleva a comprobar si existe o si se expresa una respuesta beneficiosa en rendimiento y calidad de trigo, debido a la acción de estas bacterias.

En este trabajo se sembraron los cultivares de trigo Puelche y Kumpa, en los cuales se determinó el efecto del biofertilizante Twin N a distintas dosis de nitrógeno vía urea: 100 kg de N, 150 kg de N y 200 kg de N por hectárea. En esta investigación se realizaron lecturas SPAD en distintos estados fenológicos de la planta para la obtención del índice de verdor, se determinó además la absorción de nitrógeno total de la planta, rendimiento, contenido de gluten húmedo del grano y se realizó un análisis microbiológico del suelo para determinar la sobrevivencia de las bacterias *Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*. Los resultados de las lecturas SPAD a Z-32, Z-44 y Z-59 no presentaron diferencias significativas al aplicar Twin N en cultivares Kumpa y Puelche, por lo cual no hubo efecto por *Azotobacter spp* y *Azospirillum spp*. Sin embargo a Z-44 y Z-59, se observaron diferencias significativas en función de la dosis de nitrógeno. De acuerdo a la absorción de nitrógeno, al aplicar Twin N no hubo aumento para el cultivar Kumpa, en cambio en Puelche sí existió un leve incremento, en cuanto a la dosis de nitrógeno en ambos cultivares existió un incremento notorio en la absorción de N. En el rendimiento del cultivar Kumpa no se obtuvieron diferencias significativas al aplicar Twin N, en cambio sí en el cultivar Puelche, y en ambos cultivares la dosis de nitrógeno no provocó diferencias significativas. En cuanto al contenido de gluten de los cultivares Kumpa y Puelche la inoculación de Twin N no aumentó el contenido de este, no obstante sí aumentó en función de la dosis de nitrógeno. Por último el análisis de sobrevivencia de bacterias presentó nula o baja existencia de colonias.

## 7 SUMMARY.

The application of biofertilizer Twin N, composed of diazotrophic bacteria *Azotobacter spp.* and *Azospirillum spp.* in wheat (*Triticum aestivum*), has as purpose obtain an alternative route of nutrition for the plant, to reduce the use of chemical fertilizers, leading to see if there is or if it expresses a beneficial response in wheat yield and quality, due to the action of these bacteria.

In this work were sowed the wheat cultivars Puelche and Kumpa, in which we determined the effect of biofertilizer Twin N to different doses of nitrogen via urea, 100, 150 and 200 kilos of N per hectare. In this research, the SPAD readings were taken at different growth stages of the plant to obtain the greenness index, was also determined the total absorption of nitrogen of the plant, yield, wet gluten content of grain and an analysis of soil microbiological to determine the survival of the bacteria *Azotobacter spp.* and *Azospirillum spp.* The results of the SPAD readings to Z-32, Z-44 and Z-59 did not differ significantly by application of Twin N in the Kumpa and Puelche cultivars, so there was no effect of *Azotobacter spp.* and *Azospirillum spp.* However to Z-44 and Z-59, were observed significant differences depending of the dose of nitrogen. According to the absorption of nitrogen, the application of Twin N no increase in the cultivar Kumpa, however in Puelche did exist a slight increase, in terms of dose of nitrogen in both cultivars there was a noticeable increase in the absorption of N. In the yield of cultivar Kumpa were not obtained significant differences by application of Twin N, however in Puelche were obtained significant differences, and in both cultivars, the nitrogen dose caused no significant differences. As for the gluten content in cultivars Kumpa and Puelche the inoculation of Twin N did not increase the content of this, however did increase as a function of nitrogen dose. Finally, the bacterial survival analysis showed no or low presence of colonies.

