



Agronomía Mesoamericana  
ISSN: 1021-7444  
pccmca@cariari.ucr.ac.cr  
Universidad de Costa Rica  
Costa Rica

Rangel-Lucio, José Antonio; Rodríguez-Mendoza, María de las Nieves; Ferrera-Cerrato, Ronald;  
Castellanos-Ramos, Javier Zaragoza; Ramírez-Gama, Rosa María; Alvarado-Bárcenas, Estefana  
Afinidad y efecto de Azospirillum sp. en maíz

Agronomía Mesoamericana, vol. 22, núm. 2, julio-diciembre, 2011, pp. 269-279  
Universidad de Costa Rica  
Alajuela, Costa Rica

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43722407004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

## AFINIDAD Y EFECTO DE *Azospirillum* sp. EN MAÍZ<sup>1</sup>

José Antonio Rangel-Lucio<sup>2</sup>, María de las Nieves Rodríguez-Mendoza<sup>3</sup>, Ronald Ferrera-Cerrato<sup>3</sup>, Javier Zaragoza Castellanos-Ramos<sup>2</sup>, Rosa María Ramírez-Gama<sup>4</sup>, Estefana Alvarado-Bárcenas<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz.** El objetivo del presente trabajo fue determinar la afinidad y efecto de cepas de *Azospirillum* en maíz. Este bioensayo se desarrolló en el estado de México, México, durante el ciclo primavera - verano del 2009. Para ello se colectó la raíz de maíz Palomero Toluqueño, Cacahuacintle, Cónico, Chalqueño y H-20, y de Teocintle, y después de aislar y purificar las cepas sobresalientes por actividad nitrogenasa (*N'asa*), se re-inocularon ascéticamente en las mismas variedades en estadio de plántula de 13 días de edad (dde) en hidroponía. Se midió el volumen de la raíz, que también se acondicionó para determinar la población bacteriana y *N'asa* a los 60 dde de maíces y Teocintle. *Azospirillum* no influyó en el volumen radical en relación con la fertilización nitrogenada, pero el estudio comparativo demostró que las cepas aisladas de maíces Cónico y Chalqueño, además de Teocintle, formaron mayor tejido radical en maíz Chalqueño. A pesar de que la mayor población bacteriana se obtuvo con la cepa aislada de H-28 inoculada en maíces Chalqueño, H-28 y Cónico, los mayores registros de *N'asa* ocurrieron con cepas provenientes de H-28, Palomero Toluqueño y Chalqueño inoculadas en maíz Chalqueño. Hubo algún grado de afinidad, o efecto de la cepa homóloga, entre *Azospirillum* obtenida de maíces H-28 y Chalqueño y su reinoculación en estas mismas variedades, al evaluar el número de azospirillas y *N'asa* y un reconocimiento de *Azospirillum* de maíces de origen reciente por ancestros del mismo cereal.

**Palabras clave:** Bacteria diazotrófica, fijación asociativa de nitrógeno, inoculación cruzada, cepa homóloga.

### ABSTRACT

**Affinity and effect of *Azospirillum* sp. in corn.** The objective of this work was to determine the affinity and effect of *Azospirillum* in corn. This bioassay was conducted in the state of Mexico, México, during the spring – summer cycle of 2009. The root system of corn Palomero Toluqueño, Cacahuacintle, Cónico, Chalqueño and H-20, and of Teocintle, was collected, and after isolation and purification of strains outstanding in their nitrogenase activity (*N'asa*), were reinoculated aseptically in the same varieties at the seedling stage (13 days) under hydroponic culture. Root volume was determined, and also used to determine bacterial populations and *N'asa* at 60 dde, in corn and Teocintle. *Azospirillum* did not affect root volume in relation to nitrogen fertilization, but the comparative study showed that strains isolated from Cónico and Chalqueño corn, in addition to Teocintle, formed more root tissue in Chalqueño corn. Despite that the largest bacterial population was obtained with the strain isolated from H-28 ans inoculated on corns Chalqueño, H-28 and Cónico, the highest *N'asa* was recorded with strains isolated from H-28, Palomero Toluqueño and Chalqueño, inoculated on corn Chalqueño. There was a degree of affinity, or effect of the homologous strains, between *Azospirillum* obtained from corns H-28 and Chalqueño and their re-inoculation on the same varieties, evaluating the number of azospirills and *N'asa*, and a survey of *Azospirillum* from recent corns, for ancestors of the same cereal.

**Key words:** Diazotrophic bacteria, nitrogen biologic fixation, cruise inoculation, homologous strains.

<sup>1</sup> Recibido: 4 de noviembre, 2010. Aceptado: 3 de octubre, 2011. Resultado parcial de Tesis de Posgrado del primer autor.

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Roque. Apartado. Postal 58. CP 38.000. Celaya, Guanajuato, México. arangel\_1@yahoo.com; arangel\_1@yahoo.com; javier.castellanos.ramos@gmail.com; estefana3@hotmail.com

<sup>3</sup> Colegio de Postgraduados. km. 36.5 Carr. México-Veracruz. CP 56.230. Montecillo, Texcoco, edo. de México, México. México. marinie@colpos.mx; ronaldfc@colpos.mx

<sup>4</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Laboratorio de Microbiología Experimental. Ciudad Universitaria. México, DF. México. rrgama@correo.unam.mx

## INTRODUCCIÓN

La mayor proporción de nitrógeno en los ecosistemas terrestres y acuáticos proviene de la fijación biológica, FBN (Roesch *et al.* 2008). La integración de FBN a la producción de cultivos mejoraría la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, como maíz. A la relación biológica entre raíz y bacterias diazotróficas que realizan FBN, se conoce como asociación rizosférica o endofítica (Montañéz *et al.* 2008). Es el caso de *Azospirillum* (Lodewyckx *et al.* 2002), que se establece y alimenta en la raíz (Akello *et al.* 2008; El-Tarabily *et al.* 2009) y suministra nitrógeno a la planta (Mayz-Figueroa 2004, Bashan y de-Bashan 2010). *Azospirillum* es la rizobacteria de importancia para mejorar crecimiento o rendimiento de cultivos, bajo diversos ambientes y condiciones edáficas (Bashan *et al.* 2004).

