

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CIANOBACTERIAS Y COINOCULACIÓN CON *Azospirillum brasilense* SOBRE CARACTERÍSTICAS FITOMÉTRICAS EN MAÍZ

Freddy Zambrano Gavilanes^{1,5}, Diva Souza Andrade¹, Claudemir Zucareli², João Sarkis Yunes³, Higo Amaral⁴, Rafael Matias da Costa⁴, Danilo Raia⁴, Marina García⁵ y Maria de Fátima Guimarães²

RESUMEN

Las cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en formas disponibles para los cultivos, por lo cual se ha incrementado el interés en su uso como inoculantes. El objetivo fue evaluar el efecto de la inoculación con cianobacterias y de la coinoculación con *Azospirillum brasilense* sobre características fitométricas en maíz. Se condujeron dos ensayos en invernadero; en el primero, se probó el efecto de la inoculación (I) con *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp. *Anabaena cilíndrica*, *Calothrix brevissima* y *A. brasilense*, con y sin fertilización nitrogenada (F) sobre la altura de planta y mazorca, diámetro del tallo, volumen radical, área foliar, biomasa en raíz, tallo y hoja y contenido foliar de clorofila y de N, P, K, en maíz variedad IPR164; en el segundo ensayo, se evaluó el efecto de la coinoculación con esas cianobacterias y *A. brasilense* sobre las mismas variables en dos genotipos de maíz (variedad IPR 164 e híbrido DOW 2B587). En el primer ensayo hubo efectos significativos aislados para I y F pero la interacción I x F solo resultó significativa para el área foliar; la inoculación incrementó variables de crecimiento y el contenido de clorofila *b*; los tratamientos de inoculación más efectivos correspondieron a *N. muscorum* y *A. cylíndrica*. En el segundo ensayo, la coinoculación con *A. cylíndrica* + *A. brasilense* causó la mejor respuesta, independientemente del genotipo. Los resultados evidencian el efecto estimulante de las cianobacterias para promover el crecimiento en el cultivo de maíz.

Palabras clave adicionales: *Anabaena* sp., bacteria diazotrófica, *Calothrix brevissima*, *Nostoc muscorum*, *Zea mays*

ABSTRACT

Inoculation with cyanobacteria and co-inoculation with *Azospirillum brasilense* on phytometrics characteristics of maize
Cyanobacteria can fix atmospheric N and transform it into available forms for crops, which has increased interest in their use as inoculants. Our objective was to evaluate the influence of inoculation with cyanobacteria and co-inoculation with *Azospirillum brasilense* on phytometrics characteristics of maize. Two greenhouse trials were conducted; in the first, we tested the effect of inoculation (I) with *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp. *Anabaena cylíndrica*, *Calothrix brevissima* and *A. brasilense*, with and without N fertilization (F) on plant and ear height, stem diameter, root volume, leaf area, biomass of root, stem and leaf, and foliar content of chlorophyll and N, P, K, on corn variety IPR164; in the second, the effect of co-inoculation with these cyanobacteria and *A. brasilense* on the mentioned variables in two maize genotypes (variety IPR 164 and hybrid DOW 2B587) was evaluated. In the first trial there were significant isolated effects for I and F but the interaction I x F was only significant for the leaf area; the inoculation caused increases on growth variables and content of chlorophyll *b*; the most effective inoculation treatments were with *N. muscorum* and *A. cylíndrica*. In the second trial, the co-inoculation with *A. cylíndrica* + *A. brasilense* caused the best response, independently of the genotype. These results show a stimulating effect of cyanobacteria to promote growth in maize.

Additional keywords: *Anabaena* sp., *Calothrix brevissima*, diazotrophic bacteria, *Nostoc muscorum*, *Zea mays*

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son organismos

procarióticos que pertenecen al grupo más antiguo de organismos fotosintetizantes, varían mucho en formas y tamaños, prosperando en una amplia

Recibido: Octubre 22, 2018

Aceptado: Mayo 2, 2019

¹ Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), 86047-902, Londrina, Paraná, Brasil. e-mail: freddyzg_86@hotmail.com (autor de correspondencia); diva@iapar.br ² Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. e-mail: claudemircca@uel.br; mfatima@uel.br ³ Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), 96203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: jsyunes@furg.br ⁴ Departamento de Agronomia, Centro Universitário Filadélfia (UniFil), 86020-000, Londrina, Paraná, Brasil. e-mail: higo.amaral@unifil.br; rafamatiascosta@hotmail.com; daniloraia@hotmail.com ⁵ Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí (UTM), Portoviejo, Manabí, Ecuador. e-mail: fezambrano@utm.edu.ec; marina.garcia@utm.edu.ec

gama de hábitats, de ecosistemas acuáticos, incluyendo agua dulce y marina, y ecosistemas terrestres (Duchoud et al., 2017). Estos microorganismos han llamado la atención en los últimos años, debido a sus diversas aplicaciones en la producción de alimentos, acuicultura, tratamiento de aguas residuales, uso como fertilizantes, producción de metabolitos, vitaminas, toxinas, enzimas, productos farmacéuticos y biocombustibles, todo lo cual hace que las cianobacterias tengan actualmente gran importancia económica (Abed et al., 2009; Pathak et al., 2018).

