

# La tarea de detectar efectos de compuestos biológicos sobre el rendimiento de cultivos

Gerardo Rubio<sup>1\*</sup> y Martín Díaz-Zorita<sup>2</sup>

El número de microorganismos con potenciales efectos benéficos para los cultivos es muy elevado. Genéricamente, pueden ser denominados microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (MPCP). Actualmente constituyen una de las áreas más activas dentro de las investigaciones agronómicas. Entre las acciones beneficiosas se encuentra la fijación libre o simbiótica de nitrógeno (N), la solubilización de fósforo (P) y otros nutrientes, el control de agentes patógenos, el aporte de sustancias que estimulan el crecimiento de la planta (típicamente auxinas y ácidos orgánicos precursores de la síntesis de hormonas) y de controladores de estrés (Ejemplo, moléculas señal de comunicación entre microorganismos y plantas) (Dutta y Podile 2009; Lugtenbertg y Kamilova, 2009) (**Tabla 1**).

Muchos de los estudios que describen los modos de acción de microorganismos potencialmente benéficos han sido desarrollados en macetas bajo condiciones controladas tanto en cámaras de crecimiento como en invernáculos (Van Dommelen et al., 2009; Rodrigues et al., 2008) y tienen limitada extrapolación a condiciones corrientes de producción. Los ensayos a campo que evalúan los aportes de la inoculación con microorganismos en cultivos extensivos bajo prácticas corrientes de producción son menos frecuentes. Además, la interpretación de sus resultados es variada y no siempre conclusiva. Esto en parte se explica por la complejidad en los diseños experimentales para analizar múltiples modos de acción como también del resultado de las interacciones con diversas condiciones de estrés a mitigar por la actividad de los microorganismos. Los diseños experimentales frecuentes consideran sitios individuales durante pocas campañas de producción o varias localidades en un mismo ciclo productivo explorando diversas condiciones ambientales. En cada sitio, los tratamientos normalmente se disponen según diseños en bloques completos aleatorizados o en parcelas divididas según factores principales de manejo representativos de

prácticas de producción del cultivo (Ejemplo, fertilización, genotipos, etc.).

Este tipo de diseño experimental muestra algunas limitaciones para el análisis e interpretación de los resultados por la ocurrencia de interacciones temporales y espaciales de carácter aleatorio. Es por esto que algunos estudios se han desarrollado considerando abundantes localidades y en múltiples ciclos productivos. De este modo, se explora un amplio rango de condiciones ambientales bajo prácticas frecuentes de manejo de la producción de los cultivos en estudio. En estos trabajos se pueden describir los efectos asociados a factores fijos (Ejemplo, tipo de suelo) o aleatorios (condiciones ambientales durante los ciclos productivos) (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009). Una mejor interpretación de los resultados requiere del análisis según la frecuencia de su ocurrencia además de discriminar entre factores jerárquicos que influyen sobre la productividad y respuesta a la producción. Dada la gran variabilidad en las respuestas a la inoculación con microorganismos, estos estudios requieren de una vasta cantidad de casos (o ensayos) para hallar diferencias significativas entre tratamientos.

Por un lado, se debe considerar que aunque en algún trabajo particular un microorganismo haya sido identificado como MPCP, el mismo no necesariamente ejercerá un efecto similar en cualquier circunstancia. Para que se produzcan efectos simbióticos entre plantas y microorganismos deben darse condiciones que determinen un mutuo beneficio. Usualmente esas condiciones están circunscriptas a un estrecho margen. En tal sentido, debe recordarse que el objetivo fundamental de cualquier especie es el de perpetuarse a sí misma por medio de la conservación de sus genes a través del tiempo más que el de colaborar para la perpetuación de los genes de sus vecinos. Por otro lado, también es importante considerar que la evaluación de la respuesta al agregado de compuestos de origen biológico

tiene la particularidad que, en caso de producirse, suele ser de magnitudes reducidas, y estar sujeta a complejos y variables factores. De hecho, la mayoría de los trabajos publicados que utilizan técnicas de análisis convencionales arroja efectos no significativos (Lugtenbertg y Kamilova, 2009). Indudablemente, la evaluación de estos tratamientos constituye no solamente un desafío para los investigadores, sino también para los proveedores de servicios que desarrollan soluciones de origen biológico.

