

COMPARACIÓN DE LA INOCULACIÓN  
DE DIFERENTES CEPAS DE  
*AZOSPIRILLUM SP* SOBRE ALTURA DE  
PLANTA, BIOMASA Y CONTENIDO  
DE NITRÓGENO EN GENOTIPOS DE  
MAÍZ FORRAJERO

MARCO AURELIO PUENTE FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias  
Especialidad en Fitomejoramiento



Universidad Autónoma  
Agraria  
Antonio Narro  
PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

Diciembre de 2006

U. A. A. N.  
Subdirección de Postgrado  
Comparación de la inoculación de diferentes cepas de *azospirillum sp* sobre altura de  
planta, biomasa y contenido de nitrógeno en genotipos de maíz forrajero

Por

Marco Aurelio Puente Flores

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como  
requisito parcial, para optar al grado de

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD  
DE FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal: \_\_\_\_\_  
Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera

Asesor: \_\_\_\_\_  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor: \_\_\_\_\_  
M.C. Arnoldo Oyervides García

\_\_\_\_\_  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Subdirector de Asuntos de Postgrado

Buenavista Saltillo Coahuila. Diciembre 2006

El presente trabajo de tesis se realizó en el departamento de Ciencias Básicas, Laboratorio “Los pinos” e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, bajo la dirección del Dr Sergio A. Rodríguez Herrera con una beca proporcionada por CONACYT y el proyecto titulado: “Comparación de la inoculación de diferentes cepas de *azospirillum sp* sobre altura de planta , biomasa y contenido de nitrógeno en genotipos de maíz forrajero” con clave 02-03-0304-2358, aprobado y financiado por la dirección de investigación de la UAAAN, que forma parte de la línea de investigación de la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al CONACYT por darme la oportunidad y el apoyo económico para continuar mi formación en el programa de fitomejoramiento

Agradezco al Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera, a la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal y al MC. Arnoldo Oyervides García por haberme apoyado con sus conocimientos, interés y paciencia a lo largo de este proyecto de investigación.

Agradezco a los maestros del programa de fitomejoramiento por su ayuda, conocimientos y apoyo en cada curso tomado durante el transcurso de la maestría en especial al Dr. Fernando Borrego, Dr. Humberto Reyes.

A Lizbeth Valdez, Miriam Luevanos, Patricia, Leticia, Juan Espinosa, Roberto Dorantes, Álvaro, Jesús Angeles, Luís Hernández, Daniel Zamano, Perches, Parga; por su apoyo, conocimientos y amistad.

A Roberto Carlos, Carlos Seca, Sergio Ivan, Ivan y Orlando Ramos, Edgar Sanchez, Lizbeth Ayala, Elsa Elena, Franciela Balvantín, Ruth Belmares, por su amistad y apoyo.

A mi novia Araceli por su amistad, cariño y apoyo.

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mis padres a quienes agradezco y debo todo el apoyo que me han brindado en cada paso de mi vida y mi formación académica.

## **COMPENDIO**

**Comparación de la inoculación de diferentes cepas de *Azospirillum sp* sobre altura de planta, biomasa, y contenido de nitrógeno en genotipos de maíz forrajero**

**POR**

**MARCO AURELIO PUENTE FLORES**

**MAESTRIA**

**En FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**Buenavista, Saltillo, Coah. Diciembre de 2006**

**DR. SERGIO A. RODRIGUÉZ HERRERA**

Palabras clave: *Azospirillum*, fertilización, forraje, nitrógeno, biomasa, altura .

de planta

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo: Comprobar que la asociación entre las líneas élite de maíz forrajero y la bacteria *Azospirillum sp.* aporta beneficios al cultivo como el incremento en altura de planta, peso de raíz y follaje, así como el contenido de nitrógeno.

Para lograr dicho objetivo se aislaron cepas de *Azospirillum spp* en el laboratorio de apoyo a la investigación de ciencias básicas de la UAAAN a partir de dos localidades Torreón Coahuila y Celaya Guanajuato y Buenavista Coahuila. Se aislaron 40 cepas a partir de raíces de plántulas de maíz en agar nutritivo, medio NFB y rojo congo. Una vez aisladas, se colocaron en agua estéril y se incubaron a 25 °C.

En seguida se llevo a cabo el experimento en condiciones de invernadero, para lo cual se utilizó suelo de bosque, el cual se esterilizó y se llenaron botes de leche con él, para sembrar las semillas inoculadas con la bacteria.

Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, una seleccionada en bajo contenido de nitrógeno CM384 y otra seleccionada con la fertilización normal de nitrógeno normal CM321. En seguida se asperjaron las semillas con el inóculo y se dejaron reposar para que la semilla absorbiera la mayor cantidad de inóculo posible. Una vez realizada la inoculación se sembraron 4 semillas (inoculadas con una misma cepa) en cada bote.

Con 3 repeticiones por cepa y 2 líneas de maíz forrajero produciendo un total de 240 botes en total. Cada semana, durante un mes, se tomaron lecturas de altura de planta, posteriormente se retiraron del invernadero y se llevaron al laboratorio donde se separaron en raíz y tallo, y se pesaron en fresco. Dichos pesos se registraron por separado como peso fresco de raíz y de follaje.

Después las plantas se colocaron en un asoleadero durante 2 semanas para eliminar la humedad. En seguida se volvieron a pesar las muestras y se registraron los

datos como peso seco de raíz y follaje y finalmente se obtuvo la biomasa en cada tratamiento.

Los análisis se realizaron con ayuda del programa estadístico SAS, por medio del cual se encontraron diferencias altamente significativas para el efecto de líneas en las variables de peso fresco y seco tanto de follaje como de raíz, mediante un análisis de comparación de medias de tukey, El genotipo de la línea empleada es un factor que contribuye a aumentar el peso fresco y seco. La línea 1 (CML-321) fue la que presentó los mayores pesos.

Además, se encontraron diferencias altamente significativas para el efecto de la cepa y la interacción línea-cepa para el porcentaje de nitrógeno. Mediante el análisis de comparación de medias se concluyó que el tipo de cepa empleada es un factor que contribuye a aumentar el contenido de nitrógeno y que las cepas 21 y 4 procedentes de Celaya Gto., y Torreón Coahuila respectivamente, fueron las mejores en cuanto a aumentar al contenido de nitrógeno se refiere.

También se encontraron diferencias altamente significativas en el efecto de la línea, cepa, su interacción, el efecto de la fecha y su interacción con el efecto de la línea, mediante el análisis de medias se encontró que la línea que presentó un mayor incremento en la altura de planta fue la línea 1 (CML-321) y que la mejor cepa fue la cepa 1, procedente de Torreón Coah. en cuanto al incremento en la altura de planta se refiere.

**ABSTRACT**

**Comparison of the effect of inoculation of different strains of *Azospirillum sp* in height of plant, biomass and nitrogen content of forage maize**

**BY**

**MARCO AURELIO PUENTE FLORES**

**MASTER**

**In FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**Buenavista, Saltillo, Coah. Diciembre de 2006**

**DR. SERGIO A. RODRÍGUEZ HERRERA**

Key words: *Azospirillum*, fertilization, forage, nitrogen, biomass, plant height

The objective of this investigation was to corroborate that the association between the elite lines of forage maize and the bacterium *Azospirillum sp* gives benefits to the crop, such as the increase in the plant height, root and foliage weight as well as in the nitrogen content.

To accomplish this objective strains of *Azospirillum sp* from Torreón, Coahuila, Celaya, Guanajuato y Buenavista, Coahuila were isolated in the laboratory of support to the investigation of basic sciences of the UAAAN. 40 strains were isolated from roots of maize seedlings in nutritive agar, NFB medium and Congo Red medium. Once isolated, they were placed in sterile water and incubated at 25 °C.

After, the experiment was done in greenhouse conditions using soil from the forest, which was sterilized and milk cans were filled with it to sow the seeds inoculated with the bacterium.

It was used seed of 2 elite lines of forage maize, one chosen in low nitrogen content (CML-384) and the other chosen with the normal fertilization of normal nitrogen (CML-321). Then the seeds were sprayed with the inoculum and let rest for the seed to absorb the most quantity of inoculum.