*Azospirillum* se encuentra en especies distintas a los cereales (Gadagi *et al.* 2004, Pereyra *et al.* 2010) e incluso nopal (Caballero-Mellado 1990), bajo diversidad de suelos, climas y manejo agronómico (Cello *et al.* 1997). Además, sintetiza fitohormonas que promueven el crecimiento y cambios morfológicos y fisiológicos de la raíz (*v.gr.*, resistencia a estrés) y micro-biocontrol (Correa *et al.* 2007, Dobbelaere *et al.* 2001, Steenhoudt y Vanderleyden 2000). Esto resulta en mejor aprovechamiento de agua y nutrientes (Hamaoui *et al.* 2001, Dobbelaere *et al.* 2002), incremento de rendimiento (Dobbelaere *et al.* 2001, Dobbelaere *et al.* 2002) y productividad efectiva y consistente (Aravind *et al.* 2009, Sapak *et al.* 2008). Bajo esta interacción “asociativa”, *Glucoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* y *Azospirillum*, promueven FBN sin formar nódulos en caña de azúcar, maíz o arroz (Hirsch *et al.* 2001, Sevilla *et al.* 2001).

Raíces de zacates y cereales exudan ácidos orgánicos (ciclo del ácido tricarboxílico), azúcares y aminoácidos, compuestos orgánicos de la rizósfera (Fan *et al.* 1997). *Azospirillum* exhibe movilidad y quimiotaxis (nivel óptimo de energía de exudados radicales) con algún genotipo particular; hecho descrito como especificidad (dos Santos *et al.* 2005). Esta relación también se conoce como afinidad u homología entre bacteria y genotipo vegetal.

*Rhizobium* infecta sólo a leguminosas y, por el contrario, casi toda esta familia es infectada por algunas bacterias rizobiales. Esta afinidad, se consigna en la literatura bajo grupos de inoculación cruzada (Broun *et al.* 2002, Wrigth *et al.* 2008), tiene resultados agronómicos importantes. Casos de

afinidad: *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago, Melilotus* o *Trigonella*; *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con *Pisum, Vicia, Lens* o *Lathyrus* spp.; *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *Trifolium* (Hirsch *et al.* 2001).

Pocos resultados han encontrado cierta afinidad entre *Azospirillum* y maíz (Penot *et al.* 1992) o entre dicha bacteria y cultivares (Wani *et al.* 1985). El efecto interactivo de esta afinidad se ha encontrado en trigo (Alamri y Mostafa 2009, Díaz-Zorita y Fernández-Canigia 2008) y *Pennisetum americanum* (L.) K. Shum (Tien *et al.* 1979). Así, el éxito de la inoculación con *Azospirillum* se fundamenta en la cepa bacteriana para la especie vegetal apropiada. Estudios de García de Salomone *et al.* (1996) y García de Salomone (2009), invocan afinidad estadísticamente significativa entre *Azospirillum* y maíz, aunque el nivel de colonización varió con el genotipo.

Por otro lado, en respuesta a un proceso largo de domesticación, se conoce una diversidad de razas de maíz en México. Wellhausen *et al.* (1985) describieron 25 de ellas, divididas en cinco grupos: Indígenas Antiguas, Exóticas Precolombinas, Mestizas Prehistóricas, Modernas Incipientes y No Bien Definidas. Posteriormente, diferentes autores e instituciones de México salvaguardan entre 41 (Ortega-Paczka *et al.* 1991), 59 (Sánchez *et al.* 2000) y 65 (LAMP 1991) razas de maíz. Un potencial genético generado por evolución de maíz en interacción con el ambiente y, posiblemente, con la microbiota edáfica.

Existe mayor información de la bacteria que la planta en la fijación asociativa; la planta responde positivamente a la inoculación (Okon y Labandera-González 1994). Esto es una desventaja en la asociación biológica entre *Azospirillum* y gramíneas, que no ha sido suficiente y apropiadamente documentada. La evolución genética de maíz ha dependido de la naturaleza o de la inducción del hombre; hecho que limita y genera incertidumbre de la relación biológica y producción sustentable de maíz. Ante esta problemática, Boddey y Döbereiner (1988) sugirieron estudios prioritarios entre *Azospirillum* y cultivares para aumentar rendimiento de gramíneas y cereales.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la afinidad y efecto de cepas de *Azospirillum* en maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El bioensayo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología

del Colegio de Postgraduados, Montecillo, estado de México, México, durante el ciclo primavera-verano 2009.