**Tabla 1. Tipos de microorganismos benéficos para el crecimiento de las plantas, sus efectos sobre las plantas y algunos ejemplos.**

Tipo	Efectos	Ejemplos
Biofertilizantes	Incrementan el suministro de nutrientes del huésped	Fijación biológica de N Mineralización de P orgánico Solubilización de P inorgánico
Biomejoradores del rendimiento	Producen fitohormonas (AIA, giberelinas, etileno)	Producción de fitohormonas y precursores de fitohormonas
Biocontroladores	Controlan agentes fitopatógenos	Producción de antibióticos, HCN, enzimas hidrolíticas

<sup>1</sup> INBA-CONICET y Cátedra Fertilidad y Fertilizantes, Facultad de Agronomía (UBA), Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup> Monsanto BioAg, Pilar (Buenos Aires), Argentina

\* Autor de contacto. Correo electrónico: rubio@agro.uba.ar

Normalmente, a medida que aumenta el nivel de aplicación de una tecnología, la productividad por hectárea también crece, pero los sucesivos incrementos son, cada vez, de menor magnitud. Por lo tanto, la comprobación de estos eventuales incrementos en el rendimiento (o la falta de ellos) es más difícil de evaluar. Y aquí podemos distinguir dos casos contrastantes, que llamaremos A y B (**Figura 1**). El caso A, lo ejemplificamos a través de un nutriente como el N y el caso B, a través de los MPCP. En los casos A es esperable hallar respuestas variables desde 0 hasta más de dos dígitos porcentuales. Los “insumos” agrupados en los casos A suelen poseer algún parámetro que permite predecir, con menor o mayor precisión, las eventuales respuestas en el crecimiento de los cultivos ante su agregado. Por ejemplo, la disponibilidad de N-nitrato del suelo permite diagnosticar y estimar las probables respuestas al agregado del N en muchos cultivos. Las respuestas nulas o pequeñas se agrupan en aquellos sitios en los cuales el contenido de N-nitrato es mayor a determinado umbral, mientras que las mayores se agrupan en aquellos suelos pobres en N-nitrato. En los casos del tipo B (MPCP), usualmente no existe un parámetro confiable que permita predecir la eventual respuesta del cultivo a su agregado. Por otro lado, si efectivamente hay respuesta, la misma es de menor magnitud relativa que en el caso A, usualmente de un solo dígito porcentual. Estos puntos llevan a la cuestión central de este reporte, que es la disyuntiva de cómo evaluar estos casos que frecuentemente describen situaciones de uso de tecnologías de origen biológico aplicadas para la producción de cultivos.