With 3 repetitions per strains and 2 lines of forage maize producing 240 milk cartons, each week for a month, lectures of plant height were taken, then, were taken out of the green house and taken to the laboratory, where they were separated in root and stem and weighted in fresh. These weights were registered separately as fresh weight of root and foliage.

Then, the plants were placed out for 2 weeks to eliminate the moisture. Immediately they were weighted again and the data were registered as dry weight of root and foliage and finally, the biomass was obtained in each treatment.

The analysis were realized with aid of the statistical program SAS, and highly significative differences were found for the effect of lines in the variables of fresh and dry weight in foliage and root, by an analysis of Tukey comparison of medias. The genotype of the employed line is a factor that contributes to increase the fresh and dry weight. The line 1 (CML -321) was the one that presented the higher weights.

In addition, highly significative differences for the effect of the strain and the interaction between line-strain for the nitrogen percentage were found. By means of the analysis of media comparison it was concluded that the type of strain used is a factor that contributes to increase the nitrogen content and that the strains 21 and 4 coming from Celaya, Gto. And Torreón, Coahuila, respectively, were the best for increase the nitrogen content.

Also, highly significative differences in the effect of line, strain, their interaction, the effect of date and its interaction with the effect of line. By means of the media analysis it was found that the line that presented a bigger increase in the plant height was the line 1 (CML- 321) and that the best strain was the strain 1, from Torreón, Coahuila for increase in plant height.

## INDICE DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>INDICE DE CUADROS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>I.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>3</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>3</b>
<b>II.-REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>

2.1.-La demanda y calidad del maíz forrajero.....	4
2.2.-Biofertilizantes.....	6
2.3.-El género <i>Azospirillum</i> .....	6
2.3.1-Aislamiento.....	7
2.3.2-Identificación.....	7
2.3.3-Distribución.....	8
2.3.4-Ambiente rizosférico.....	9
2.3.5-Interacción con la planta.....	11
2.4-Experimentos de inoculación.....	12
<b>III.-MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Genotipos de maíz forrajero utilizados.....	14
3.2.-Obtención de cepas de <i>Azospirillum</i> spp.....	14
3.2.1.-Recolección de raíces de maíz.....	14
3.2.2.-Preparación de medio NFb.....	15
3.2.3.-Preparación del medio rojo congo al 0.1%.....	16
3.2.4.-Prueba de movilidad para caracterizar el género.....	16
3.3.- Cepas de <i>Azospirillum</i> sp aisladas.....	17
3.4.- Evaluación de cepas.....	17
3.4.1. Evaluación de altura de planta y biomasa.....	18
3.4.1.-Método de microKjeldahl.....	18
3.5.- Diseño experimental.....	20
3.6.-Análisis estadístico.....	22
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>23</b>
4.1.- Análisis del contenido de nitrógeno, pesos frescos y secos.....	23

4.2.- Análisis de la altura de planta.....	28
<b>V.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>VI.-RESUMEN.....</b>	<b>35</b>
<b>VII.- LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>
<b>VIII.-APENDICE.....</b>	<b>41</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
3.1 Composición del medio NFb.....	15
3.2 Cepas de <i>Azospirillum</i> aisladas y su localidad.....	17
4.1 Cuadro de ANVA para las variables de porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco tanto de follaje como de raíz.....	23
4.2 Comparación de medias de Tukey para peso fresco y seco de follaje y raíz en línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a	

	semilla con 40 cepas de <i>Azospirillum</i> sp ( $P \geq 0.01$ ).....	24
4.3	Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de nitrógeno ( $P \geq 0.05$ ).....	26
4.4	Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de nitrógeno en línea CML- 321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26), (27-30) comercial y Buenavista, Coahuila (31-40). ( $P \geq 0.01$ ).....	27
4.5	ANVA para la altura de planta para las 4 fechas de muestreo .....	28
4.6	Comparación de medias de Tukey para la altura de planta en la línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de <i>Azospirillum</i> sp ( $P \geq 0.01$ )Cuadro .....	28
4.7	Cuadro 4.7- Prueba de rango múltiple de Tukey para el efecto de la cepa en la altura de planta.....	31
4.8	Comparación de medias de Tukey para altura de planta en línea CML- 321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26) y Buenavista, Coahuila (27-40). ( $P \geq 0.05$ ).....	32
4.9	Comparación de medias de Tukey para altura de planta en las fechas de muestreo ( $P \geq 0.01$ ).....	33
4.10	Comparación de medias de Tukey para altura de planta en las fechas de muestreo en cada línea ( $P \geq 0.01$ ).....	33

## INTRODUCCIÓN

El norte de México es netamente ganadero y en particular Coahuila posee la cuenca lechera más importante del país, tan solo la Comarca Lagunera cuenta con 193 mil cabezas de bovinos lecheros, con una producción de 1.49 millones de litros de leche diarios. El estado de Coahuila cuenta con 214 130 cabezas de bovinos lecheros. Otra zona ganadera importante del país se encuentra en la región del Bajío, como un ejemplo, el estado de Guanajuato cuenta con 148 599 cabezas de bovinos lecheros (SAGARPA 2000). Para la producción del forraje necesario se siembran un total de de 70 mil hectáreas de las cuales 35 mil se siembran con alfalfa, 15 mil con maíz y el resto con sorgo, zacate ballico, triticale, avena, cebada. (SAGARPA 2000). De la superficie anterior del 75 a 84% se riega con agua del subsuelo. La magnitud de este sistema de producción aunado a las tendencias en los incrementos de inventario (13.5%) plantea la necesidad urgente de contar con estrategias más eficientes para la producción de forrajes y granos. Así mismo en el norte se encuentran importantes ranchos ganaderos productores de carne o pie de cría, que demandan forraje todo el año para el mantenimiento y producción de los animales.

El maíz ensilado es uno de los componentes importantes en la dieta de los animales lecheros ya que constituye un tercio de la ración diaria, y si este

cumple con los contenidos de calidad nutritiva se requiere de menos suplementos, por lo que el productor puede ahorrar en el costo de la dieta.

El maíz forrajero de calidad se selecciona en base a su capacidad de materia seca y poco interés en la calidad nutritiva (Núñez *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos híbridos actualmente utilizados presentan rendimiento de grano y proporción de materia seca altos. Entre los insumos que requiere el cultivo se encuentran los fertilizantes con su respectivo costo, además para obtener un maíz forrajero de alta calidad es necesario utilizar dosis altas de fertilizantes químicos, que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo y los mantos freáticos. Dicha contaminación puede afectar a cultivos posteriores y al consumidor.

Sin embargo en la actualidad existen bacterias que fijan nitrógeno asociadas con el maíz que pueden contribuir a abaratar el cultivo, además de ser una alternativa a la contaminación del suelo y subsuelo por parte de los fertilizantes químicos. En este proyecto se plantea el empleo de microorganismos como biofertilizantes aplicados a líneas élite de maíz forrajero como una opción para la fertilización del cultivo lo cual

podría disminuir el uso de fertilizante químico y de esta forma disminuir los costos de producción.

**Objetivo:**

Incrementar el peso de raíz y follaje, el contenido de nitrógeno y la altura de planta, al inocular con *Azospirillum* sp la semilla de dos variedades de maíz forrajero.

**Hipótesis:**

La asociación entre las líneas élite de maíz forrajero y la bacteria *Azospirillum* sp. provoca el incremento en altura de planta, peso de raíz y follaje, así como el contenido de nitrógeno.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1.-La Demanda y Calidad del Maíz Forrajero**

El norte de México es netamente ganadero y en particular Coahuila posee la cuenca lechera más importante del país, tan solo la Comarca Lagunera cuenta con 193 mil cabezas de bovinos lecheros, con una producción de 1.49 millones de litros de leche diarios. El estado de Coahuila cuenta con 214 130 cabezas de bovinos lecheros. Otra zona ganadera importante del país se encuentra en la región del Bajío, como un ejemplo, el estado de Guanajuato cuenta con 148 599 cabezas de bovinos lecheros (SAGARPA, 2000). Para la producción del forraje se siembran un total de de 70 mil hectáreas de las cuales 35 mil son de alfalfa, 15 mil de maíz y el resto de sorgo, zacate ballico, triticale, avena, cebada. (SAGARPA, 2000). De la superficie anterior del 75 a 84% se riega con agua del subsuelo. La magnitud de este sistema de producción aunado a las tendencias en los incrementos de inventario (13.5%) plantea la necesidad urgente de contar con

estrategias más eficientes para la producción de forrajes y granos. Así mismo en el norte se encuentran importantes ranchos ganaderos productores de carne o pie de cría, que demandan forraje todo el año para el mantenimiento y producción de los animales.