## 8 LITERATURA CITADA.

- Abril A., Biasutti C., Maich R., Dubbini L. y Noe L.** 2006. Inoculación con *Azospirillum* con *Azospirillum* spp. En la región Semiárida- Central de Argentina: Factores que afectan la colonización rizosférica. *Ci. Suelo (Argentina)* 24 (1).
- Acebo, Y., Rives N., Heydrich M. y Hernández A.** 2007. Efecto promotor del crecimiento vegetal de *Azospirillum sp.* en el cultivo del arroz. *Cultivos Tropicales*. vol. 28, no. 3, p.29-32.
- Aguirre J., Irizar M., Durán A., Grajeda O., Peña M., Loredó C. Gutiérrez A.** 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. *Inifap*. 7-86.
- Álvarez R.** 2006. Balance de nitrógeno en cultivos de trigo. INTA. Información técnica de trigo campaña 2006. Publicación Miscelánea N° 125. Buenos Aires.
- Baca B., Soto L. y Pardo M.** 2000. Fijación Biológica de Nitrógeno. Elemento 38. pp. 43 - 49.
- Bashan Y.** 1989. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.* 35:936-944.
- Bashan Y.** 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat root. *Can. J. Microbiol.* 36:419-325.
- Bashan Y., de-Bashan L., Glick B., Holguin G.** 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Editorial Trillas, Mexico* 8: 167-184.
- Bergh R., Loewy T. y Echeverría H.** 2007. Importancia de la fertilización nitrogenada sobre la calidad panadera del trigo.
- Carrillo L.** 2003. Microbiología agrícola: Actividad microbiana - vida y muerte de los microorganismos. Universidad Nacional de Salta.
- Collados C.,** 2006. Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. 10 p. Memoria grado doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Díaz A., Jacques C. y Peña M.** 2008. Productividad de sorgo en campo asociada con micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense*. *Universidad y Ciencia (México)* 24: 229-237.
- Díaz M., Balaña R., Fernández M. y Perticari A.** 2004. Rendimiento de Cultivos de trigo en la región Pampeana inoculados con *Azospirillum brasiliense*.

- Dibut B.** 2006. Biofertilizantes como insumos de Agricultura Sostenible. Instituto de Investigaciones Fundamentales en agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT). México.
- Frioni.** 1999. Procesos microbianos: 14. Fijación biológica del nitrógeno (FBN) por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera. Editorial de la Fundación Universitaria Nacional de Rio Cuarto. Rio Cuarto, Argentina.
- Fuentes F. y Massol A.** 2002. Manual de laboratorios: Ecología de microorganismos. Universidad de Puerto Rico.
- Gandrup M., Garcia F., Fabrizzi K. y Echeverría H.** 2004. Evolución de un índice de verdor en hoja para evaluar status nitrogenado en trigo. RIA (Argentina) 3: 105-121.
- Garcia F.** 2003. Nutrición y fertilización en trigo. Agro mercado (Argentina) 75: 16-20.
- Hirzel J., Matus I. y Madariaga R.** 2010 Effect of Split nitrogen applications on durum wheat cultivars in volcanic soil. Chileanjar, Chile, 70 (4): 590-595.
- Kennedy I. y Tchan Y.** 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. Plant Soil 141: 93-118. University of Sidney, N.S.W. 2006, Australia.
- López M., Martínez R., Brossard F., Bolívar A., Alfonso N., Alba A. y Pereira H.** 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. Agronomía Trop. (Venezuela) 58: 391-401.
- Loredo C., Espinosa V., Ferrera R., Castellanos R. y Pérez J.** 2004a. Biofertilización bacteriana del pasto buffel. Simposio de biofertilización, INIFAP. México. 22-29 p.
- Loredo, C., López, L. y Espinosa, D.** 2004b. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. TERRA Latinoamericana (México), Vol. 22, No. 2, pp. 225-239.
- Marques P., Braga A. y Dirceu A.** 2003. Uso do clorofilometro como indicador da necessidade de adubacao nitrogenada em cobertera no feijoeiro. Pesq. Agrop. Bras. (Brasil) 38: 1083-1087.
- Melchiori R., Caviglia O., Barbagelata P. y Papparotti O.** 2003. Evaluación de la nutrición nitrogenada en trigo por medio de un Índice de Verdor en hojas. INTA Paraná. Argentina.
- Parra Y. y Cuevas F.** 2001. Revisión bibliográfica, Potenciales de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Vol. 23, no.3, p. 31-41.
- Quemada M., Lasa B., Irañeta I., Segura A., Lafarga A., Arregui L., Baroja E. e Iker M.** 2005. Optimización de la fertilización nitrogenada mediante el uso de medidores de clorofilas. Navarra Agraria. 31-35.