La elección del material genético de maíz se hizo con base a su aparición cronológica en la naturaleza o al empleo en sistemas agrícolas del estado de México (Cuadro 1): Teocintle [*Zea mays* L. ssp. *mexicana* (Schrader) Iltis., ancestro], Palomero Toluqueño (maíz con mayor antigüedad), Cacahuacintle, Cónico, Chalqueño y H-28 (liberación reciente). El muestreo se hizo en diez plantas en antesis, elegidas por el método de zig-zag en el terreno de cultivo; la parte inferior del tallo unido a la raíz y cepellón de suelo extraído, se introdujeron en bolsa de polietileno para su conservación y transporte al laboratorio.

#### Aislamiento y selección de cepas de *Azospirillum*

Las raíces fueron lavadas con agua destilada y fragmentadas en segmentos de 1 a 1.5 cm de longitud; quince de ellos fueron esterilizadas superficialmente con una solución a base de Etanol (70%) por un minuto, después inmersas en Cloramina-T al 1% por cinco minutos y cinco enjuagues con agua destilada estéril por cinco minutos (Martínez 1986). Se utilizó el medio de cultivo DNFB (Döbereiner y Day 1974). Con las pinzas de disección se provocaron lesiones en los segmentos de raíz y se introdujeron parcialmente en 2 ml de medio de cultivo semigelificado confinado en tubos de 5 ml; se taparon con algodón y gasa y cubiertos con papel aluminio. La incubación se hizo a 28°C por cinco a siete días, al observar crecimiento y manifestación típicos de *Azospirillum* y un viraje de verde al azul en el color del medio. Después se practicó un estriado en el medio sólido DNFB en cajas Petri e incubadas a

28°C por trece días. Despues de purificar las colonias típicas, se sembraron en tubos de rosca con el medio de cultivo gelificado inclinado, donde se permitió el crecimiento de colonias a 28°C y su conservación posterior a 4°C.

La caracterización de *Azospirillum* se hizo con base a la morfología colonial y microscópica (Krieg y Döbereiner 1984), mientras que la selección de cepas por actividad de la enzima nitrogenasa (N'asa) mediante el método de actividad reductora de acetileno. Una asada por cultivo se colocó en 2 ml del medio líquido en tubos de rosca e incubados a 20°C, que se sometieron a agitación rotativa a 240 rpm por 48 h. La lectura se hizo en Espectrofotómetro a 240 nm para ajustar número de bacterias/10<sup>6</sup>, conforme la escala de McFarland (Martínez 1986).

A partir de la suspensión bacteriana agitada, se distribuyeron 0,2 ml sobre 7 ml de medio semigelificado DNFB conservado en tubos de 37 ml de capacidad; se taparon con algodón y gasa e incubaron a 28°C por 48 h. Despues se taparon herméticamente, se extrajo 10% del volumen de aire interno y se recuperó con gas acetileno 10% de espacio interno; enseguida se incubaron por 24 h, al término del cual se extrajeron 5 ml y depositaron en tubos vacutainer de igual volumen. Para estimar N'asa por actividad reductora de acetileno, se extrajeron 0,5 ml y se colocaron en un cromatógrafo de gases cuyo inyector, columna de 2 m x 3,17 mm, soporte tipo Poropak de 80 a 100 mallas (Mascarúa-Esparza *et al.* 1988) y detector de flama funcionaron a 110, 60 y 130°C; se permitió una circulación de 30 ml de Hidrógeno y 30 ml de Helio/min. La curva patrón se obtuvo del Etileno disuelto en Helio a concentración conocida. Con esta información y registros de temperatura y presión ambiental durante las lecturas, se obtuvo la curva

**Cuadro 1.** Origen de plantas de teocintle y maíz, altitud y clima del sitio de muestreo. Estado de México, México. 2009.

Planta	Sitio <sup>1</sup>	Localización	Altura (m)	Clima <sup>2</sup>
Teocintle	Tlalmanalco de Velázquez	19° 12' 13"N; 98° 48' 10" O	2,401	Cb(W <sub>1</sub> )(W)(i')g
Palomero Toluqueño	Chapingo	19° 29' 34" N; 98° 53' 51" O	2,255	Cb(W <sub>0</sub> )(W)(i')g
Cacahuacintle	San Mateo Atenco	19° 16' 13" N; 99° 32' 00" O	2,577	Cb(W <sub>2</sub> )(W)(i')g"
Cónico	San Mateo Atenco	19° 16' 13" N; 99° 32' 00" O	2,577	Cb(W <sub>2</sub> )(W)(i')g"
Chalqueño	Tlalmanalco de Velázquez	19° 12' 13" N; 98° 48' 10" O	2,401	Cb(W <sub>1</sub> )(W)(i')g
H-28	Chapingo	19° 29' 34" N; 98° 53' 51" O	2,255	Cb(W <sub>0</sub> )(W)(i')g

<sup>1</sup> Estado de México, México; <sup>2</sup> Fuente: García (1988).

de regresión lineal a la que se ajustaron resultados de reducción de acetileno y selección definitiva de cepas.

#### **Siembra de maíz e inoculación de cepas de *Azospirillum* en maíz**

En experimento preliminar se eligió la solución nutritiva Lefebvre modificada (Tirado 1987) y arena de río de 1,7 mm de diámetro como sustrato, con base al efecto en el crecimiento y producción de materia seca de maíz en hidroponia.

Las macetas se desinfectaron con formaldehido (0,1%) frotado con algodón y alcohol (90%) asperjado, y cubiertas en el exterior con papel de estraza; se colocó un tubo de cristal para el riego y se agregaron 2 kg de sustrato. Las semillas se sumergieron diez segundos en etanol para su desinfestación y se lavaron con agua destilada estéril; luego se imbibieron en  $HgCl_2$  al 1% por tres minutos y enseguida se les realizó cinco enjuagues en agua destilada; reposaron por 15 min. Después de sembrar cuatro semillas bajo asepsia (calor), la parte superior de la maceta también se cubrió con papel de estraza, para evitar la posible contaminación por otros microorganismos. El procedimiento fue propuesto por Somesagaran *et al.* (1981).