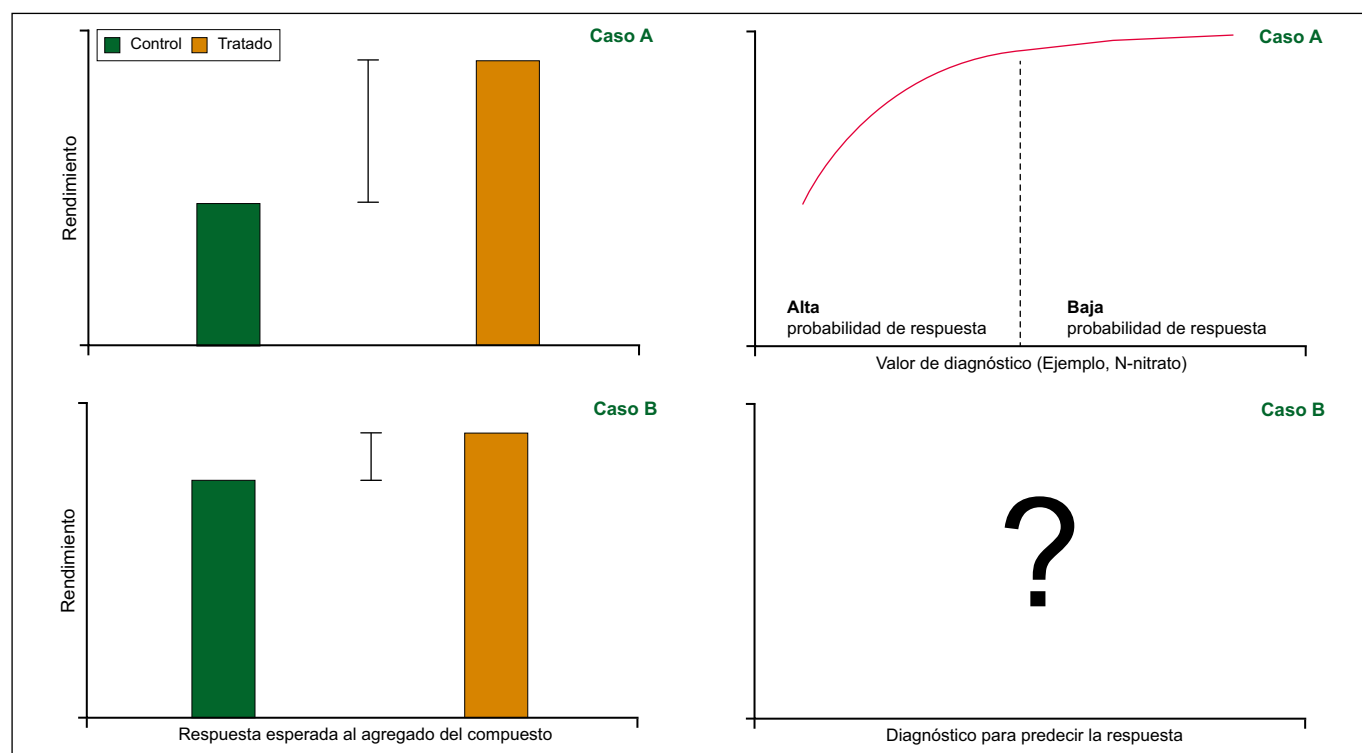
El método clásico de analizar experimentos de campo en agronomía es realizar ensayos con 3 a 5 repeticiones y considerar un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 5% para la diferenciación entre medias de los tratamientos bajo evaluación. No necesariamente este es el diseño más adecuado para analizar los casos tipo B.

### Las herramientas estadísticas

Al experimentar con compuestos biológicos con fines agronómicos deben ser tenidos especialmente en cuenta los tres principios básicos del diseño de experimentos: la aleatorización, el control local y la replicación.

La aleatorización se refiere a la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales. Esta asignación debe ser realizada totalmente al azar de modo tal que cada posible asignación de tratamientos a las unidades tenga la misma probabilidad de ocurrencia para remover sesgos y fuentes de variación ajenas a los tratamientos. Con el control local se trata de minimizar, a través de un estricto control de las condiciones experimentales, el hecho de que no todas las fuentes de variación ajenas son removidas por la aleatorización y la replicación. En experimentos de campo esto implica extremar el control de las variables que puedan afectar la sanidad, la nutrición y el estado hídrico de los cultivos. También se incluye en el control local la agrupación de las unidades experimentales dentro de bloques homogéneos.

Finalmente, la replicación es la estructura de repetición del experimento básico. En el campo, los tratamientos deben ser aplicados a varias unidades experimentales.



**Figura 1.** Casos A y B de la respuesta al agregado de un compuesto o de un fertilizante. En el caso A (Ejemplo, N) existen parámetros que permiten predecir la respuesta esperada (Ejemplo, disponibilidad de N-nitrato). En la zona de alta probabilidad de respuesta, es esperable obtener incrementos de mayor magnitud. En el caso B (Ejemplo, MPCP) usualmente no existen parámetros que permitan predecir la respuesta al agregado del producto. Además, la respuesta esperada suele ser de menor magnitud.