Algunas cianobacterias producen sustancias estimulantes para el desarrollo de las plantas, las cuales actúan como reguladores de crecimiento, influenciando la fisiología y arquitectura del sistema radicular (Prasanna et al., 2015), a la vez que favorecen el crecimiento y el funcionamiento de la parte aérea de la planta (Jhala et al., 2017). En condiciones de deficiencia de nitrógeno, las cianobacterias forman colonias filamentosas que contienen células vegetativas y heterocistos, estos últimos especializados en la fijación del nitrógeno atmosférico (Muro et al., 2017).

El maíz es el cereal más cultivado en el mundo y su productividad está directamente influenciada por la nutrición nitrogenada, siendo el N uno de los elementos que la planta requiere en mayor cantidad (Ladha et al., 2016; Barrios y Basso, 2018). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) realizada por cianobacterias, se perfila como una alternativa favorable para suplir la demanda de N de esta especie, la cual usualmente se realiza mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, lo que permite reducir los costos de producción y preservar mejor el ambiente (Brouwer et al., 2017). Sin embargo, existen pocos estudios en torno al efecto de la inoculación de semillas de maíz con cianobacterias y de la coinoculación con *Azospirillum brasilense* sobre el desarrollo de las plantas.

Sobre la base de estos antecedentes, se efectuó este trabajo el cual tuvo como objetivo evaluar la influencia de la inoculación con cuatro especies cianobacterias y de la coinoculación con la bacteria diazotrófica *Azospirillum brasilense* sobre características fitométricas en maíz (*Zea mays* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Instituto Agronómico Paraná-IAPAR, municipio de Londrina (PR) en Brasil (23°23' S y 51°11' W, 566 msnm), en el período de noviembre de 2016 a enero de 2017.

Obtención y mantenimiento de las cianobacterias. Las especies de cianobacterias fueron suministradas por el Banco de Cultivos del Laboratorio de Cianobacterias y Ficotoxinas de la Universidad Federal de Río Grande - FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Las especies utilizadas fueron: *Nostoc muscorum*, *Anabaena* sp. *Anabaena cilíndrica*, y *Calothrix brevissima*.

Para el mantenimiento y el crecimiento de las cianobacterias se utilizó el medio de cultivo BG11 (Stanier et al., 1971), sin nitrógeno, con la siguiente composición: 0,04 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,075 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,036 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,006 g.L⁻¹ ácido cítrico; 0,006 g.L⁻¹ citrato férrico de amonio; 0,001 g.L⁻¹ EDTA; 0,02 g.L⁻¹ Na₂CO₃; 1 ml.L⁻¹ y trazas de metales. Las cianobacterias se cultivaron en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de 12 h, temperatura controlada de 30,0 ± 2,0 °C en la fase luminosa y 22,0 ± 2,0 °C en la fase oscura. La densidad de flujo fotónico fue de 100 ± 20 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Para probar el efecto de la inoculación (aplicación de microorganismos aislados) y coinoculación (aplicación de microorganismos en consorcio) sobre el desarrollo de plantas de maíz, se condujeron dos ensayos en un invernadero con temperaturas de 29,1 y 18,9°C (máx-mín), humedad relativa media de 77,8 % y evapo-transpiración de 4,17 mm/día.

Ensayo 1: Efecto de la inoculación con cianobacterias, con y sin fertilización nitrogenada, sobre características fitométricas en maíz. Se colectó suelo de la capa superficial (0-20 cm de profundidad), de la zona de Londrina Paraná. Siguiendo la metodología de Embrapa (1997) se realizó su caracterización química y se obtuvieron los siguientes valores: pH 4,55, CIC 11,44 cmol_c·dm⁻³, Ca 2,91 cmol_c·dm⁻³, Mg 1,27 cmol_c·dm⁻³, K 0,32 cmol_c·dm⁻³ y P 3,93 mg·dm⁻³. El suelo fue secado al aire, tamizado en malla de 4 mm y colocado en recipientes plásticos de 10 L de capacidad, en los cuales se cultivaron las plantas de maíz. Se empleó la variedad IPR164, de ciclo

precoz, cuyo porte medio es de aproximadamente 2,30 m de altura.