- Reyes I., Álvarez L., El-Ayoubi H. y Valery A.** 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro (Venezuela)* 20: 37-48.
- Reyes I. y Valery A.** 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays*) con *Azotobacter spp.* Venezuela.
- Rodríguez E., González G., López, J., Di Ciocco C., Pacheco J. y Parada, J.** (1996). Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. *Arid Soil Res. Rehab.*, 10: 13-20.
- Rodríguez C., Sevillano F. y Subramaniam P.** 1984. La fijación de nitrógeno atmosférico, una biotecnología en la producción agraria. España, *Temas de divulgación* 1: 21-30.
- Rodríguez D., Urrego L., Martínez P. y Bernal J.** 2003. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aislado de bosque alto andino cundinamarqués. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 28.
- Rouanet, J., Romero, O., Demanet, R.** 1988. Áreas agroecológicas en la IX Región. Descripción. IPA Carillanca. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Temuco, Chile 7(1):18-23.
- Saribay G.** 2003. Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacterchroococcum* nitrogen-free and own containing medium. Tesis de maestría en Ciencias Aplicadas. Departamento de Ingeniería de alimentos. The middle East Technical University. Turky. 45 p.
- Tosso J.,** 1985. Suelos volcánicos de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile, 723 p.
- Vandenhove, H., Merckx R., Van Stenbergen M. y Vlassak Y.** 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil. Biol. Biochem.* 25(4): 513-519.
- Ventimiglia L., Carta H. y Rillo S.** 2000. Inoculación con *Azospirillum*. Cuadernillo Agro mercado Trigo. INTA P 60-62.
- Ventimiglia L., Torrens L y Camarasa J.** 2007. Fertilización en trigo con nitrógeno: Dosis, momento y tipo de producto aplicado. INTA. Argentina, 1-5.
- Vessey J.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255: 571-586.

# ANEXOS

**Anexo 1.** Los estados de crecimiento del trigo según las escalas de Zadoks.  
Fuente: Moreno *et al.*, 2001.

<b>Escala</b>	<b>Descripción general</b>
<b>Germinación</b>	
00	Semilla seca
01	Comienza imbibición
03	Fin de Imbibición
05	Radícula emergida del grano
07	Coleóptilo, emergido del grano
09	Emergencia: el coleóptilo traspasa la superficie del suelo.
<b>Crecimiento de la plántula</b>	
10	1 hoja, fuera coleóptilo
11	1 hoja desarrollada
12	2 hojas desarrolladas
13	3 hojas desarrolladas
1.	Los estadios continúan hasta 9 o más hojas desarrolladas
19	9 o más hojas desarrolladas
<b>Macollaje</b>	
20	Tallo principal solo
21	Tallo principal y 1 macollo
22	Tallo principal y 2 macollos
23	Tallo principal y 3 macollos
2.	Los estadios continúan hasta...
29	Tallo principal y 9 o más macollos.
<b>Alargamiento del tallo (encañazón)</b>	
30	Inicio de nudos (tallo erecto)
31	1er nudo palpable
32	2do nudo palpable
33	3er nudo palpable
3.	Los estadios continúan hasta...
37	Comienzo de la hoja bandera
39	Lígula de hoja bandera visible
<b>Espiga embuchada</b>	
41	Alargamiento vaina hoja bandera
43	Comienzo de hinchazón de la vaina
45	Espiga embuchada (bota)
47	Apertura vaina hoja bandera
49	Aurículas (barbas) visibles



<b>Emergencia de inflorescencia</b>	
51	Primera espiguilla visible
53	1/4 espiga emergida
55	1/2 espiga emergida
57	3/4 espiga emergida
59	Espiga emergida de vaina
<b>Antesis (floración)</b>	
61	Comienzo de antesis
65	50% de antesis
69	Completa floración
<b>Grano lechoso</b>	
71	Endosperma acuoso
73	Endosperma acuo-lechoso
75	Endosperma lechoso-pastoso
77	Grano lechoso tardío
<b>Grano pastoso (masoso)</b>	
83	Endosperma pastoso-lechoso
85	Endosperma pastoso
87	Endosperma pastoso harinoso
<b>Madurez</b>	
91	Cariopse casi duro
92	Cariopse duro (cosecha)
93	Cariopse se separa en las horas de día (cosecha)
94	Perdida de granos
95	Dormancia
96	Prueba de 50% de germinación
97	Semilla de dormancia
98	Dormancia secundaria
99	Semillas viables