El maíz ensilado es uno de los componentes importantes en la dieta de los animales lecheros ya que constituye un tercio de la ración diaria, y si este cumple con los contenidos de calidad nutritiva se requiere de menos suplementos, por lo que el productor puede ahorrar en el costo de la dieta.

El maíz forrajero entre el 8 y el 11 por ciento del peso del grano de proteína, la cual se forma a partir de concentraciones altas de nitrógeno, para ello requiere dosis altas de fertilizante químico. La falta de nitrógeno durante el periodo de la formación de mazorcas se refleja en la decoloración de las hojas inferiores de la planta (color amarillento) ya que la planta todo el nitrógeno disponible hacia la mazorca. Una concentración adecuada de nitrógeno hace los tejidos más tiernos, succulentos y más digestivos, además de aumentar el valor nutritivo de la planta. (Urbano, 1999).

El maíz forrajero de calidad se seleccionaba en base a su capacidad de materia seca y poco interés en la calidad nutritiva (Núñez *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000). Sin embargo, algunos híbridos actualmente utilizados presentan rendimiento de grano y proporción de materia seca altos. Entre los insumos que requiere el cultivo se encuentran

los fertilizantes con su respectivo costo, además para obtener un maíz forrajero de alta calidad es necesario utilizar dosis altas de fertilizantes químicos, que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo y los mantos freáticos. Dicha contaminación puede afectar a cultivos posteriores y al consumidor.

El aumento de la población de ganado bovino, especialmente el lechero, y por lo tanto el incremento de la demanda de forraje de calidad nutritiva y digestiva, conlleva a la necesidad de la búsqueda de paquetes tecnológicos que sean capaces de cubrir dicha demanda.

## **2.2.-Biofertilizantes**

El uso de microorganismos usados como fertilizantes orgánicos, empleados en los cultivos ha sido una alternativa para sustituir la fertilización química. Éstos aportan los nutrientes en forma asimilable para las plantas, las cuáles proporcionan la fuente de carbono para los microorganismos llevando a cabo una asociación entre ambos organismos. (Brook, 2002). Aprovechando dicha asociación, se han realizado experimentos inoculando microorganismos fijadores de nitrógeno en diferentes cultivos. cómo *Rhizobium-Bradyrhizobium* en soja (*Glycine max* L) con el objetivo de analizar el comportamiento de cepas naturalizadas en distintos suelos del noreste de la provincia de Santa Fe con diferentes antecedentes y antigüedades en el manejo de la soja, encontrando como resultado una buena presencia de *Rhizobium-Bradyrhizobium* en nueve de las diez muestras analizadas, (Paytas e Iglesias, 2001).

### **2.3.-El Género *Azospirillum***

Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum*. Tienen la capacidad para estimular el crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de los cereales debido a esto se promovieron numerosos estudios sobre ecología, fisiología y genética de la bacteria. En la actualidad su uso comercial comienza a extenderse en diferentes países incluyendo a México. (Esqueda *et al.*, 2004).

Una de las especies, *Azospirillum brasilense*, además de fijar nitrógeno atmosférico, produce sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, (Michiels *et al.*, 1989); estimula la tasa de aparición de pelos radiculares, aumenta la superficie específica de las raíces, provocando mayor absorción de agua y minerales, y con ello, la tasa de respiración y actividades enzimáticas específicas. (Okon y Labandera, 1994). En trigo *Azospirillum brasilense*, estimula el desarrollo de la planta al aportar nitrógeno, aún en suelos pobres, y por producir ácido indol-acético, el cual es un promotor de crecimiento en las plantas, además de que no es peligroso para el medio ambiente o la salud. (Zaady, 1994).

#### **2.3.1-Aislamiento**

Para llevar a cabo el aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum*, se utiliza suelo rizosférico o de la superficie de las raíces, o tallos de algunas plantas. El

medio de cultivo usado por excelencia para el enriquecimiento de las especies de *Azospirillum* ha sido el NFb semigelificado “libre” de nitrógeno y con malato como fuente de carbono. (Döbereiner *et al*, 1976). El cultivo puro se logra en diferentes medios de laboratorio, al que se le añade colorante rojo congo. (Rodríguez, 1982). En este medio de cultivo *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, toman un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos.

### **2.3.2-Identificación**

Existen diversas pruebas para el reconocimiento de las especies de *Azospirillum* entre ellas las bioquímicas y las inmunológicas. Algunas características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral. (Döbereiner, J., 1992).

Las células contienen gran cantidad de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50 % del peso celular (Okon *et al*, 1976a), observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes granulos refringentes. (Okon *et al*, 1976b). En cultivos semigelificados y gelificados con más de 24 h de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. (Lamm y Neyra, 1981). Una de las características fenotípicas más ampliamente utilizada como criterio

para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo congo. (Rodríguez, 1982). Sin embargo, en este medio pueden encontrarse colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados. (Bastarrachea, 1987)

### **2.3.3-Distribución**

Los *Azospirillum* muestran una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Aún cuando son más abundantes en las regiones tropicales, también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas. (De Coninck *et al*, 1988). En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia, la presencia de *Azospirillum* es menor al 10 %. (Döbereiner *et al*, 1976). El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*. Las especies *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aún cuando a pH menor a 5 se les encuentra en forma esporádica y no se logra su aislamiento de suelos con un pH menor a 4.5. (Döbereiner, 1978).

Las bacterias del genero *Azospirillum* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizosfera, incluyendo cereales como maíz, trigo, sorgo, arroz, avena, (Khammas *et al*, 1989). pastos forrajeros, algunas especies de henequén y plantas cactáceas. (López *et al*, 1989).

#### **2.3.4-Ambiente Rizosférico.**

La adaptación de *Azospirillum* al futuro ambiente rizosférico probablemente se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. Aún cuando las especies de *Azospirillum* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico, succínico y algunos aminoácidos. (Hartmann *et al*, 1988).

Tanto *Azospirillum brasilense* como *Azospirillum lipoferum* tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Además una respuesta hacia el oxígeno (aerotaxia) fue observada en *Azospirillum brasilense*. (Barak *et al*, 1982). Zonas de baja concentración de oxígeno fueron preferidas por las células bacterianas para su crecimiento y multiplicación, siendo repelidas por altas concentraciones de oxígeno y condiciones anaeróbicas. (Reiner y Okon, 1986). La colonización de la rizósfera y la

superficie o interior de las raíces será el resultado del enriquecimiento selectivo de los microorganismos mejor adaptados a estos ambientes. Por ejemplo, la capacidad para producir bacteriocinas por algunas cepas de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*. (Oliveira y A. Drozdowicz, 1981). podría ser una ventaja competitiva sobre las cepas de estas especies o íntimamente relacionadas que sean sensibles a estas biomoléculas.

Es posible que en el ambiente rizosférico las especies de *Azospirillum* puedan ser antagonizadas. Alrededor de 400 actinomicetos aislados de la rizosfera del centeno fueron reportadas como antagonistas de *Azospirillum spp.* y *Azospirillum lipoferum*. (Kulinska y Kroczyńska, 1990). Esta actividad antagonista correlaciona con alta sensibilidad de *Azospirillum brasilense* a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y cloranfenicol producidos por actinomicetos del suelo en comparación a la elevada resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos producidos por hongos. (López, 1989).