Los tratamientos consistieron en el uso de dos niveles de fertilización nitrogenada a base de urea (equivalentes a 0 y 60 kg·ha⁻¹ N), combinados con cinco tratamientos de inoculación, uno para cada una de las cuatro especies de cianobacterias (10⁸ UFC·mL⁻¹) y otro utilizando un inoculante líquido comercial (Azototal estirpes AbV5 e AbV6 con 2,0x10⁸ UFC·mL⁻¹); paralelamente se dejó un tratamiento control sin inoculación.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar en un arreglo factorial de 12 tratamientos (2 fertilizaciones y 6 inoculaciones), con cuatro repeticiones. Las semillas fueron inoculadas antes de la siembra con 5 mL de inoculante por kilogramo de semilla; para ello, las semillas y el producto se colocaron en una bolsa plástica, con posterior agitación para lograr una distribución homogénea del inoculante sobre las mismas. La siembra se realizó a razón de cinco semillas por recipiente; transcurridos 10 días después de la emergencia se hizo raleo y se dejó sólo una planta. Para los tratamientos con fertilización (urea) se aplicaron 20 kg·ha⁻¹ de nitrógeno al momento de la siembra y 60 kg·ha⁻¹ a los 35 días después de la emergencia. La fertilización base consistió en la aplicación de superfosfato triple (120 kg·ha⁻¹ de P₂O₅) y cloruro de potasio (50 kg·ha⁻¹ de K₂O) al momento de la siembra. El riego se efectuó diariamente reponiendo el volumen de agua necesario para compensar la pérdida por evapotranspiración, obtenida mediante la variación del peso de los recipientes.

A los 63 días después de la emergencia, en la fase de panojamiento, se seleccionaron aleatoriamente cuatro plantas de cada tratamiento y se determinó la altura de planta hasta el cuello de la hoja bandera y el diámetro del tallo en el primer entrenudo en sentido base-ápice. Posteriormente, las plantas fueron cosechadas, se separó la raíz de la parte aérea y se determinó el volumen radical, utilizando el principio de desplazamiento de volúmenes (Böhm, 1979), para lo cual cada muestra se introdujo en un cilindro graduado y se midió el volumen de agua desplazado por las raíces; luego tanto la raíz como las hojas y el tallo se llevaron a estufa a 70 °C por 3 días, y se registró el peso seco de cada componente. También se determinó el contenido

de clorofila (*a* y *b*) en la hoja bandera en cuatro plantas por tratamiento, siguiendo la metodología de Witham et al. (1971). Finalmente, se determinó la concentración de N, P y K en la hoja índice (hoja opuesta al sitio de inserción de la primera mazorca) de esas mismas plantas para lo cual se usó la metodología descrita por Miyazawa et al. (1992).

Ensayo 2: Efecto de la coinoculación de cianobacterias con *Azospirillum brasilense* en genotipos de maíz. Para este ensayo se utilizó la capa superficial de suelo (0-20 cm de profundidad) colectado de en la localidad en Ponta Grossa, Paraná. Sus características químicas fueron las siguientes: pH 5,5; CIC 14,15 cmol_c·dm⁻³, Ca 5,42 cmol_c·dm⁻³, Mg 3,29 cmol_c·dm⁻³, K 0,3 cmol_c·dm⁻³ y P 5,3 mg·dm⁻³. El suelo fue colocado en los recipientes de propagación luego de ser procesado tal como se utilizó en el ensayo 1.

Se utilizaron dos genotipos de maíz (variedad IPR 164 e híbrido DOW 2B587), cuatro inoculantes (*N. muscorum*, *Anabaena* sp., *A. cylindrica*, y *C. brevissima*, 10⁸ UFC·mL⁻¹ de cada especie) coinoculados con *A. brasilense* (fórmula comercial Azo Total, cepas AbV5 y AbV6 con 2,0x10⁸ UFC·mL⁻¹), un tratamiento con sólo *A. brasilense* en la concentración ya indicada y un tratamiento control sin inoculación. Se usó un diseño de completamente al azar en un arreglo factorial de 12 tratamientos (2 genotipos y 6 inoculaciones) con cuatro repeticiones. Todo el procedimiento siguiente, incluyendo la determinación de las variables, fue igual al empleado en el ensayo 1, con la única diferencia que la fertilización se aplicó a la totalidad de las plantas y que la re aplicación de urea consistió en 160 kg·ha⁻¹ de nitrógeno dado que el híbrido utilizado es más demandante por ser de alto rendimiento.

Análisis estadístico. Los resultados de ambos ensayos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey luego de comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Hartley. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1: Efecto de la inoculación con

cianobacterias, con y sin fertilización nitrogenada en maíz. Se observaron efectos significativos aislados ($P \leq 0,05$) para inoculantes

(I) y fertilización (F), en las diferentes variables evaluadas (Cuadro 1). La interacción I x F sólo resultó significativa para la variable área foliar.