Al décimo día de la siembra se permitió el crecimiento de dos plantas/maceta, expuestas a través de orificio practicado al papel-cubierta; tres días después se inoculó una carga bacteriana de  $4,125 \times 10^7$  células/ml (cámara Petroff-Hausser) dirigida a la base de la planta, acompañada de riego ligero con agua destilada para conducir las cepas al sistema radical. La inoculación cruzada consistió en inocular (variedad distinta a su aislamiento) o reinocular (variedad de origen), individualmente, la cepa purificada de *Azospirillum* a maíz o teocintle en invernadero. También se inoculó *Azospirillum lipoferum* Sp 59, como testigo (-SP). Los riegos se programaron con agua destilada estéril por dos días continuos y el tercero con la solución nutritiva, ambas conservadas en depósitos independientes en invernadero.

#### **Efecto de cepas de *Azospirillum* y actividad nitrogenasa (N'asa)**

*Volumen radical.* Obtenido por el desplazamiento del nivel de agua destilada ejercido por la raíz, introducida en una probeta de cristal y volumen conocido. Se emplearon dos repeticiones.

*Población de Azospirillum en la raíz.* Previa limpieza con agua destilada, las raíces cosechadas se dividieron en zonas basal, media y apical antes de cortar en fragmentos; de cada zona se eligieron diez segmentos, enseguida fueron esterilizados superficialmente y sembrados en el medio semigelificado DNFb por siete días, en los que se apreció el crecimiento y manifestación característicos de *Azospirillum*. Finalmente, se elaboraron diluciones de  $10^4$  a  $10^{-8}$  y se hizo el recuento de la carga bacteriana en la cámara Petroff-Hausser.

*Actividad nitrogenasa.* Después de separadas, las raíces de tres repeticiones se introdujeron en contenedores de polietileno de 1,370 ml; una vez selladas las tapas, a través del diafragma fijo de hule, se recuperó con acetileno 10% del aire extraído. Después de 24 h de incubación se reservaron 5 ml del contenido en tubos vacutainer, de los cuales 0,5 ml se usaron en cromatografía de gases. La curva de regresión lineal del etileno reducido, también se obtuvo como anteriormente se indicó.

#### **Análisis estadístico**

El diseño de tratamientos consistió de cinco cepas aisladas y seleccionadas de cinco maíces, y de *Azospirillum lipoferum* Sp 59 como testigo. Además, se estudiaron cuatro niveles comparativos de nitrógeno (urea, 44% N) como fuente de fertilizante químico: 0, 40, 80, 120 kg ha<sup>-1</sup>. El diseño experimental en invernadero fue completamente al azar con arreglo factorial completo 7x5 [cepas y variedades (Teocintle no es maíz; de ahí su separación durante el análisis estadístico de datos)] y completamente al azar en laboratorio. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza con el paquete SAS ver. 9 y la prueba de comparación de medias con Tukey al 0,05.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

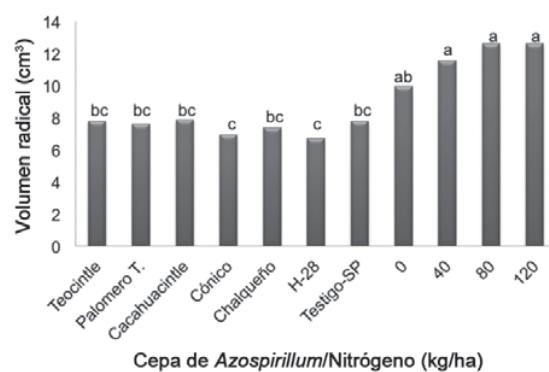
#### **Selección de cepas de *Azospirillum***

Los valores de la actividad de la enzima N'asa (en nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/planta/24 h) registrados por las cepas, estuvieron en función de la procedencia de la planta: Teocintle de 0 a 149,45; Palomero Toluqueño de 0 a 3,65; Cacahuacintle de 0 a 151,19; Cónico de 0 a 95,6; Chalqueño de 0 a 281,51; H-28 de 0 a 74,14. El mayor número y registro de la N'asa se

asoció con aislamientos de los maíces Chalqueño y H-28, respectivamente; en cambio, la menor consistencia se observó en cepas aisladas de Palomero Toluqueño. Las cepas de *Azospirillum* con mayor actividad nitrogenasa, corresponde a los aislamientos de las cepas de *Azospirillum* realizados de Teocintle, y maíces Palomero Toluqueño, Cacahuacintle, Cónico, Chalqueño y H-28, respectivamente; Testigo-SP es la cepa testigo.

### Volumen radical

La inoculación de las cepas de *Azospirillum* disminuyó significativamente el volumen de la raíz (en cm<sup>3</sup>) de las variedades de maíz (Figura 1), lo que representó una reducción de 38 a 45% entre el grupo de cepas inoculadas respecto a la fertilización química nitrogenada de maíz con 60 y 120 kg/ha como testigos. Esta respuesta es una evidencia de la dependencia que el cultivo de maíz ha desarrollado por los fertilizantes químicos, demostrado por Riedell (2010), quien afirma que la respuesta sinérgica entre la acumulación de materia seca y la concentración de nitrógeno, resulta del mayor crecimiento y actividad de la raíz al aumentar la proporción de fertilizante nitrogenado en el suelo. Situación semejante ocurrió entre *Azospirillum zae* N7 y maíz, donde se denota la ausencia de efectos estadísticos significativo en el rendimiento con respecto al empleo de 55 y 110 kg/ha de nitrógeno (Menhaz *et al.* 2010).