Diversas condiciones tales como el envejecimiento celular y la presencia de metales pesados provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien su morfología y tomen la forma de “quistes” (conocidos como formas C), conduciendo a la agregación celular y formando grumos visibles de gran tamaño. (Bashan, y Holguin, 1997). La agregación y la formación de quistes mejora la sobrevivencia de *Azospirillum*,

situación en la que la acumulación de poli-  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía. (Okon *et al*, 1976). Además, diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PHB, destacándose la mayor resistencia a la desecación Lamm y (Neyra, 1981), a la luz ultravioleta y al choque osmótico. (Tal y Okon, 1985). Se ha sugerido que la formación de quistes pudiera desempeñar una función importante en la sobrevivencia de *Azospirillum* en el ambiente rizosférico, por ejemplo, cuando los nutrientes son limitados, previo a la asociación con las raíces de la planta. (Okon e Itzigsohn, 1992).

### **2.3.5-Interacción con la Planta.**

Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense*, tiene la capacidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo (*Pennisetum purpureum*) y *Digitaria decumbens*, (Umali-García *et al*, 1980). trigo, (Jain y Patriquin, 1984). maíz (*Zea mayz*), (Barbieri *et al*, 1986), así como a las raíces de plantas de otras familias que

incluyen al algodón y tomate (*Lycopersicon Sculentum*), (Levanony y Bashan, 1991), e incluso a superficies inertes como poliestireno y arena. (Bashan *et al*, 1991).

La asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes, (Michiels *et al*, 1991). la primera consiste en una adsorción rápida débil y reversible, la cual es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas en conjunto con la participación del flagelo polar. (Croes *et al*, 1993). La segunda fase consiste en un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, el cual parece ser independiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*. (Michiels *et al*, 1991).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha demostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales. (Levanony y Bashan, 1991). La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa el gen reportero *gusA* mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz. (Vande *et al*, 1993).

Es de interés señalar que los sitios de colonización *Azospirillum lipoferum* son diferentes, dependiendo de la variedad de la planta, al menos en el caso del arroz. (Murthy *et al.*, 1987). La capacidad de *Azospirillum* para colonizar las raíces de las plantas es variable dependiendo de la cepa. (Caballero, 2003).

#### **2.4-Experimentos de Inoculación**

Cracogna *et al.*, 2003, emplearon formulaciones comerciales de los microorganismos *Azospirillum* sp y *Pseudomonas ferruginosa* por separado y en conjunto para determinar la influencia de dichos tratamientos sobre el crecimiento y la productividad del trigo (*Genus triticum*), encontrando que en general, tanto las inoculaciones simples como la co-inoculación marcaron resultados favorables en distintos parámetros como el amacollamiento, la altura de la planta, largo de raíces, peso seco y número de granos.

Esqueda *et al.* (2004). inocularon *Azospirillum brasilense* y *Glomus fasciculatum* en distintas especies de pastos. La inoculación se llevo a cabo en forma individual y combinada con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la emergencia y sobrevivencia de las gramíneas. El mayor efecto se encontró con el *Azospirillum brasilense* ya que incrementó los porcentajes de emergencia hasta en un 50%. Las especies que tuvieron una mayor respuesta fueron banderilla, llorón y

garrapata, los autores concluyeron que los biofertilizantes favorecen la emergencia y la sobrevivencia de las diferentes gramíneas en estas condiciones.

Baldani *et al* (1980) comprobaron la especificidad del *Azospirillum* spp, llevando acabo inoculaciones a cultivos de maíz, trigo y arroz, observando que *Azospirillum lipoferum* es específico para el cultivo de maíz y *Azospirillum brasilense* para trigo.

Mendoza (1986) estudió el efecto de *Azospirillum* spp sobre el rendimiento y calidad de grano de maíz (Lucio Blanco, AN-361) y comparó esto efectos con los obtenidos por medio de fertilización química bajo condiciones de invernadero y campo. En este trabajo se asilaron cepas nativas del género *Azospirillum* en el suelo estudiado de las cuales se utilizaron cinco especies de éste género, fertilización química y el testigo. Se observó que los mejores efectos en la fenología del cultivo (emergencia, floración, altura de planta y madurez fisiológica) fueron aquellos en los que se trató el cultivo con *Azospirillum* sp y *Azospirillum brasilense*.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **3.1 Genotipos de maíz forrajero utilizados**

Se utilizó semilla de maíz forrajero incrementada en Tepalcingo Morelos durante el ciclo 2003-2004, de dos líneas élite de maíz, una seleccionada en condiciones de bajo contenido de nitrógeno CML384 y otra seleccionada en condiciones de contenido de nitrógeno normal CML321; con la finalidad de comprobar si la inoculación de *Azospirillum sp* aumenta el contenido de nitrógeno en las líneas.

### **3.2.-Obtención de cepas de *Azospirillum sp***

#### **3.2.1.-Recolección de Raíces de Maíz.**

Se obtuvieron raíces de maíz provenientes de Celaya Guanajuato, Torreón Coahuila y Buenavista Saltillo Coahuila; para aislar a la bacteria *Azospirillum sp*. Para lograr el aislamiento las raíces de maíz fueron lavadas con agua corriente para eliminar la tierra, se desecharon el tallo y las raíces primarias. Las raíces secundarias se colocaron en cajas estériles donde fueron lavadas con etanol al 95% por un minuto y tres veces con agua estéril. Posteriormente se retiró el agua y fueron colocadas en tubos de ensaye de 18 x 150 mm. con 10 ml de solución de NaCl al 0.085 % y se incubaron por 24 horas a 25 ° C.

### 3.2.2.-Preparación de Medio NFb

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron muestras de cada tubo y se sembraron en medio NFb, su composición se indica en el Cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1- Composición del medio NFb**

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.02
FeCl <sub>3</sub>	Trazas
Ácido málico	5.0
Agar	20.0
Azul de bromotimol	0.5 (Alcohol)

Para la preparación del medio se disolvieron las sales en 500 ml de agua destilada, se añadieron 5 gotas de azul de Bromotimol y se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 0.1 N, en seguida se agregó el Agar disuelto previamente en agua destilada aforando a un litro, se agitó y esterilizó. A continuación se vació el medio en cajas petri estériles y se solidificó.

Los tubos que contenían las raíces se agitaron, en seguida se tomó un poco de la solución con el asa bacteriológica y se sembró por estría en las cajas con medio NFb, éstas se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 72 horas.

Después del periodo de incubación, se revisaron las colonias formadas y se seleccionaron aquellas que presentaban pigmentación amarilla, naranja, o crema. Se seleccionó una colonia diferente por caja, las cuales se resembraron en cajas con agar nutritivo y se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 72 horas, con el fin de aislar bacterias del género *Azospirillum*.

Transcurrido el periodo de incubación se llevó acabo el mismo proceso de selección a las colonias formadas en cada caja, y se resembraron en medio de cultivo rojo congo.

### **3.2.3.-Preparación del Medio Rojo Congo al 0.1%.**

Para preparar el medio de rojo congo se pesaron 23 g de agar nutritivo y se disolvieron en 800 ml de agua destilada, enseguida se añadieron 0.023 g de rojo congo. Una vez disueltos los componentes, se esterilizó el medio y se vació en cajas petri. Después de hacer la resiembra del agar nutritivo al rojo congo, las cajas se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se revisaron las colonias y se seleccionaron aquellas que contaban con coloración roja, rosa o crema.

#### **3.2.4.-Prueba de Movilidad para Caracterizar el Género.**

Para confirmar que las bacterias aisladas pertenecían al género *Azospirillum*, se practicó la prueba de movilidad a cada colonia seleccionada a partir de las cajas con rojo congo. Para dicha prueba se preparó agar al 1%, se vació en tubos de 13 x 100 mm y se esterilizaron. Cada cepa a probar se inoculó por picadura y se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 48 horas. Después del periodo de incubación se revisaron los tubos buscando la presencia de turbidez o desarrollo de la bacteria alrededor de la picadura, lo cual es indicativo de un resultado positivo para la movilidad de la bacteria.

Una vez realizados los ensayos microbiológicos, y las pruebas de movilidad, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron las características propias del género *Azospirillum*. Dichas cepas se utilizaron en el experimento llevado a cabo bajo condiciones de invernadero.