Cuadro 1. Probabilidad estadística (P) de detección de diferencias entre tratamientos de inoculación con cianobacterias y fertilización nitrogenada para distintas características fitométricas de plantas de maíz. Ensayo 1

Variables	Probabilidad (prueba de F)			
	Inoculantes	Fertilización	I x F	CV (%)
AP	0,27	0,09	0,99	8,75
AIM	0,16	0,09	0,88	8,83
DT	0,04	0,00	0,99	12,43
AF	0,00	0,00	0,01	8,97
BR	0,00	0,00	0,85	16,76
VR	0,02	0,00	0,91	19,15
BF	0,01	0,00	0,85	12,6
BT	0,06	0,87	0,42	18,22
CHL <i>a</i>	0,52	0,00	0,96	16,55
CHL <i>b</i>	0,00	0,00	0,26	25,36
N	0,43	0,00	0,91	16,11
P	0,09	0,00	0,23	19,94
K	0,99	0,00	0,38	17,28

Altura de la planta (AP), altura de inserción de mazorca (AIM), diámetro del tallo (DT), área foliar (AF), biomasa de la raíz (BR), volumen de la raíz (VR), biomasa foliar (MF), biomasa del tallo (MT), Clorofila *a* (CHL *a*), Clorofila *b* (CHL *b*), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Inoculantes (I), Fertilización (F), coeficiente de variación (CV)

Analizando la respuesta del factor inoculante sobre el diámetro del tallo, se observa que esta variable se incrementó con la inoculación de las cuatro cianobacterias y *A. brasilense* las cuales superaron al tratamiento control (Cuadro 2).

Este efecto positivo sobre el diámetro del tallo es importante porque está directamente relacionado con la tolerancia de la planta al acame así como con una mayor productividad (Mulder, 1954).

Cuadro 2. Características fitométricas de plantas de maíz en respuesta a la inoculación con cianobacterias, en la media de dos niveles de fertilización (con y sin nitrógeno)

Inoculante	DT	BR	VR	BF	CHL <i>b</i>
	(mm)	(g)	(cm ³)	(g)	(mg·g ⁻¹)
<i>N. muscorum</i>	17,83 a	16,65 b	41,88 a	23,97 a	10,65 ab
<i>Anabaena</i> sp.	17,19 a	19,31 ab	45,75 a	22,51 ab	10,51 ab
<i>A. cylindrica</i>	15,76 a	22,13 a	51,88 a	23,37 ab	11,23 a
<i>C. brevissima</i>	15,57 a	19,81 ab	47,00 a	21,11 ab	8,67 ab
<i>A. brasilense</i>	15,36 a	16,48 b	41,88 a	20,49 ab	7,68 ab
Control	14,91 b	11,88 c	29,38 b	19,27 b	7,48 b

Diámetro del tallo (DT), biomasa de la raíz (BR), volumen de la raíz (VR), biomasa foliar (BF), clorofila *b* (CHL *b*). Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Zambrano et al. Inoculación con cianobacterias y coinoculación con *A. brasilense* en maíz

En cuanto al volumen radical, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los inoculantes estudiados, pero éstos sí provocaron un aumento en esta variable con respecto al tratamiento control (Cuadro 2). Un comportamiento similar fue observado en relación a la biomasa de la raíz ya que todos los inoculantes indujeron un aumento significativo de la misma, pero en la inoculación con *A. cylindrica* éste fue de mayor magnitud, diferenciándose de los valores obtenidos para la inoculación con *N. muscorum*, *A. brasilense* y el control (Cuadro 2). Cabe indicar que Picazevicz et al. (2017) encontraron un efecto positivo sobre la biomasa de raíces de maíz cuando inocularon las semillas con *A. brasilense*. El efecto promotor en la acumulación de biomasa radical, que se observó en este estudio principalmente mediante la inoculación con *A. cylindrica*, resulta interesante ya que se ha demostrado que el uso de cianobacterias aumenta la actividad biológica en la rizosfera de plantas de maíz en términos de bacterias totales y actividad biológica, además de promover la síntesis de hormonas como auxina y citocinina, lo que puede conducir a una reducción del uso de fertilizantes químicos (Ghazal et al., 2013).

Con respecto a la biomasa foliar, el mayor valor fue obtenido cuando se inoculó con la cianobacteria *N. muscorum*, siendo el mismo significativamente más alto, respecto al tratamiento control; este hallazgo resulta de interés, dada la importancia de la biomasa foliar en la elaboración de fotoasimilados y la productividad del cultivo (Beleze et al., 2003).

Resultados similares fueron obtenidos por Picazevicz et al. (2017) cuando inocularon semillas de maíz con *A. brasilense* y encontraron un mayor desarrollo de las plantas respecto a aquellas que solo recibieron fertilización nitrogenada.

Con relación a la clorofila *b*, su contenido fue significativamente mayor que en el control cuando se realizó la inoculación con *A. cylindrica* (Cuadro 2). Este pigmento es de suma importancia ya que proporciona información valiosa sobre el estado fisiológico de las plantas, ya que tiene relación con la nutrición nitrogenada (Zhao et al., 2003). Mohan et al. (2015), en un estudio en el que aplicaron 15 cianobacterias aisladas como inoculantes en maíz, encontraron un aumento significativo en la concentración de clorofila, en este caso la clorofila *a*, revelando que estos aislados de cianobacterias pueden aportar resultados positivos para el crecimiento del cultivo de maíz y resultar efectivos como bio-fertilizantes.