**Anexo 2.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-32, trigo Kumpa.

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante		1	1148,17	1148,17	2,11	0,17
Dosis de N		2	4258,33	2129,17	3,91	0,04
Biofertilizante * dosis N		2	769,33	384,67	0,71	0,51
Repeticiones		3	658,83	219,61	0,40	0,75
SPAD Z-32	Model	8	6834,67	854,33	1,57	
SPAD Z-32	Error	15	8171,17	544,74	0,22	
SPAD Z-32	C. Total	23	15005,83			

**C.v.: 3,7%**

**Anexo 3.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-32, trigo Puelche.

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante		1	150,00	150,00	0,68	0,42
Dosis de N		2	933,33	466,67	2,11	0,16
Biofertilizante * dosis N		2	769,00	384,50	1,74	0,21
Repeticiones		3	2441,50	813,83	3,68	0,04
SPAD Z-32	Model	8	4293,83	536,73	2,43	
SPAD Z-32	Error	15	3318,00	221,20	0,07	
SPAD Z-32	C. Total	23	7611,83			

**C.v.: 2,4%**

**Anexo 4.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-44, trigo Kumpa.

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante		1	640,67	640,67	2,25	0,15
Dosis de N		2	13831,00	6915,50	24,31	< 0,0001
Biofertilizante * dosis N		2	44,33	22,17	0,08	0,925
Repeticiones		3	1981,83	660,61	2,32	0,12
SPAD Z-44	Model	8	16497,83	2062,23	7,25	
SPAD Z-44	Error	15	4266,67	284,44	0,001	
SPAD Z-44	C. Total	23	20764,50			

**C.v.: 2,7%**

**Anexo 5.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-44, trigo Puelche.

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante		1	30,38	30,38	0,32	0,58
Dosis de N		2	6497,58	3248,79	34,61	< 0,0001
Biofertilizante * dosis N		2	189,25	94,63	1,01	0,39
Repeticiones		3	1760,79	586,93	6,25	0,01
SPAD Z-44	Model	8	8478,00	1059,75	11,29	
SPAD Z-44	Error	15	1407,96	93,86	< 0,0001	
SPAD Z-44	C. Total	23	9885,96			

**C.v.: 1,8%**

**Anexo 6.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-59, trigo Kumpa.

Fuente de variación		Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Prob > F
Biofertilizante		1	7,04	7,04	0,07	0,80
Dosis N		2	14192,33	7096,17	67,33	< 0,0001
Biofertilizante * Dosis N		2	20,33	10,17	0,10	0,91
Repeticiones		3	3331,46	1110,49	10,54	< 0,0006
SPAD Z-59	Model	8	17551,17	2193,90	20,82	
SPAD Z-59	Error	15	1580,79	105,39	< 0,0001	
SPAD Z-59	C. Total	23	19131,96			
<b>C.v.: 1,8%</b>						

**Anexo 7.** Tabla de ANOVA lectura SPAD en Z-59, trigo Puelche.

Fuente de variación		Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Prob > F
Biofertilizante		1	15,04	15,04	0,20	0,66
Dosis N		2	9459,25	4729,63	64,18	< 0,0001
Biofertilizante * Dosis N		2	95,08	47,54	0,65	0,5
Repeticiones		3	3739,79	1246,60	16,92	< 0,0001
SPAD Z-44	Model	8	13309,17	1663,65	22,57	
SPAD Z-44	Error	15	1105,46	73,70	< 0,0001	
SPAD Z-44	C. Total	23	14414,63			
<b>C.v.: 1,6%</b>						

**Anexo 8.** Tabla de ANOVA de rendimiento para cultivar Kumpa.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante	1	0,2042	0,6620
Dosis N	2	1,5320	0,2639
Biofertilizante * Dosis N	2	0,2717	0,7671

**C.v.: 12,3 %**

Para disminuir la varianza se eliminaron 5 datos fuera de rango.

**Anexo 9.** Tabla de ANOVA de rendimiento de cultivar Puelche.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>F</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Biofertilizante	1	4,8026	0,0489
Dosis N	2	0,4467	0,6496
Biofertilizante * Dosis N	2	0,0381	0,9627

**C.v.: 6,7 %**

Para disminuir la varianza se eliminaron 4 datos fuera de rango.