### **3.3- Cepas de *Azospirillum* spp Aisladas**

En la Cuadro 3.2 se muestran las cepas de *Azospirillum* aisladas y su localidad, se puede observar que de la 1 a la 17 corresponden a cepas de suelo de Torreón Coahuila, las cepas 18-26 corresponden a cepas de Celaya Guanajuato, las cepas 27-30

corresponden a un producto comercial utilizado como comparativo, y finalmente, las cepas 31 a 40 corresponden a la localidad de Buenavista, Saltillo Coahuila.

**Cuadro 3.2- Cepas de *Azospirillum* Aisladas y su Localidad**

<b>Localidad</b>	<b>Clave de las Cepas</b>
<b>Torreón</b>	<b>1-17</b>
<b>Celaya</b>	<b>18-26</b>
<b>Comercial</b>	<b>27-30</b>
<b>Buenavista</b>	<b>31-40</b>

### **3.4.- Evaluación de cepas**

En el laboratorio de apoyo a la investigación de Ciencias Básicas de la UAAAN se aislaron 40 cepas a partir de raíces de plántulas de maíz en agar nutritivo, medio NFB y rojo congo. Una vez aisladas, se colocaron en un sustrato con agua estéril y se incubaron a 25 °C.

Para realizar el experimento en invernadero se utilizó suelo de bosque, el cuál se esterilizó y se llenaron botes de leche para sembrar las semillas inoculadas con la bacteria.

Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, una con baja cantidad de nitrógeno CML384 y otra con cantidad de nitrógeno normal CML321; para comprobar si la inoculación de *Azospirillum sp* aumenta el contenido de nitrógeno.

En seguida se asperjaron las semillas con el inóculo y se dejaron reposar para que la semilla absorbiera la mayor cantidad de inóculo. Una vez realizada la inoculación se sembraron 4 semillas (inoculadas con una misma cepa) en cada bote, con 3 repeticiones por cepa total de 240 botes en total.

#### **3.4.1. Evaluación de altura de planta y biomasa.**

Cada semana, durante un mes, se tomaron lecturas de altura de planta (AP), posteriormente se retiraron del invernadero y se llevaron al laboratorio donde se separaron el tallo de la raíz empleando una balanza analítica para realizar el peso en fresco, Dichos pesos se registraron por separado como peso fresco de raíz (PFR); y follaje (PFF).

Después las plantas se colocaron en un asoleadero durante 2 semanas para eliminar la humedad. En seguida se volvieron a pesar las muestras y se registraron los datos como peso seco de raíz y follaje (PSR y PSF); finalmente se obtuvo la biomasa de cada tratamiento.

### **3.4.2. Método de MicroKjeldahl**

Se determinó el porcentaje de nitrógeno por el método de microKjeldahl en cada muestra seca de raíz y follaje.

#### **Preparación de Reactivos**

##### **NaOH al 50 %**

Se pesaron 500 g del reactivo, se agregaron 900 ml de agua destilada, se agitó hasta que se disolvió. Luego se pesaron 0.1 g de fenoftaleína y se agregaron a la solución, se mezcló y aforó a un litro.

##### **H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 2.2 %**

Se pesaron y disolvieron 20.2 g del reactivo en 900 ml de agua caliente, se dejaron enfriar y se aforo a un litro.

##### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025 N**

Se midieron 0.6875 ml del ácido y se agregaron a un matraz que contenía 900 ml de agua destilada, se agitó y aforó a un litro.

##### **Indicador Mixto Verde de Bromocresol y Rojo de Metilo**

Se pesaron 0.05 g de indicador rojo de metilo y 0.1 g de indicador verde de bromocresol, se disolvieron ambos indicadores en alcohol al 95 % y se aforaron a 100 ml con alcohol.

**Digestión.** El primer paso para cuantificar el porcentaje de nitrógeno fue la digestión, para lo cual se pesaron 0.050 g de muestra, y se depositaron en un tubo para digestión al cual se le añadieron 4 ml de mezcla digestora, en seguida se colocó el tubo en una parrilla de calentamiento y se continuó con la digestión hasta que la solución presentó un color cristalino.

**Destilación con Equipo Rapid Still.** Trascurrido el proceso de digestión, se destila la muestra en el equipo de destilación rapid still. La muestra se vació en la copa del equipo de destilación, se enjuagó el tubo con 1 ml de agua destilada y nuevamente se vació en la copa para recuperar la mayor cantidad de muestra posible, se abrió la llave para vaciar la copa y se enjuagó con agua destilada y se cerró la llave. En seguida se agregó NaOH al 50 % hasta la mitad de la copa, se abrió la llave para que se mezclara con la muestra y se recuperaron 80 ml del destilado en un vaso que previamente contenía 40 ml de  $H_3BO_4$  al 2.2 % mezclado con 4 gotas de indicador mixto.

**Titulación.** La muestra destilada se tituló inmediatamente empleando una bureta digital. con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.025 N, se anotó el resultado e hicieron los cálculos respectivos.

$$\% N = \frac{(V_p - V_b) (0.14) (N) (100)}{w}$$

### Dónde

**V<sub>p</sub>** = Volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizados en para el problema en ml

**V<sub>b</sub>** = Volumen de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizados en para el blanco en ml

**0.14** = Miliequivalentes de nitrógeno

**N** = Normalidad de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado en la titulación

**W** = Peso de la muestra en gramos

### 3.5.- Diseño Experimental

La evaluación de las variables de porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco tanto de follaje como de raíz, se llevo acabo mediante un diseño factorial, de 2 factores, líneas y cepas, con 2 y 42 niveles respectivamente. El diseño se describe a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  = Efecto de la media general

$\gamma_k$  = Efecto de los bloques o repeticiones.  $k= 1,2,3$

$\alpha_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima cepa.  $i= 1-40$

$\beta_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima línea.  $j=1, 2$

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima cepa y la  $j$ -ésima línea

$e_{ijk}$  = Efecto del error experimental

La evaluación de la variable de altura de planta se llevó a cabo mediante un diseño factorial, de 3 factores, líneas, cepas y fechas; con 2, 42 y 4 niveles respectivamente. El diseño se describe a continuación:

$$Y_{ijkl} = \mu + \gamma_k + \alpha_i + \beta_j + \theta_l + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\theta)_{il} + (\beta\theta)_{jl} + (\alpha\beta\theta)_{ijl} +$$

$$E_{ijkl}$$

Donde:

$\mu$  = Efecto de la media general

$\gamma_k$  = Efecto de los bloques o repeticiones.  $k= 1,2,3$

$\alpha_i$  = Efecto de la i-ésima cepa.  $i= 1-40$

$\beta_j$  = Efecto de la j-ésima línea.  $j=1, 2$

$\theta_l$  = Efecto de la l-ésima fecha de muestreo.  $l=1-4$

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la i-ésima cepa y la j-ésima línea.

$(\alpha\theta)_{il}$  = Efecto de la interacción entre la i-ésima cepa y la l-ésima fecha de muestreo.

$(\beta\theta)_{jl}$  = Efecto de la interacción entre la j-ésima línea y la l-ésima fecha de muestreo.

$(\alpha\beta\theta)_{ijl}$  = Efecto de la interacción entre la i-ésima cepa, la j-ésima línea y la l-ésima

fecha de muestreo.

$e_{ijk}$  = Efecto del error experimental

### 3.6.-Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Análisis del Contenido de Nitrógeno, Pesos Frescos y Secos

En el Cuadro 4.1 se muestra el ANVA para las variables de porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco tanto de follaje como de raíz, analizadas mediante un diseño factorial, de 2 factores, líneas y cepas, con 2 y 42 niveles respectivamente. Los resultados de cada efecto se describen a continuación.

**Cuadro 4.1-ANVA para las variables de porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco tanto de follaje como de raíz.**

FV	GL	% de N	PFF	PSF	PFR	PSR
		CM	CM	CM	CM	CM
Rep	2	0.24	26.84	2.23	0.11	0.09
Línea	1	0.07	1409.24*	223.81*	8.14*	3.30**

			*	*	*	
Línea x Rep	2	0.63	14.48	1.13	0.45	0.29
Cepa	41	0.49**	37.75	5.47	0.96	0.15
Línea x cepa	41	0.26**	36.20	4.93	1.17	0.24
Error	17	0.14	26.83	3.59	0.81	0.17
	6					

### Efecto de las Líneas

En el cuadro 4.1, se observa que las líneas presentaron diferencias altamente significativas en PFF, PFR, PSF, PSR, excepto en el porcentaje de nitrógeno.