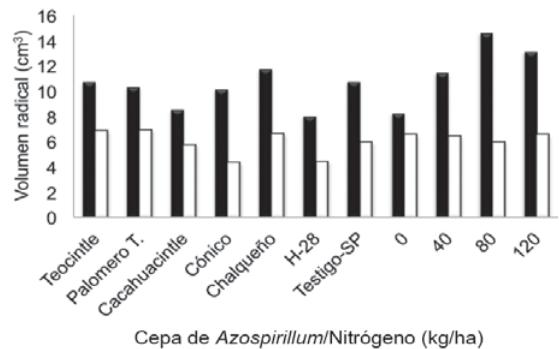


**Figura 1.** Efecto de la cepa de *Azospirillum* aislada y fertilización química nitrogenada, en el volumen radical de maíz. Montecillo, estado de México, México, 2009.

En la Figura 1 también se aprecia que la mejor respuesta en el volumen radical por la inoculación, se presentó con las cepas aisladas de Teocintle, Palomero Toluqueño, Cacahuacintle, Chalqueño y SP59, aunque los valores fueron estadísticamente iguales al testigo absoluto (0 kg de N/ha). La disminución del volumen de la raíz por la inoculación de *Azospirillum*, como en nuestro caso para maíz, ha sido común en arroz (Cassan *et al.* 2009), trigo (Steenhoudt y Vanderleyden 2000), *Sorghum bicolor* y *S. sudanense* (Morgenstern y Okon 1987). Las razones que surgen para este tipo de respuesta, sugieren una variación en los carbohidratos y otras fuentes de energía exudadas o de sustancias inhibidoras del crecimiento (Kipe-Nolt *et al.* 1985), crecimiento abundante de pelos radicales en la zona meristemática y de elongación de la raíz (Lerner *et al.* 2005). Además, *Azospirillum* depende de la nutrición balanceada y metabolismo de la planta, y las diversas especies y cepas responden a un espectro de atrayentes que se correlacionan con la calidad de los exudados radicales típicos de la rizósfera, donde el mejor atrayente representa el mejor sustrato de crecimiento (Alexandre *et al.* 2000). De esta forma, el comportamiento de *Azospirillum* reflejaría el ambiente en el que actúa (suelo y rizósfera); sin embargo, el sustrato de crecimiento experimental para la interacción planta-*Azospirillum* consistió de un sustrato inerte, distinto a un suelo en el que normalmente tiene lugar la fijación asociativa de nitrógeno.

Si bien las diferencias estadísticas significativas del volumen radical se presentaron al interactuar la cepa de *Azospirillum* con las variedades de maíz Palomero Toluqueño, Cacahuacintle y Cónico, la ausencia de efectos estadísticos significativos en la interacción de cepas y maíces Chalqueño y H-28 (Figura 2), demostraría la utilidad de *Azospirillum* como biofertilizante para promover el crecimiento de la raíz de maíz. Esta interacción también otorga créditos que favorecen la asociación entre cepas de *Azospirillum* (sin importar la variedad de maíz de la cual se obtuvo) y maíces que se consideran de menor antigüedad en la escala de aparición genética y de aprovechamiento agrícola en el centro de México. Este resultado también sustenta parte de la afinidad que se plantea demostrar en el estudio, en particular entre Chalqueño y cepas aisladas de las variedades de maíz y teocintle.

Producto de la inoculación cruzada de *Azospirillum* en las variedades de maíz, son las evidencias estadísticas



**Figura 2.** Efecto interactivo entre la cepa de *Azospirillum* o fertilización química nitrogenada, en el volumen radical de maíces Chalqueño (■) y Cónico (□). Montecillo, estado de México, 2009.

altamente significativas registradas en el volumen de la raíz (Cuadro 2), que consigna un aumento en la raíz de maíz Chalqueño al ser inoculado con las cepas de *Azospirillum* Teocintle, Cónico, Chalqueño y cepa Testigo-SP. De particular importancia es el mayor tejido radical del maíz Chalqueño al asociarse con la cepa aislada de Chalqueño y que comprueba, además, la existencia de una afinidad en este tipo de relación biológica y la posibilidad de mantenerse al operar bajo la inoculación de cepas de *Azospirillum* aisladas de Teocintle y maíz Cónico y con la cepa testigo. En la literatura no aparece información de trabajos y resultados semejantes, pero el efecto aditivo de *Pseudomonas* y *Azospirillum* estudiado por Faggioli *et al.* (2008), reflejó una proporción de raíces 25% mayor que la parte aérea de maíz.

### Población de *Azospirillum* en la raíz

Del espectro de diluciones desarrollado, se tomó a la población presente x 10-4 (Cuadro 3) para la discusión. En este cuadro se aprecia un número variable de bacterias en las raíces de las variedades de maíz. No obstante, la mayor consistencia en el número se encontró al asociarse la cepa H-28 de *Azospirillum* con los maíces Chalqueño, H-28 y Cónico, entre los cuales se establece una relación afín, además de un efecto homólogo de la cepa con el maíz H-28. También explicaría un reconocimiento regresivo de la bacteria en maíces que, de alguna manera, le brindaron las condiciones de crecimiento y adaptación, producto de la evolución que las vincula y permite interactuar y mantenerse en número suficiente para sobrevivir y desarrollarse en los tiempos actuales. En cambio, Elbeltagy *et al.* (2001) estimaron que el recuento de colonias de bacterias promotoras del crecimiento sobre la superficie, fue significativamente mayor ( $p<0,05$ ) dentro de raíces de arroz silvestre que en las variedades cultivadas.