En el Cuadro 3 se muestran los valores para las variables fitométricas que resultaron con diferencia significativa en los tratamientos sin y con fertilización nitrogenada. Se observa que en la mayoría de los casos la aplicación del fertilizante promovió mayores valores con relación al tratamiento control. Sin embargo, ocurrió lo contrario para la biomasa y volumen de raíces. Aunque no hay una explicación clara para este comportamiento del órgano subterráneo, podría estar asociado a lo encontrado por Herschkovitz et al. (2005) quienes observaron mayor biomasa radical y volumen de raíces en suelos con limitaciones nutricionales.

Cuadro 3. Características fitométricas de plantas de maíz en respuesta a dos niveles de fertilización (con y sin nitrógeno) como promedio de seis niveles de inoculación

Dosis	DT (mm)	BR (cm ³)	VR (cm ³)	BF (g)	CHL <i>a</i> (mg·g ⁻¹)	CHL <i>b</i> (mg·g ⁻¹)	N (g·kg ⁻¹)	P (g·kg ⁻¹)	K (g·kg ⁻¹)
0 kgN ⁻¹	15,22 b	20,31 a	48,71 a	20,20 b	22,20 b	6,01 b	10,64 b	1,65 b	19,38 b
60 kgN ⁻¹	16,98 a	15,11 b	37,21 b	23,37 a	30,13 a	12,73a	19,023 a	2,28 a	22,79 a

Diámetro del tallo (DT), biomasa de raíces (MR), volumen de la raíz (VR), biomasa foliar (MF), clorofila *a* (CHL *a*), clorofila *b* (CHL *b*), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K). Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

En el Cuadro 4 se observan los resultados de la interacción I x F en el área foliar. Los mayores valores fueron obtenidos mediante la inoculación con *A. cylindrica* cuando se aplicó fertilizante y

con *N. muscorum* cuando no recibió aplicación alguna. Ambos tratamientos superaron estadísticamente al resto de las combinaciones de inoculante por fertilizante.

Cuadro 4. Interacción para el área foliar, en respuesta a la inoculación con cianobacterias en dos niveles de fertilización (con y sin nitrógeno)

Inoc/N	<i>N. muscorum</i>	<i>Anabaena</i> sp.	<i>A. cylindrica</i>	<i>C. brevisissima</i>	<i>A. brasilense</i>	Control
	Área foliar (cm ²)					
0 kg N ⁻¹	5771,37 aA	4887,60 abA	4733,03 bcB	3931,29 cdB	3804,69 dB	3557,47 dB
60 kg N ⁻¹	5557,55 abA	5462,79 abA	6228,06 aA	4995,18 bcA	4526,07 cA	4251,62 cA

Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Mayúscula en la columna y minúscula en la fila

Similarmente a lo observado en este estudio, Sholkamy et al. (2012) probaron el efecto de la biofertilización con *N. muscorum* o *N. rivulare* en el desarrollo de plantas de maíz en una investigación en condiciones de invernadero, y evidenciaron que estas cianobacterias provocaron un aumento significativo en la longitud de las raíces y el área foliar de las plantas, aisladamente o en combinación con la fertilización nitrogenada (50 y 100 kg·ha⁻¹). El tratamiento combinado de biofertilización y fertilización nitrogenada, especialmente en la dosis más alta, fue el que promovió mayormente las variables de crecimiento, en comparación con la biofertilización aislada. Mahmoud (1999) también encontró aumentos significativos en los parámetros de crecimiento, como el área foliar y el contenido de compuestos nitrogenados en varios cultivos, entre ellos el maíz, ante la aplicación de la cianobacteria *N. muscorum*.

Ensayo 2: Efecto de la coinoculación de cianobacterias con *Azospirillum brasilense* en dos genotipos de maíz. Se encontraron efectos aislados significativos para inoculación y genotipos para las características fitométricas evaluadas en plantas de maíz (Cuadro 5). La interacción inoculación por genotipos solo resultó significativa para la variable contenido de K foliar (Cuadro 5).

La altura de inserción de la mazorca fue superior en el tratamiento de coinoculación *A. cylindrica* + *A. brasilense* (Cuadro 6), lo cual representa una característica beneficiosa para la cosecha mecanizada del cultivo (Possamai et al., 2001). Este resultado difiere del obtenido por Libório (2016) quien no encontró diferencias para esta característica en un estudio en el cual se utilizó inoculación con *A. brasilense*. Es posible que el incremento en la altura de inserción de la mazorca observado en esta investigación sea producto de un efecto sinérgico de la

cianobacteria sobre *A. brasilense*.

En cuanto al área foliar, la coinoculación entre *A. cylindrica* y *A. brasilense* provocó un aumento significativo en esta variable, en relación al control (Cuadro 6). Por el contrario, Pandolfo et al. (2015) no encontraron efecto significativo sobre esta característica al realizar la inoculación con *A. brasilense* en maíz, lo que indica que la coinoculación de esta bacteria con *A. cylindrica*, parece tener un efecto sinérgico.