En el cuadro 4.2, se muestran la comparación de medias por la prueba de tukey. Al comparar las medias, la línea con mayor peso fresco y seco fue la línea 1 (CML-321), lo cual sugiere que el genotipo de la línea fue la causa del incremento en el peso fresco y seco de las líneas; lo cual puede deberse a que la línea 2 (CML-384) es una línea seleccionada en condiciones de bajo contenido de nitrógeno mientras que la línea 1 (CML-321) es una línea seleccionada en condiciones de nitrógeno normal.

**Cuadro 4.2- Comparación de medias de Tukey para peso fresco y seco de follaje y raíz en línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de *Azospirillum* sp (P  $\geq$  a 0.01)**

PFF		PSF		PFR		PSR	
Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media
1	16.79a	1	1.65a	1	3.18a	1	0.72a

2	11.79b	2	1.26b	2	2.19b	2	0.47b
---	--------	---	-------	---	-------	---	-------

### **Efecto de la Interacción entre las Líneas.**

En el cuadro 4.1, se puede observar que no se obtuvieron diferencias significativas para la interacción entre las líneas y las repeticiones

### **Efecto de la cepa.**

En el cuadro 4.1, se puede observar que el efecto de la cepa presentó diferencias altamente significativas únicamente para el contenido de nitrógeno.

En el Cuadro 4.3, se muestra la comparación de medias de Tukey para el porcentaje de nitrógeno ( $P \geq 0.05$ ), en cual se puede observar que las mejores cinco cepas fueron la 25 con 3.61%, la 37 con 3.61%, la 4 con 3.54%, la 21 con 3.50% y la 5 con 3.46 %.; cada una de ellas presentó valores estadísticamente iguales que el testigo y las cepas comerciales. La cepa 4 y 5 provienen de Celaya Gto, la 21 y 25 de Torreón Coah. y la 37 de Buenavista Coah.

Estas cepas provienen de ambientes climatológicos distintos, sin embargo poseen características en sus genotipos que hacen posible el aumento de nitrógeno en las líneas.

Al igual que en este experimento, en estudios previos se ha demostrado que *Azospirillum sp* aumenta el contenido de nitrógeno en las plantas inoculadas, al respecto Avivi y Feldman, 1982, encontraron que también incrementa fósforo, potasio y otros minerales.

#### **Efecto de la Interacción entre la Línea y la Cepa**

En el cuadro 4.1 se observa que la interacción entre la línea y la cepa presentó diferencias altamente significativas únicamente para el porcentaje de nitrógeno.

Sin embargo la cepa 4 (procedente de Torreón Coahuila) presentó 3.64% y 3.43% de nitrógeno para la línea 1 y 2 respectivamente, la cepa 21 (procedentes de Celaya Gto) presentó 3.59% y 3.42% de nitrógeno para la línea 1 y 2 respectivamente. Además presentaron valores estadísticamente iguales que las cepas testigo y comerciales de cada línea. Tanto la cepa 4 como la 21, lograron asociarse de manera similar con cada línea, lo cual puede deberse a que son razas fisiológicas que pueden asociarse a líneas con distintos genotipos.

**Cuadro 4.3- Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de nitrógeno ( $P \geq a 0.05$ )**

cepa	% de N	a
25	3.61	a

37	3.61	a
4	3.54	a
21	3.50	a
5	3.46	a
20	3.44	a
6	3.43	a
8	3.42	a
11	3.40	a
40	3.35	a
15	3.31	a
14	3.28	a
13	3.26	a
24	3.26	a
27com	3.25	a
9	3.25	a
3	3.23	a
10	3.18	a
19	3.16	a
12	3.14	a
22	3.12	a
36	3.12	a
7	3.11	a
18	3.10	a
28 com	3.07	a
32	3.03	a
23	3.02	a
2	3.01	a
16	2.98	a
34	2.92	a
38	2.92	a
39	2.91	a
41testigo	2.89	a
30 com	2.84	a
26	2.84	a
1	2.70	a
17	2.64	a
33	2.61	a
29 com	2.56	b
31	2.33	c
35	2.25	c

Prueba de rango múltiple de tukey=1.26

**Cuadro 4.4- Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de nitrógeno en línea CML- 321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26), comercial (com, 27-30) y Buenavista Coahuila (31-40). (P  $\geq$  a 0.01)**

Linea	Cepa	%N	Linea	Cepa	% N
1	25	3.84 a	2	3	3.64 a
1	8	3.68 a	2	5	3.57 a
1	20	3.65 a	2	14	3.57 a
1	4	3.64 a	2	11	3.54 a
1	21	3.59 a	2	15	3.49 a
1	6	3.56 a	2	4	3.43 a
1	24	3.54 a	2	21	3.42 a
1	36	3.42 a	2	com27	3.38 a
1	5	3.36 a	2	25	3.37 a
1	com28	3.33 a	2	9	3.36 a
1	13	3.3 a	2	40	3.35 a
1	19	3.29 a	2	22	3.32 a
1	11	3.26 a	2	23	3.30 a
1	17	3.24 a	2	6	3.30 a
1	37	3.22 a	2	10	3.29 a
1	18	3.19 a	2	2	3.28 a
1	7	3.17 a	2	20	3.23 a
1	9	3.15 a	2	39	3.22 a
1	16	3.15 a	2	13	3.22 a
1	12	3.14 a	2	8	3.16 a
1	15	3.13 a	2	12	3.15 a
1	com27	3.12 a	2	Testigo42	3.15 a
1	32	3.12 a	2	7	3.06 a
1	10	3.06 a	2	34	3.06 a
1	38	3.06 a	2	1	3.05 a
1	com30	3 a	2	19	3.03 a
1	14	2.99 a	2	18	3.02 a

1	22	2.92 a	2	com29	3.01 a
1	1	2.84 a	2	24	2.98 a
1	3	2.82 a	2	32	2.95 a
1	34	2.79 a	2	33	2.93 a
1	26	2.77 a	2	26	2.91 a
1	23	2.74 a	2	com30	2.88 a
1	2	2.74 a	2	com28	2.82 a
1	Testigo 41	2.62 a	2	16	2.82 a
1	39	2.6 a	2	36	2.81 a
1	31	2.52 a	2	38	2.79 a
1	35	2.35 b	2	17	2.17 b
1	33	2.34 b	2	35	2.15 b
1	com29	2.11 c	2	31	2.13 c
			2	37	2.01 d

Prueba de rango múltiple de tukey= 1.40

#### 4.2.- Análisis de la Altura de Planta

En el Cuadro 4.5, se muestra el ANVA para la altura de planta para las cuatro fechas de muestreo, analizadas mediante un diseño factorial de 3 factores: 2 niveles para la línea, 42 niveles para la cepa y 4 para las fechas de muestreo. Los resultados de cada efecto se describen a continuación.

**Cuadro 4.5-ANVA para la altura de planta para las cuatro fechas de muestreo**

FV	GL	CM
Repeticiones	2	15.96
Línea	1	489.04**
Cepa	41	110.1393.82**
Cepa x línea	38	93.82**
Fecha	3	115995.27**
Línea x fecha	3	210.14**
Cepa x fecha	123	38.53
Línea x cepa x fecha	114	30.28
Error	646	36.73

### Efecto de las Líneas

En el cuadro 4.5 se puede observar que las líneas presentaron diferencias altamente significativas entre sus alturas de planta. En el Cuadro 4.6 se puede observar que la línea 1 CML-321 fue la mejor debido a que presentó una altura de 56.76 cm., mientras que la línea 2 presentó una altura de 52.69 cm; esto puede deberse al genotipo de las líneas.