Este tipo de respuesta, se podría sustentar en la disponibilidad de compuestos orgánicos radicales exudados por la raíz (Pavinato *et al.* 2008) de los maíces genéticamente mejorados por el hombre e influidos por el ambiente, como lo prueban los mecanismos estables de colonización por la homología y afinidad descritas, en función de los microambientes en la rizósfera creados por el hospedero H-28 para la cepa H-28 de *Azospirillum* y respaldados por esta misma cepa en maíces Chalqueño y Cónico, e incluso Palomero Toluqueño. Al respecto, se ha argumentado

**Cuadro 2.** Volumen radical (cm³) de maíz en respuesta a la inoculación cruzada de cepas de *Azospirillum*. Montecillo, estado de México, 2009.

Variedad de maíz/cepas	Teocintle	Palomero Toluqueño	Cacahuacintle	Cónico	Chalqueño	H-28	Testigo-SP
Palomero Toluqueño	5,5 b	6,8	7,3	5,5 bc	4,1 b	5,6	8,3 ab
Cacahuacintle	7,9 ab	7,1	9,4	6,6 abc	7,7 ab	7,6	7,1 ab
Cónico	7,9 ab	6,9	8,3	8,1 ab	6,6 b	7,9	6,8 ab
Chalqueño	10,7 a	10,3	8,5	10,1 a	11,7 a	8,0	10,6 a
H-28	6,8 b	6,9	5,7	4,3 c	6,6 b	4,4	5,9 b

**Cuadro 3.** Número de bacterias de *Azospirillum* ( $\times 10^4$ ) en 2 g de raíz fresca de variedades de maíz de 60 d de edad. Promedio de tres repeticiones. Montecillo, estado de México, México, 2009.

Cepa/Maíz	Palomero Toluqueño	Cacahuacintle	Cónico	Chalqueño	H-28	Promedio
Teocintle	17,00	29,09	20,00	11,67	16,45	18,84
Palomero						
Toluqueño	21,79	21,90	13,08	13,00	15,93	17,14
Cacahuacintle	46,00	24,49	19,00	17,81	26,66	26,79
Cónico	1,50	4,00	13,97	17,81	19,81	11,42
Chalqueño	28,48	17,00	22,61	26,42	23,00	23,50
H-28	28,94	20,51	26,95	29,36	28,80	26,91
Testigo	35,31	58,09	12,72	11,18	11,93	25,84
Promedio	25,57	25,01	18,33	18,17	20,37	

que el número de azospirilas por cepa muestra buena capacidad para agregarse a la raíz e indican que *Azospirillum brasiliense Cd* se establece al finalizar la fase vegetativa de trigo, con fundamento en la ausencia de células receptoras al inicio del ciclo (Madi y Henis 1989). Por el contrario, Bashan (1986) afirma que la inoculación de la semilla al momento de la siembra, o inmediatamente después de la emergencia de trigo, asegura el 80% de infección; en nuestro caso, la inoculación se practicó cuando el maíz tenía dos hojas fotosintéticamente activas.

Por otro lado, la respuesta que surge de la inoculación cruzada de las cepas Cacahuacintle de *Azospirillum* y maíz Palomero Toluqueño, podría encontrar explicación en la cercanía genética de éste con el Cacahuacintle, mientras que un potencial importante partiría de la relación biológica que ocurre entre Testigo-SP y Cacahuacintle, sin estar de por medio la evolución genética del maíz y el grado de desarrollo de la cepa.

#### Actividad nitrogenasa (N'asa)

La actividad N'asa de *Azospirillum* en raíces, expresa la relación estrecha que existe entre la población bacteriana y su localización y función en el sistema radical. La raíz de maíz Chalqueño presentó, en promedio, ca. 92% de infección con las cepas de *Azospirillum* probadas y la mayor afinidad se registró con las

cepas Teocintle (100%) y Palomero Toluqueño (97%), mientras Cacahuacintle ofreció la menor oportunidad de infección a la bacteria (Cuadro 4). En este sentido, se considera que la colonización radical es un pre-requisito para que las bacterias fijadoras de nitrógeno interactúen con las plantas (Kim *et al.* 2005). Nuestros resultados indican que las cepas de *Azospirillum* prefieren poblar la zona basal de la raíz (91% de infección) y disminuye con la profundidad radical media (86%) y apical de la raíz (84%); esto correspondería con la menor concentración de oxígeno y nitrógeno en el sustrato hidropónico. Dinámica poblacional que también fue encontrada por Baldani *et al.* (1986).

La técnica de reducción de acetileno permitió el reconocimiento entre la cepa de *Azospirillum* y variedad de maíz a través de la actividad N'asa (Cuadro 4). La mayor afinidad que deriva de los resultados de la N'asa, se encontraron al interactuar el maíz Chalqueño con las cepas HV-28, Palomero Toluqueño y Chalqueño, que las ubicaron 99,1, 98,9 y 98,5% por arriba de la N'asa que registró la cepa Testigo-SP, inoculada en la misma variedad de maíz. Esta respuesta indicaría que la mayor restricción de nitrógeno se presentó en el maíz Chalqueño y que esta desventaja sería mejor aprovechada por las cepas descritas para desarrollar mayor N'asa, y por lo tanto la intervención de un control genético de la cepa bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Postgate 1982), semejante al modo en que opera *A. brasiliense* (Pedrosa y Yates 1984).