Cuadro 5. Probabilidad estadística (*P*) de detección de diferencias entre tratamientos de coinoculación de cianobacterias con *Azospirillum brasilense* y genotipos de maíz para distintas características fitométricas de la planta. Ensayo 2

Variables	Probabilidad (prueba de F)			
	Inoculante	Genotipo	IxG	CV (%)
AP	0,12	0,21	0,65	8,83
AIM	0,01	0,92	0,51	7,23
DT	0,09	0,12	0,41	13,50
AF	0,03	0,00	0,54	14,21
BR	0,00	0,87	0,94	18,27
VR	0,00	0,89	0,80	17,05
BF	0,00	0,18	0,15	16,24
BT	0,00	0,00	0,27	16,53
CHL <i>a</i>	0,69	0,91	0,84	9,56
CHL <i>b</i>	0,00	0,75	0,47	37,46
N	0,37	0,86	0,97	13,98
P	0,31	0,20	0,85	20,17
K	0,33	0,04	0,06	9,69

Altura de la planta (AP), altura de la inserción de la mazorca (AIM), diámetro del tallo (DT), área foliar (AF), biomasa de la raíz (BR), volumen de la raíz (VR), biomasa foliar (BF), biomasa del tallo (BT), Clorofila *a* (CHL *a*), Clorofila *b* (CHL *b*), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K). Inoculantes (I), Abono (A), Genotipo (G), coeficiente de variación (CV).

Zambrano et al. Inoculación con cianobacterias y coinoculación con *A. brasilense* en maíz**Cuadro 6.** Características fitométricas de plantas de maíz en respuesta a la coinoculación con cianobacterias y *A. brasilense*, como promedio de dos genotipos de maíz

Inoculantes	AIM (m)	AF (cm ²)	BR (g)	VR (cm ³)	BF (g)	BT (g)	CHL <i>b</i> (mg·g ⁻¹)
<i>N. muscorum</i> + <i>A. brasilense</i>	1,02 ab	4775,60 ab	20,00 bc	52,50 abc	24,55 b	57,57 b	14,98 b
<i>Anabaena</i> sp.+ <i>A. brasilense</i>	1,04 ab	5136,14 ab	22,04 abc	55,38 abc	26,71 ab	60,14 b	15,84 b
<i>A. cylindrica</i> + <i>A. brasilense</i>	1,12 a	5840,45 a	25,91 a	65,00 a	31,69 a	77,59 a	27,16 a
<i>C. brevisissima</i> + <i>A. brasilense</i>	1,05 ab	5412,50 ab	22,76 ab	57,50 ab	28,50 ab	62,71 ab	17,68 ab
<i>A. brasilense</i>	1,04 ab	4940,27 ab	18,84 bc	50,38 bc	27,36 ab	64,04 ab	15,75 b
Control	0,97 b	4664,79 b	16,48 c	42,63 c	22,14 b	52,74 b	13,92 b

Altura de inserción de mazorca (AIM), área foliar (AF), biomasa de la raíz (BR), volumen de la raíz (VR), biomasa foliar (BF), biomasa del tallo (BT), Clorofila *b* (CHL *b*). Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

La coinoculación con *A. cylindrica* + *A. brasilense* propició el aumento de la biomasa y volumen de la raíz, en relación con *A. brasilense* y el control (Cuadro 5). En una investigación realizada en invernadero usando coinoculación de las cianobacterias *N. muscorum* y *N. rivulare*, en semillas de maíz se determinó que la efectividad de cianobacterias del género *Nostoc* fue mayor con la coinoculación, lo que se tradujo en un incremento significativo en el crecimiento del sistema radical, en comparación con el tratamiento sin inoculación (Sholkamy et al., 2012).

Asimismo, se constató un efecto positivo de la coinoculación con *A. cylindrica* + *A. brasilense* en la biomasa foliar, con diferencias significativas respecto a la combinación *N. muscorum*+*A. brasilense* y al tratamiento control (Cuadro 6); un efecto estimulante similar se observó en cuanto a la biomasa del tallo, para la coinoculación *A. cylindrica* + *A. brasilense*, la cual resultó significativamente mayor respecto a las coinoculaciones de *N. muscorum* + *A. brasilense*, *Anabaena* sp. + *A. brasilense* y al tratamiento control.

Por otra parte, el contenido de clorofila *b* se incrementó con la coinoculación y el efecto fue significativamente mayor en el tratamiento en el que se combinó *A. cylindrica* + *A. brasilense*, siendo éste diferente al que se obtuvo en los tratamientos con *N. muscorum* + *A. brasilense*, *Anabaena* sp. + *A. brasilense*, *A. brasilense* y del control (Cuadro 6). La inoculación sólo con *A. brasilense* no tuvo efecto sobre esta variable, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Bashan et al. (2014).