Determinar el número de repeticiones es una de las etapas claves en el diseño de experimentos y en la estimación del efecto promedio del tratamiento y de su variabilidad; más aún en casos en que se espera que los tratamientos ejerzan efectos pequeños sobre las variables de respuesta. Existen varias formas de calcular el número adecuado de repeticiones por tratamiento. Una de ellas, recomendada para evaluar efectos de tratamientos (biológicos o no) sobre parámetros del crecimiento de plantas, es la propuesta por Clewer y Scarisbrick (2001). La misma requiere definir de antemano el nivel de confianza para controlar el riesgo de error de tipo I, de rechazar la hipótesis nula de ausencia de efecto cuando los tratamientos no difieren en forma verdadera entre sí. Este riesgo se controla con el nivel de confianza, cuyo valor depende del porcentaje de seguridad a considerar (generalmente el 95%,  $\alpha = 0.05$ ). También se requiere de antemano una estimación del desvío estándar de la población y del intervalo de confianza que se considera suficiente para establecer las diferencias entre tratamientos. La fórmula propuesta es:

$$r = 2 \frac{t^2 s^2}{d^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

dónde  $r$  es el número de repeticiones,  $t$  es el valor  $t$  de Student para el nivel de confianza deseado y los grados de error del muestreo inicial,  $s$  es el desvío estándar en el pre-muestreo y  $d$  es la diferencia a detectar o magnitud esperada de respuesta.

En la **Figura 2** se presenta un ejemplo para ilustrar la determinación del número de repeticiones. Se observa que el número "clásico" de repeticiones (4 ó 5) y de nivel de confianza (95%), en este caso, sería suficiente para detectar incrementos en el rendimiento de más del 15% pero insuficiente para detectar diferencias menores.

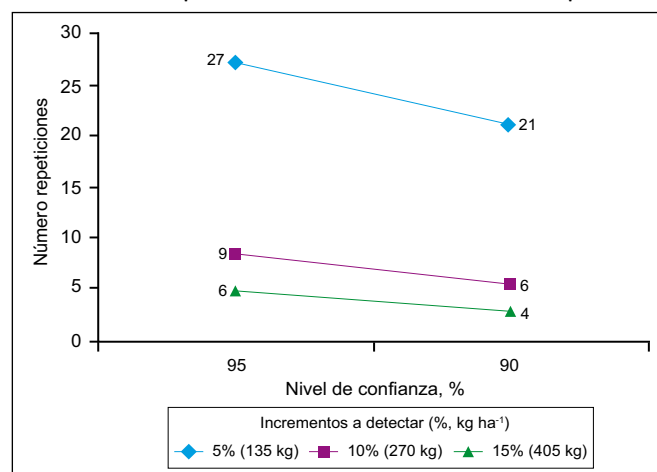
La comparación entre unidades o parcelas con plantas inoculadas y controles sin inocular se suele realizar mediante franjas apareadas. Estas franjas se distribuyen en amplias áreas cubriendo diferentes condiciones de sitio (Ejemplo, tipo de suelo) y se establecen en una o varias campañas productivas. Dentro de cada par de franjas, y considerando las diferentes condiciones de sitio a incluir como factor anidado de análisis, se establecen aleatoriamente un número de sectores de evaluación geoposicionados donde se realizan las evaluaciones de productividad de los cultivos. Para el análisis de los resultados se consideran metodologías de estadística descriptiva (media y parámetros de dispersión) de cada uno de los tratamientos discriminando según factores espaciales (sitio) y temporales (campañas). Además se utiliza el análisis de la varianza bajo un diseño factorial en parcelas divididas con campañas y tratamientos bajo análisis como factores principales y sitios como factor dividido. En caso de ser necesario, se aplican transformaciones de los datos para cumplimentar los supuestos de normalidad del error y homogeneidad de varianzas. Este procedimiento experimental puede

involucrar alta inversión (área bajo estudio, extensión del cultivo, etc.), aunque permite alcanzar una elevada cantidad de observaciones limitando la complejidad operativa de extensos y complejos diseños experimentales.