**Cuadro 4.6- Comparación de medias de Tukey para la altura de planta en la línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de *Azospirillum* sp (P  $\geq$  a 0.01)**

Línea	Media
1	56.76 a
2	52.69 b

### Efecto de la Cepa.

En el Cuadro 4.5, se muestra que las cepas presentaron diferencias altamente significativas. En el Cuadro 4.7 se muestra la prueba de rango múltiple de tukey para el efecto de la cepa en la altura de planta. Las plantas inoculadas con la cepa 1 presentaron una altura de 61.87cm, con la cepa 26, 61.80cm, con la cepa 36, 61.54 cm, con la 23 61.47, cm, con la 7, 61.42 ; estas cepas presentaron alturas estadísticamente iguales que

la cepa testigo y las cepas comerciales, los valores altos en la altura pueden deberse a que son razas fisiológicas que favorecen la asociación entre la bacteria y la planta. Además puede deberse a que *Azospirillum sp* tiene la capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas en medios de cultivo, además de que el ácido indol acético producido por las bacterias puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas inoculadas conduciendo a su estimulación y crecimiento, como lo describen estudios anteriores (Bar y Okon. 1992)

#### **Efecto de la Interacción entre la Cepa y la Línea.**

En el Cuadro 4.5, se muestra que el efecto de la interacción entre la línea y la cepa presentó diferencias altamente significativas. En el Cuadro 4.8, se puede observar la comparación de medias de Tukey, en el cual se muestra que la interacción entre la cepa y la línea presentó diferencias altamente significativas. Las cepas 22, 20 y 18 (procedentes de Celaya, Gto) presentan las alturas más altas para la línea 1 CML-384 ,66.71, 66.42, 65.83cm, respectivamente; además presentaron valores estadísticamente iguales al testigo y las cepas comerciales; sin embargo, para la línea 2 CML-384 presentan valores bajos 53.06, 54.88 y 55.02, respectivamente.

Algo similar ocurre con la cepa 17 procedente de Torreón Coahuila, ya que con la línea 1 presenta un valor considerado alto 64.02cm y con la línea 2 presenta un valor bajo 55.14 cm. Esto puede deberse a que éstas cepas son individuos especializados para cada línea.

Por otro lado, la cepa 1, procedente de Torreón Coah., presenta un valor alto 64.1cm, y 63.98cm para la línea 1 y 2 respectivamente, además de presentar valores superiores para los testigos y las cepas comerciales en ambas líneas. Por lo tanto, esta cepa es la mejor debido a que es una raza fisiológica que se asocia a ambas líneas investigadas e incrementa su altura de planta.

### **Efecto de la Fecha**

En el Cuadro 4.5, se muestra el efecto de la fecha, el cual no presentó diferencias altamente significativas.

En el Cuadro 4.9 se muestra la comparación de medias de Tukey para la altura de planta en las fechas de muestreo, en el cual se observa que la fecha 4 de muestreo fue la que presentó la altura mayor, y que las cuatro fechas son estadísticamente distintas lo cual indica que las plantas tuvieron un desarrollo notable a lo largo del experimento.

### Efecto de la Interacción entre la Línea y la Fecha

En el cuadro 4.5 se muestra la interacción entre la línea y la fecha, la cual presentó diferencias altamente significativas.

### Cuadro 4.7- Prueba de rango múltiple de Tukey para el efecto de la cepa en la altura de planta.

Cepa	Prom
1	61.87 a
26	61.80 a
36	61.54 a
23	61.47 a
7	61.42 a
18	61.20 a
17	60.75 a
22	60.12 a
24	59.38 a
39	59.28 a
21	58.89 a
2	58.74 a
20	58.71 a
9	58.40 a
37	58.35 a
19	57.98 a
29	Com56.99 a
3	56.78 a
4	56.43 a
38	56.40 a
35	55.70 a
28	Com55.42 a
31	54.95 a

30	Com	54.94	a
6		54.19	a
34		53.34	a
10		52.98	a
15		52.93	a
33		52.56	a
41	Testigo	52.52	a
32		51.43	a
16		50.71	a
8		50.36	a
11		50.27	a
25		50.25	a
27	com	50.22	a
40		48.12	a
12		46.77	a
13		45.04	a
14		42.64	a
5		40.26	b

### Prueba de Rango Múltiple de Tukey para la Altura de Planta

**Cuadro 4.8-Comparación de medias de Tukey para altura de planta en línea CML-321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26), comercial (com, 27-30) y Buenavista Coahuila (31-40). ( $P \geq 0.05$ )**

línea	cepa	altura	línea	cepa	altura
1	22	66.71 a	2	1	63.98 a
1	20	66.42 a	2	2	63.72 b
1	18	65.83 a	2	3	63.51 c
1	1	64.1 a	2	4	62.77 d
1	17	64.02 a	2	5	61.39 e
1	26	62.21 a	2	6	59.63 f
1	39	61.91 a	2	7	59.5 g
1	21	61.46 a	2	8	59.38 h
1	com28	61.39 a	2	9	59.34 h

1	37	61.06	a	2	10	58.17	h
1	com29	60.92	a	2	11	57.49	h
1	15	60.55	a	2	12	56.67	h
1	35	60.51	a	2	13	56.65	h
1	10	59.8	a	2	14	56.56	h
1	23	59.43	a	2	15	56.32	h
1	36	59.36	a	2	16	55.64	h
1	19	59.3	a	2	17	55.14	h
1	24	59.27	a	2	18	55.02	h
1	com30	59.24	a	2	19	54.95	h
1	7	58.87	a	2	20	54.88	h
1	9	58.63	a	2	21	53.53	h
1	16	58.17	a	2	22	53.06	h
1	2	58.13	a	2	23	53.03	h
1	4	57.83	a	2	24	51.14	h
1	33	56.39	a	2	25	51.01	h
1	Testigo 41	56.17	a	2	26	50.88	h
1	31	54.95	a	2	com27	50.63	h
1	8	54.9	a	2	com28	50.24	h
1	32	54.27	a	2	com29	49.45	h
1	11	53.61	a	2	com30	48.88	h
1	6	53.5	a	2	31	48.74	h
1	38	53.42	a	2	32	48.71	h
1	12	51.62	a	2	33	48.58	h
1	34	51.53	a	2	34	48.12	h
1	3	50.8	a	2	35	46.93	h
1	com27	50.19	a	2	36	46.17	h
1	25	47.47	a	2	37	45.81	h
1	13	41.36	a	2	38	45.31	h
1	5	41.03	a	2	39	43.25	h
1	14	34.14	b	2	40	41.91	h
						Testigo	
				2	42	39.48	h

**Cuadro 4.9- Comparación de medias de Tukey para altura de planta en las fechas de muestreo ( $P \geq a 0.01$ )**

Fecha	Altura de planta
4	55.01a
3	35.83b

2	20.66c
1	3.9d

En el Cuadro 4.10 se muestra la comparación de medias de Tukey para altura de planta en las fechas de muestreo, en el cual se puede observar que para ambas líneas la fecha 4 fue la que presentó una altura de planta mayor, 56.76 cm para la línea 1 y 53.31 para la línea 2, además de que para ambas líneas cada fecha fue estadísticamente distinta, lo cual indica que la línea expreso su genotipo a lo largo del experimento.

**Cuadro 4.10- Comparación de medias de Tukey para altura de planta en las fechas de muestreo en cada línea ( $P \geq a 0.01$ )**

Línea 1 (altura en cm)	Fecha	Línea 2 (altura en cm)	Fecha
56.76a	4	53.31a	4
35.72b	3	35.94b	3
21.4c	2	20.20c	2
4.46d	1	3.35d	1

Prueba de rango múltiple de tukey = 65.28

#### **Efecto de la Interacción entre la Cepa y la Fecha**

En el cuadro 4.5 se muestra que la interacción entre la fecha y la cepa no presentó diferencias altamente significativas.

#### **Efecto de la interacción entre la línea, la cepa y la fecha**

En el cuadro 4.5 se muestra que la interacción de estos tres factores no presentó diferencias altamente significativas.