En relación al comportamiento de los materiales genéticos de maíz probados, se detectaron diferencias significativas entre éstos para las variables área foliar y biomasa del tallo (Cuadro 5), observándose en ambas un valor significativamente más alto en el híbrido DOW 2B587, en comparación con la variedad IPR164 (Cuadro 7). Lo anterior pudiera estar asociado con la mayor precocidad del híbrido 2B587, ya que se ha encontrado que los materiales genéticos más precoces usualmente poseen mayor área foliar y acumulan mayor biomasa (Guimaraes et al., 2002).

Cuadro 7. Área foliar (AF) y biomasa el tallo (BT) en dos genotipos de maíz como promedio de diferentes tratamientos de inoculación con cianobacterias

	AF (cm ²)	BT (g)
Variedad	4720,45 B	56,76 B
Híbrido	5536,15 A	68,17 A

Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la interacción I x G en el contenido de K foliar. Se observa que la variedad IPR164 superó al híbrido 2B587 en los tratamientos de *N. muscorum*+*A. brasilense* y *Anabaena* sp.+*A. brasilense*. Dentro de la variedad, todos los tratamientos de coinoculación superaron al control, mientras que dentro del híbrido no hubo diferencias con relación a éste. Lo anterior pudiera explicarse con

base en los resultados de Horn et al. (2006), quienes trabajando con millo, encontraron variación en los parámetros cinéticos de absorción

de K, constatando que una variedad mostró tendencia a absorber más K en comparación con un híbrido simple o doble.

Cuadro 8. Interacción para K foliar ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) en respuesta a la coinoculación con cianobacterias y *A. brasilense* en dos genotipos de maíz

Coinocul. / Genotipo	<i>N. muscorum</i> + <i>A. brasilense</i>	<i>Anabaena</i> sp.+ <i>A. brasilense</i>	<i>A. cylindrica</i> + <i>A. brasilense</i>	<i>C. brevissima</i> + <i>A. brasilense</i>	Control
Variedad	25,25 ab	26,75 a	26,00 a	26,50 a	21,75 c
Híbrido	22,00 c	22,50 bc	24,00 abc	24,25 abc	24,25 abc

Medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba LSD ($P \leq 0,10$)

Estos resultados demuestran que la coinoculación de cianobacterias con *Azospirillum brasilense* en genotipos de maíz, tuvo un efecto estimulante en las características fitométricas ya descritas, independientemente de los genotipos estudiados. El tratamiento de coinoculación con *A. cylindrica* + *A. brasilense* superó al control en todas las variables donde existieron diferencias significativas, mientras que el tratamiento de *C. brevissima*+*A. brasilense* lo superó en crecimiento de la raíz, lo que evidencia el potencial de estos microorganismos para promover el desarrollo del cultivo de maíz en condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

La fertilización nitrogenada tuvo efecto positivo sobre la variedad IPR164 en la mayoría de las variables consideradas en el estudio.

La inoculación de semillas de maíz con cianobacterias tuvo un efecto estimulante sobre varias características fitométricas en la variedad IPR164. Los tratamientos de inoculación más efectivos fueron en los que se usó *Nostoc muscorum* y *Anabaena cylindrica*.

La coinoculación de las semillas de maíz con cianobacterias más *Azospirillum brasilense* promovió un mayor desarrollo de los genotipos probados, especialmente debido a su efecto sobre el crecimiento del sistema radical, resultando la mejor combinación de *A. cylindrica* y *A. brasilense*, la cual parece tener gran potencial de uso en el cultivo de maíz.

AGRADECIMIENTO

F. Zambrano y D.S. Andrade agradecen la beca de Doctorado de la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior

(CAPES) y de la Fundação Araucaria (subvención 42306/2014), respectivamente.

LITERATURA CITADA

1. Abed, R.M., S. Dobretsov y K. Sudesh. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 106(1): 1-12.
2. Barrios, M. y C. Basso, C. 2018. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre componentes del rendimiento y calidad nutricional del grano de seis híbridos de maíz. *Bioagro* 30(1): 39-48.
3. Bashan, Y., L. De-Bashan, S. Prabhu y J. Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 378(1-2): 1-33.
4. Beleze, J.R., L.M. Zeoula, U. Cecato, P.H. Dian, E.N. Martins y A.D. Falcão. 2003. Avaliação de cinco híbridos de milho (*Zea mays*, L.) em diferentes estádios de maturação. 1. Produtividade, características morfológicas e correlações. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32(3): 529-537.
5. Böhm, W. 1979. Methods of studying root systems. *Ecological studies* 33. Springer-Verlag. Berlin.
6. Brouwer, P., A. Bräutigam, V. Buijs, A. Tazelaar, A. Van der Werf, U. Schlüter y H. Schlupepmann. 2017. Metabolic adaptation, a specialized leaf organ structure and vascular responses to diurnal N_2 fixation by *Nostoc azollae* sustain the astonishing productivity of Azolla ferns without nitrogen fertilizer. *Frontiers in Plant Science* 8: 442.
7. Duchoud, F., D. Chuang y J. Liao. 2017.