Resultados de este tipo de evaluaciones, establecidas en cultivos de trigo en sitios representativos del área sudoeste de Buenos Aires mostraron que la cantidad de muestras requeridas para describir, con un 95% de confianza, diferencias en producción entre cultivos inoculados con *Azospirillum brasilense* con respecto al control sin inoculación difieren entre campañas. Por ejemplo, en condiciones normales de producción serían necesarias entre 60 y 75 observaciones mientras que en años con sequías y menores rendimientos se requerirían unas 200. Esta abundante cantidad de observaciones puede reducirse al limitar la ubicación de las muestras a sitios espacialmente homogéneos (Díaz-Zorita et al., 2015).

### Aproximaciones probabilísticas

Las respuestas de los cultivos a los productos de origen biológico no se relacionan estrechamente con factores fijos únicos que pueden ser evaluados de antemano. Esta es una diferencia sustancial con la respuesta a los fertilizantes, que puede ser anticipada, al menos parcialmente, mediante análisis de suelo. Este comportamiento limita la posibilidad de predicción certera para su aplicación sustentando decisiones de manejo productivo. En estos casos, se requiere un análisis alternativo de los datos experimentales que integre poblaciones extensas de pares de casos con y sin la aplicación del tratamiento correspondientes a condiciones representativas de su ámbito de aplicación



**Figura 2. Estimación del número de repeticiones.** Se analiza un caso en el que queremos evaluar el efecto de un compuesto biológico X aplicado sobre un cultivo de soja de un área determinada. De la campaña anterior, en esta área, se posee el dato que el cultivo alcanzó un rendimiento promedio de 2764 kg ha<sup>-1</sup>, con un coeficiente de variación de 8.99%, lo cual significa un desvío estándar de 248.48 y una variancia de 61 744. Utilizando la (Ec. 1), y la información descrita de la campaña anterior, se calcula el número de repeticiones para poder detectar incrementos en el rendimiento del 5 al 15% y utilizando dos niveles de confianza, 90 y 95%.

(Ejemplo, región, tipo de manejo del cultivo, etc.). Cuando los datos disponibles son escasos y se dispone de opiniones expertas de soporte en su análisis se pueden emplear herramientas tales como la simulación Monte Carlo o el análisis de distribución de frecuencias Betapert (Berger y Pena, 2013). Estos métodos permiten estimar la probabilidad de distribución de resultados de variables aleatorias para el análisis de incertidumbre (Berger y Pena, 2013). En el caso de disponer de un número elevado de casos, es recomendable analizar la distribución acumulada de los resultados. En su interpretación se pueden identificar no solo los rangos de respuestas sino las proporciones con respecto a niveles de referencia.