**Cuadro 4.** Actividad nitrogenasa de *Azospirillum* (nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/2 plantas/24 h) en la raíz de variedades de maíz bajo inoculación cruzada. Montecillo, estado de México, México, 2009.

Cepa/Maíz	Palomero Toluqueño	Cacahua- cintle	Cónico	Chalqueño	H-28	Promedio
Teocintle	228,09	352,15	1,018.22	376,51	220,0	439,0
Palomero						
Toluqueño	97,49	16,56	143,32	1,496.62	40,61	358,9
Cacahuacintle	16,00	583,15	1,224.71	112,28	482,67	483,8
Cónico	402,66	302,52	1,86	357,62	13,77	215,7
Chalqueño	161,61	786,42	5,52	1,083,36	36,96	414,8
H-28	612,86	40,40	279,62	1,930.43	43,49	581,4
Testigo	128,48	962,15	30,58	15,83	250,01	277,4
Promedio	235,30	434,8	386,30	767,50	155,30	

En cambio, la cepa H-28 de *Azospirillum* aislada de un maíz recién liberado, precisamente inoculada en el maíz Chalqueño, tuvo N'asa promedio 109% superior que la cepa Testigo-SP (Cuadro 4). De este modo se podría hablar de un reconocimiento regresivo de la cepa por un maíz (Chalqueño) que, evolutivamente, antecedió a la variedad de la cual se aisló (H-28). Esta recesividad de la N'asa parece depender del control genético que ejercen las poblaciones sobre las líneas puras de maíz, inoculado con *A. brasiliense* y *A. lipoferum*, y que también se repite entre genotipos de maíz (Marocco *et al.* 1985) y sorgo (Purushotaman y Oblisami 1985), dada la cantidad y calidad de los exudados radicales (Kipe-Nolt *et al.* 1985). Esto muestra la afinidad de cepas y plantas de maíz, que había sido advertido por Pecina-Quintero *et al.* (2005) y que, sin embargo, limita la posibilidad de elaborar un inoculante comercial confiable a base de *Azospirillum* (Bashan y Holguin, 1997). Algunas de las causas de estos resultados provienen, entre otras, de la capacidad de establecimiento de la bacteria y del genotipo hospedero (Chotte *et al.* 2002, Ramos *et al.* 2002).

## LITERATURA CITADA

Akello, J; Dubois, T; Coyne, D; Kyamanywa, S. 2008. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* and their damage in tissue-cultured banana plants. Entomologia Experimentalis et Applicata 129:157-165.

- Alamri, SA; Mostafa, YS. 2009. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasiliense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. Saudi Journal of Biological Sciences 16(2):101-107.
- Alexandre, G; Greer, SE; Zhulin, IB. 2000. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasiliense*. Journal of Bacteriology 182(21):6042-6048
- Aravind, R; Kumar, A; Eapen, SJ; Ramana, KV. 2009. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. Letters in Applied Microbiology 48:58-64.
- Baldani, VLD; de B. Alvarez, MA; Baldani, JI; Döbereiner, J. 1986. Establishement of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant and Soil 90:35-46.
- Bashan, Y. 1986. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasiliense* Cd, following temporary depression of rhizosphere microflora. Applied and Environmental Microbiology 51:1067-1071.
- Bashan, Y; Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Canadian Journal of Microbiology 43:103-121.
- Bashan, Y; Holguin, G; de-Bashan, LE. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50(8):521-557.
- Bashan, Y; de-Bashan, LE. 2010. Chapter Two. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* Promotes