### CONCLUSIONES

- **El genotipo de la línea empleada es un factor que contribuye al incremento en el peso fresco y seco. La línea 1 (CML-321) fue la que presentó la mayor biomasa**
- **La cepa empleada es un factor que contribuye a aumentar el contenido de nitrógeno y la altura de planta.**
- **Las cepas 21 y 4 procedentes de Celaya Gto., y Torreón Coahuila respectivamente, fueron las mejores en cuanto al contenido de nitrógeno.**

- **La cepa 1, procedente de Torreón Coah fue la mejor para el incremento en la altura de planta.**

## **RESUMEN**

En este trabajo de tesis se asilaron cepas de *Azospirillum spp* en el laboratorio de apoyo a la investigación de ciencias básicas de la UAAAN a partir de dos localidades Torreón Coahuila y Celaya Guanajuato y Buenavista Coahuila. Se aislaron 40 cepas a partir de raíces de plántulas de maíz en agar nutritivo, medio NFB y rojo congo. Una vez aisladas, se colocaron en agua estéril y se incubaron a 25 °C.

Para realizar el experimento en invernadero se utilizó suelo proveniente de las localidades donde se aisló *Azospirillum sp*, el suelo se esterilizó y se llenaron botes de leche para sembrar las semillas inoculadas con la bacteria.

Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, una seleccionada en bajo contenido de nitrógeno CM384 y otra seleccionada con la fertilización normal de nitrógeno normal CM321. En seguida se asperjaron las semillas con el inóculo y se dejaron reposar para que la semilla absorbiera la mayor cantidad de inóculo posible. Una vez realizada la inoculación se sembraron 4 semillas (inoculadas con una misma cepa) en cada bote.

Con 3 repeticiones por cepa y 2 líneas de maíz forrajero produciendo un total de 240 botes en total. Cada semana, durante un mes, se tomaron lecturas de altura de planta, posteriormente se retiraron del invernadero y se llevaron al laboratorio donde se separaron en raíz y tallo, y se pesaron en fresco. Dichos pesos se registraron por separado como peso fresco de raíz y de follaje.

Después las plantas se colocaron en un asoleadero durante 2 semanas para eliminar la humedad. En seguida se volvieron a pesar las muestras y se registraron los datos como peso seco de raíz y follaje y finalmente se obtuvo la biomasa en cada tratamiento.

Los análisis se realizaron con ayuda del programa estadístico SAS, con lo que se concluyó que el tipo de cepa empleada es un factor que contribuye a aumentar el contenido de nitrógeno.

El genotipo de la línea empleada es un factor que contribuye a aumentar el peso fresco y seco. La línea 1 (CML-321) fue la que presentó los mayores pesos.

Las cepas 21 y 4 procedentes de Celaya Gto., y Torreón Coahuila respectivamente, fueron las mejores en cuanto al contenido de nitrógeno.

La cepa 1, procedente de Torreón Coah fue la mejor para el incremento en la altura de planta.

### LITERATURA CITADA

- Avivi, Y., and M. Feldman. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* **31**:237-245.
- Baldani V., Lucía D. y Döbereiner, J. 1980. Host-plant specificity infection of cereals with *Azospirillum spp.* *Soil. Biol. Biochem.* 12: 433-439.
- Bar, T., and Y. Okon. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Can. J. Microbiol.* **39**:81-86.
- Barak, R., I. Nur, Y. Okon, and Y. Henis. 1982. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 152:643-649.
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli, and G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp 6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36:87-90.
- Bashan, Y., H. Levanony, and R. E. Whitmoyer. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.* 137:187-196.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997. *Azospirillum*- plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bastarrachea, F., M. Zamudio, and R. Rivas. 1987. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.* 34:24-29.

- Brook. D. T. (2000). *Biología de los microorganismos*. Ed Mc Graw Hill.. 8ª ed. México
- Caballero M, J. 2003. El género *Azospirillum*. Programa de ecología molecular y microbiana, centro de investigación sobre fijación de nitrógeno, UNAM, México ap. 565-a.
- Cracogna M. F., Iglesias M. C., Díaz I., Gonzáles N. y Carvajal M. L. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2003. Resumen: A-045
- Croes, C. L., S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden, and K. W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum* brasilense adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139:2261-2269.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Randoz, and K. Vlassak. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* 110:213-218.
- Döbereiner, J., I. E. Marriell, and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22:1464-1473.
- Döbereiner, J. 1978. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. *Ecol. Bull. (Stockholm)* 26:343-352.
- Döbereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York. p. 2236-2253
- Esqueda C. M. H., Carrillo R. M. L., Melgoza C. A., Royo M. M. H. y Jiménez C. J. 2004. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Téc. Pecu. Mex.* 42:459-475

- Hartmann, A., H. Fu, and R. H. Burris. 1988. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:87-93.
- <http://www.SAGARPA> (2000)
- Jain, D. K., and D. G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1208-1213.
- Kulinska, D., and B. Kroczyńska. 1990. Occurrence of actinomyces antagonistic to *Azospirillum* spp. (*Azospirillum lipoferum*) in rye monoculture. *Ann. Warsaw Agric. Univ.* 22:55-61.
- Lamm, R. B., and Neyra, C. A. 1981. Characterization and cyst production of *Azospirilla* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol.* 27:1320-1325.
- Levanony, H., and Y. Bashan. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil* 137:91-97.
- López-Reyes, L., L. Soto-Urzúa, M. A. Mascarúa-Esparza, I. Herrera-Camacho, and J. Caballero-Mellado. 1989. Antibiotic resistance and  $\alpha$ -lactamase activity in *Azospirillum*. *Soil Biol. Biochem.* 21:651-655.
- Mendoza V. R. 1986. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) variedad Lucio Blanco (AN-361) a la inoculación de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum sp* en Derramadero Coahuila. Tesis. Maestría. UAAAN. México. 81 p.
- Michiels K, Vanderleyen J, Gol A. V. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: A review. *Biol Fertil Soils.* 8:356-368.

- Michiels, K. W., C. L. Croes, and J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137:2241-2246.
- Murthy, M. G., and J. K. Ladha. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.). Biol. Fertil. Soils 4:3-7.
- Núñez H.G., E. F. Contreras G, R. Faz C y R Herrera. 1999. Selección de híbridos para obtener mayor rendimiento y alto valor energético en maíz para ensilaje. In: Componentes tecnológicos para la producción de ensilados de maíz y sorgo. SAGAR-INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2-5
- O'Hara, G. W., M. R. Davey, and J. A. Lucas. 1987. Effect of nitrogen on the yield response of *Pennisetum americanum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* to inoculation with *Azospirillum brasilense* under temperate conditions. Biol. Fertil. Soils 4:67-72.
- Oliveira, R. G. B., and A. Drozdowicz. 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. Rev. Microbiol. (Sao Paulo) 12:42-47.
- Okon, Y., S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976a. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 127:1248-1254.
- Okon, Y., S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976b. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 128:592-597.
- Okon, Y., and R. Itzigsohn. 1992. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. FEMS. Microbiol. Rev. 103:131-140.
- Okon Y, Labandera C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem. 26: 1591-1601.

- Paytas M. J., Iglesias M. C. 2001. Comportamiento de cepas naturalizadas de *Rhizobium-Bradyrhizobium* en distintos suelos del Noreste de la Provincia de Santa Fe en el cultivo de soja. Cátedra de microbiología agrícola.
- Peña R. A., G. Núñez H y F. González C. 2002. Potencial forrajero de poblaciones de maíz y relación entre atributos agronómicos con la calidad. *Téc. Pecu. Mex.* 40:215-228 p
- Reiner, O., and Y. Okon. 1986. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 32:829-834.
- Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 44:990-991.
- Sadasivan, L., and C. A. Neyra. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* 163:716-723.
- Tal, S. and Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31:608-613.
- Umali-García, M., D. H. Hubbell, M. H. Gaskins, and F. B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:219-226.
- Urbano P, T. 1999 *Tratado de fitotecnia general*. Ed Mundi-prensa. España. 2 ed. 459, 488
- Vande Broek, A., J. Michiels, A. Van Gool, and J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:592-600.

- Zaady E. Okon Y, Perevolotsky A. 1994. Growth response of mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. J. Range Manage 47: 12-15.

## **APENDICE**

### ABREVIATURAS

**ABREVIATURAS**

Abreviatura	Significado
ANVA	Análisis de varianza
PFR	Peso fresco de raíz
PPF	Peso fresco de follaje

PSR  
PSF  
NFb  
AP

Peso seco de raíz  
Peso seco de follaje  
Medio para fijadores de nitrógeno  
Altura de planta