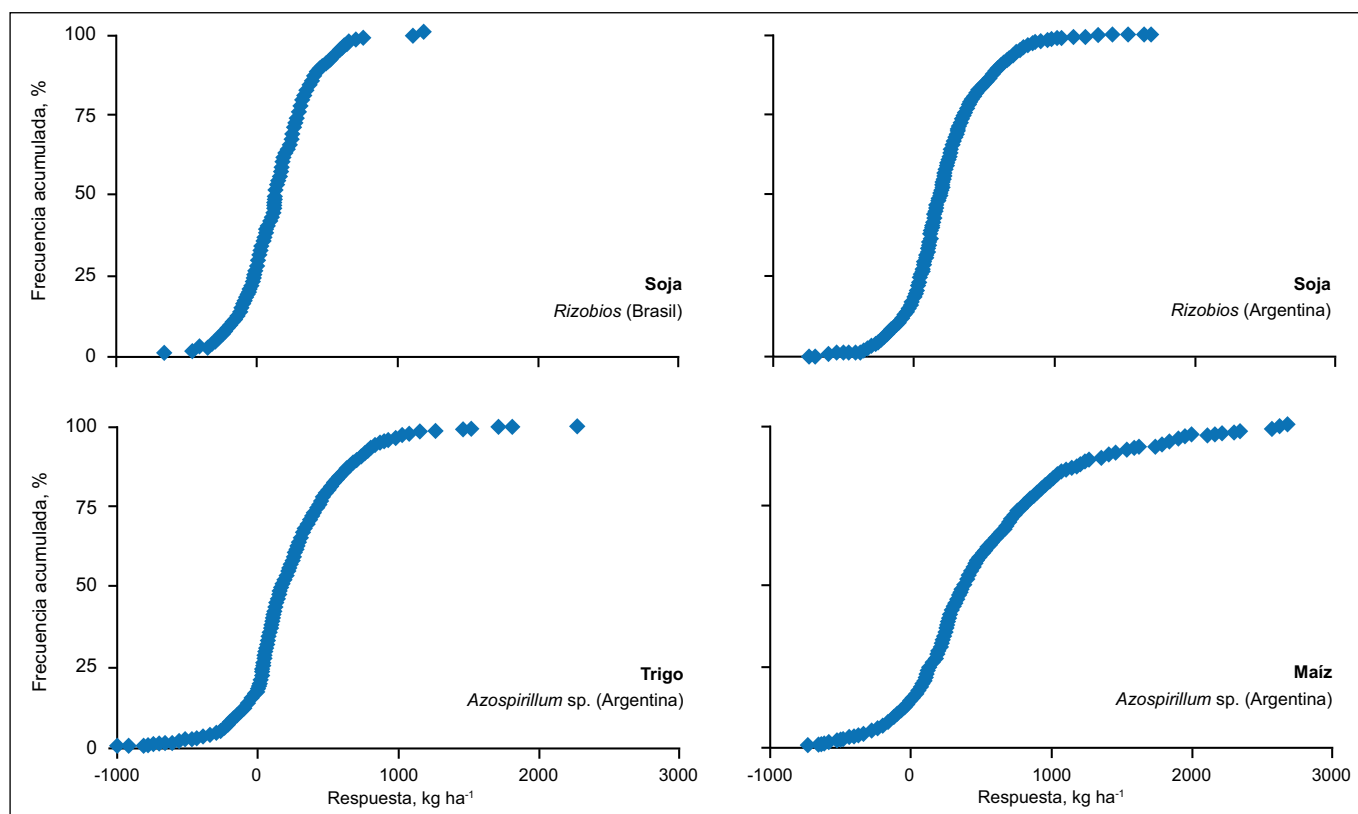
Los resultados pueden ser descriptos por funciones de distribución a partir de los datos empíricos de las evaluaciones. Por ejemplo, en la **Figura 3** se presentan las distribuciones de frecuencias acumuladas de respuestas a la inoculación con rizobios en cultivos de soja según dos regiones contrastantes (Argentina y Brasil) y con *Azospirillum brasilense* en cultivos diferentes (trigo y maíz). Estas evaluaciones se desarrollaron en condiciones normales de producción agrícola en diversas regiones y múltiples campañas. En promedio, sobre 163 casos en Brasil se observó una respuesta media de 146 kg ha<sup>-1</sup> a la inoculación de soja con rizobios y 95% de sitios con respuesta positiva, mientras que en Argentina el mismo tratamiento, evaluado en 839 casos, mostró respuestas medias de 216 kg ha<sup>-1</sup> con resultados positivos en el 79% de los sitios. En el caso de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en cereales, sobre 432 sitios cultivados con

trigo la respuesta media fue de 243 kg ha<sup>-1</sup>, mientras que en maíz y al evaluar 225 sitios la mejora media de rendimientos fue de 524 kg ha<sup>-1</sup>. Los casos positivos de respuesta fueron 81% en trigo y 86% en maíz.