- Cyanobacteria as a host organism. *Industrial biotechnology: Microorganisms*. pp. 581-604.
8. Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 1997. Manual de métodos de análises de solo. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Rio de Janeiro. 212 p.
 9. Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)* 35(6): 1039-1042.
 10. Ghazal, F., M. El-Koomy, K. Abdel-Kawi y M. Soliman. 2013. Impact of cyanobacteria, humic acid and nitrogen levels on maize (*Zea mays* L.) yield and biological activity of the rhizosphere in sandy soils. *Journal of American Science* 9(2): 46-55.
 11. Guimaraes, D.P., L.M. Sans y A.V. Moraes. 2002. Estimativa da área foliar de cultivares de milho. XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. 1 a 5 de setembro, Embrapa. Florianópolis-SC. 5 p. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34888/1/Estimativa-area.pdf> (consulta del 03-06-2019).
 12. Herschkovitz, Y., A. Lerner, Y. Davidov, M. Rothballer, A. Hartmann, Y. Okon y E. Jurkevitch. 2005. Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50(2): 277-288.
 13. Horn, D., P.R. Ernani, L. Sangoi, C. Schweitzer y P.C. Cassol. 2006. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. *Revista Brasileira Ciência do Solo* 30(1): 77-85.
 14. Jhala, Y., D. Panpatte y R. Vyas. 2017. Cyanobacteria: Source of organic fertilizers for plant growth. In: D.G. Panpatte et al. (eds.). *Microorganisms for Green Revolution*. pp. 253-264.
 15. Libório, P.H. 2016. Inoculação com *Azospirillum brasilense* associada á adubação nitrogenada reduzida em híbridos de milho. *Nucleus* 13(2): 241-252.
 16. Ladha, J., A. Tirol-Padre, C. Reddy, K. Cassman, S. Verma, D. Powlson et al. 2016. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. *Scientific Reports* 6 (19355). 9 p.
 17. Mahmoud, S.A. 1999. Promotive effect of the Cyanobacterium *Nostoc muscorum* on the growth of some crop plants. *Acta Microbiologica Polonica (Poland)* 48(2): 163-171.
 18. Miyazawa, M., M.A. Pavan y M.F. Bloch. 1992. Análise química de tecido vegetal. Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina. Circular 74. 17 p.
 19. Mohan, A., B. Kumar y D. Nath 2015. Cyanobacterial consortium in the improvement of maize crop. *Int. J Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 4: 264-274.
 20. Mulder, E.G. 1954. Effect of mineral nutrition on lodging of cereals. *Plant and Soil* 5(3): 246-306.
 21. Muro-Pastor, A.M., M. Brenes-Álvarez y A. Vioque. 2017. A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacteria. *Environmental Microbiology Reports* 9(4): 449-458.
 22. Pandolfo, C., G. Vogt, A. Balbinot Júnior, G. Gallotti y S. Zoldan. 2015. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. *Agropecuária Catarinense* 27(3): 94-99.
 23. Pathak, J., P. Maurya, S. Singh, D. Häder y R. Sinha. 2018. Cyanobacterial Farming for Environment Friendly Sustainable Agriculture Practices: Innovations and Perspectives. *Frontiers in Environmental Science* 6, artículo 7, 13 p.
 24. Picazevicz, A., J. Kusdra, y A.D. Moreno. 2017. Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 21(9): 623-627.
 25. Possamai, J.M., C.M. Souza y J.C. Galvão. 2001. Sistemas de preparo do solo para o cultivo do milho safrinha. *Bragantia* 60: 79-82.
 26. Prasanna, R., F. Hossain, S. Babu, N. Bidyarani, A. Adak y S. Verma. 2015. Prospecting cyanobacterial formulations as plant-growth-promoting agents for maize hybrids. *South African Journal of Plant and*

- Soil 32(4): 199-207.
27. Sholkamy, E., H. El-Komy, A. Al-Arfaj, A. Abdel-Megeed y A. Mostafa. 2012. Potential role of *Nostoc muscorum* and *Nostoc rivulare* as biofertilizers for the enhancement of maize growth under different doses of N-fertilizer. African Journal of Microbiology Research 6(48): 7435-7448.
28. Stanier, R., R. Kunisawa, M. Mandel y G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological Reviews 35(2): 171.
29. Witham, F., D. Blaydes y R. Devlin. 1971. Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determinations. In: Experiments in Plant Physiology. Von Nostra and Ren Fold. New York. pp. 55-56.
30. Zhao, D., K. Reddy, V. Kakani, J. Read y G. Carter. 2003. Corn (*Zea mays* L.) growth, leaf pigment concentration, photosynthesis and leaf hyperspectral reflectance properties as affected by nitrogen supply. Plant and Soil 257(1): 205-218.