Esta aproximación difiere de los análisis tradicionales y, en término de decisiones de aplicación de tecnologías de manejo productivas, es una medida más real de evaluación del comportamiento de los cultivos a la utilización de productos biológicos. Los resultados determinísticos, normalmente expresados por el valor medio de la respuesta a la aplicación del tratamiento biológico, son reemplazados por la distribución de valores y una respuesta probabilística.

### Consideraciones finales

En el laboratorio se han comprobado numerosos efectos benéficos para las plantas superiores de la presencia de diversos microorganismos. Sin embargo, sólo alguno de estos efectos benéficos se han corroborado en condiciones de invernáculo. En condiciones de campo, las comprobaciones efectivas han sido aún más escasas. Comprender las variaciones de las respuestas en las distintas condiciones es clave para poder evaluar la potencialidad de su incorporación a las prácticas del cultivo. Las razones pueden responder a distintos orígenes. Por ejemplo, una bacteria de comprobado efecto biocontrolador en el laboratorio puede, a su vez, ser biocontrolada por otro microorganismo en el suelo. Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios causantes de los potenciales efectos positivos en el



**Figura 3. Distribución de frecuencias acumuladas de respuestas en producción de granos a la inoculación de soja con *Rizobios* en Argentina y en Brasil y de trigo y maíz con *Azospirillum brasilense* en Argentina (Fuente: Monsanto BioAg Agronomía, datos propios).**

---

crecimiento de las plantas, es regulada por condiciones que pueden variar entre el laboratorio y el campo.

El efecto de los MPCP debe ser necesariamente analizado en el contexto de la menor magnitud de las eventuales respuestas. En estos casos, es aún más significativo seguir estrictamente los tres principios básicos del diseño experimental. Se debe prestar especial atención para ajustar las condiciones del ensayo de modo tal de reducir el error experimental. Asimismo, además de la variable rendimiento, es recomendable utilizar variables de respuesta alternativas que puedan expresar mayor sensibilidad.

Por último, hay que considerar que los protocolos de diseño y análisis de experimentos utilizados en el ámbito de la investigación científica no necesariamente son seguidos por otros interesados en el tema, como los adoptantes de la práctica. Por ejemplo, la incorporación de una práctica de manejo puede ser resultado de otros procedimientos de análisis, tales como usar un nivel de confianza de 10% en lugar de 5% en los análisis estadísticos. O también, a partir de análisis de distribuciones de valores y respuestas probabilísticas considerando abundantes datos provenientes de evaluaciones de respuestas desarrolladas en condiciones representativas de producción.

## Bibliografía

- Berger A., y B. Pena. 2013. Decisiones riesgosas en empresas agropecuarias. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 100 pp.
- Clewer A., y D. Scarisbrick. 2001. Practical Statistics and Experimental Design for Plant and Crop Science. John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra.
- Díaz-Zorita M. y M.V. Fernández Canigia. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. Eur. J. Soil Biol 45:3-11.
- Díaz-Zorita, M., M.V. Fernández Canigia, O.A. Bravo, A. Berger y E.H. Satorre. 2015. Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. En Cassan, FD, Y Okon y CM Creus. Handbook for *Azospirillum*. Springer International Publishing Switzerland 435-445.
- Dutta, S., y A. R. Podile. 2009. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Critical Reviews in Microbiology 36, 232-244.
- Lugtenberg B. y F. Kamilova. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63:541-556.
- Rodrigues E., L. Rodrigues, A. Martínez de Oliveira, V. Baldani, K. dos Santos Teixeira, S. Urquiaga y V. Reis. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil 302:249-261.
- Van Dommelen, A., A. Croonenborghs, S. Spaepen, y J. Vanderleyden. 2009. Wheat growth promotion through inoculation with an ammonium-excreting mutant of *Azospirillum brasilense*. Biol. Fertil. Soils 45:549-553.
-