- Plant Growth. A Critical Assessment Advances in Agronomy 108:77-136.
- Boddey, RM; Döbereiner, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. Plant and Soil 108: 53-65.
- Broun, FL; Lawrence, BI; McCoy, E. 2002. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Parallel Press. University of Wisconsin, Madison, WI, USA. 320 p.
- Caballero-Mellado, J. 1990. Potential use of *Azospirillum* in association with prickly pear cactus. In Proceedings of the First Annual Texas Prickly Pear Council. Kingsville, Texas. p. 14-21.
- Cassan, F; Maiale, S; Masciarelli, O; Vidal, A; Luna, V; Ruiz, O. 2009. Cadaverine production by *Azospirillum brasiliense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. European Journal of Soil Biology 45(1):12-19.
- Cello, F; Bevvino, A; Chiarini, L; Fani, R; Paffetti, D; Tabacchioni, S; Dalmastri, C. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. Applied Environmental Microbiology 63:4485-4493.
- Chotte, J; Schwatzmann, A; Bally, R.; Monrozier, LJ. 2002. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. Soil Biology and Biochemistry 34:1083-1092.
- Correa, OS; Romero, AM; Montecchia, MS; Soria, MA. 2007. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. Journal of Applied Microbiology 102:781-786.
- Díaz-Zorita, M; Fernández-Canigia, MV. 2008. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasiliense* on dryland wheat productivity. European Journal of Soil Biology 45(1):3-11.
- Dobbelaere, S; Croonenborghs, A; Thys, A; Ptacek, D; Vanderleyden, J; Dutto, P; Labandera-Gonzalez, C; Caballero-Mellado, J; Aguirre, JF; Kapulnik, Y; Berner, S; Burdman, S; Kadouri, D; Sarig, S; Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Australian Journal of Plant Physiology 28: 871-879.
- Dobbelaere, S; Croonenborghs, A; Thys, A; Ptacek, D; Okon, Y; Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasiliense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils 36(4):284-297.
- Döbereiner, J; Day, DJ. 1974. Associative symbiosis in tropical grasses of microorganisms and dinitrogen fixing site. In Newton, W; Nyam, CJ. eds. Proceedings of the 1<sup>st</sup>. International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press. Pullman, USA. 2:518-539.
- dos Santos, AM; dos Santos, TKT; Kirchhof, G; Hartmann, A; Baldani, JI. 2005. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. Pedobiologia 49(6):565-576.
- Elbeltagy, A; Nishioka, K; Sato, T; Suzuki, H; Ye, B; Hamada, T; Isawa, T; Mitsui, H; Minamisawa, K. 2001. Endophytic colonization and plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolate from wild rice species. Applied and Environmental Microbiology 67: 5285-5293.
- El-Tarably, KA; Nassar, AH; Hardy, GESJ; Sivasithamparam, K. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. Journal of Applied Microbiology 106:13-26.
- Faggioli, VS; Cazorla, CR; Vigna, A; Berti, MF. 2008. Fertilizantes biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasiliense* y *Pseudomonas fluorescens*. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Marcos Suárez. Argentina. 4 p.
- Fan, TW; Lane, AN; Pedler, J; Crowley, D; Higashi, RM. 1997. Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. Annals of Biochemistry 251:57-68
- Gadagi, RS; Krishnaraj, PU; Kulkarni, JH; Sa, T. 2004. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. Scientia Horticulturae 100 (1-4):323-332.
- García de Salamone, IE. 2009. Ecophysiology of the response to *Azospirillum* inoculation of cereal crops in Argentina. Progress in the use of PGPR. 8<sup>th</sup>. International PGPR Workshop. May 17-22, 2009. Portland, Oregon, USA. p. 48.
- García de Salamone, IE; Döbereiner, J; Urquiaga, S; Boddey, RM. 1996. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by <sup>15</sup>N isotope dilution technique. Biology and Fertilizer of Soils 23: 249-256.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios, SA. México, D.F. México. 219 p.

- Hamaoui, B; Abbadi, JM; Burdman, S; Rashid, A; Sarig, S; Okon, Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21(6-7):553-560.
- Hirsch, AM; Lum, MR; Downie, JA. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology* 127:1484-1492.
- Kim, Ch; Kecskés, ML; Deaker, RJ; Gilchrist, K; New, PB; Kennedy, IR; Kim, S; Sa, T. 2005. Wheat root colonization and nitrogenase activity by *Azospirillum* isolated from crop plants in Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 51:948-956.
- Kipe-Nolt, JA; Avalakki, UK; Dart, PJ. 1985. Root exudation of Sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixation bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 17:859-863.
- Krieg, NR; Döbereiner, J. 1984. Genus *Azospirillum*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* I. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. p. 40.
- LAMP (Latin American Maize Project). 1991. ARS-USDA, CIMMYT, Pioneer Hi-Bred International Inc. Universidad Agraria La Molina (Perú). sp.
- Lerner, A; Herschkovitz, Y; Baudoin, E; Nazaret, S; Moenne-Loccoz, Y; Yaacov Okon, Y; Jurkevitch, E. 2005. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 38(6):1212-1218.
- Lerner, A; Herschkovitz, Y; Baudoin, E; Nazaret, S; Moenne-Loccoz, Y; Okon, Y; Jurkevitch, E. 2006. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 38:1212-1218.
- Lodewyckx, C; Vangronsveld, J; Porteous, F; Moore, ERB; Taghavi, S; Mezgeay, M; van der Lelie, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(6): 583-606.
- Madi, L; Henis, Y. 1989. Aggregation in *Azospirillum brasiliense* Cd: conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. *Plant and Soil* 115: 89-98.
- Marocco, A; Piana, L; Fogher, C; Vaciago, B. 1985. *In vitro* selection of maize to enhance association with nitrogen fixing bacteria: preliminary results. Universita Cattolica del Sacro Cuore. *Annales della Facolta de Agraria* 25:47-53.
- Martínez, BJE. 1986. Estudio de la relación *Azospirillum lipoferum* Sp 59 y *Azospirillum* sp. con cultivos de tejidos de maíz. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México. México. 154 p.
- Mascarúa-Esparza, MA; Villa-González, R; Caballero-Melado, J. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. *Plant and Soil* 106:91-95.
- Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. UDO Agrícola 4(1):1-20.
- Mehnaz, S; Kowalik, T; Reynolds, B; Lazarovits, G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays* L.) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42(10):1848-1856.
- Montañez, A; Abreu, C; Paul, R; Gill, PR; Hardarson, G; Sicardi, M. 2008. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by <sup>15</sup>N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology and Fertility of Soils* 45(3):253-263.
- Morgenstern, E; Okon, Y. 1987. The effect of *Azospirillum brasiliense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*. *Arid Soils Research and Rehabilitation* 1:115-127.
- Okon, Y; Labandera-Gonzalez, CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1591-1601.
- Ortega-Paczka, RA; Sánchez, GJJ; Castillo GF; Hernández CJM. 1991. Estado Actual de los Estudios sobre Maíces Nativos de México. In Ortega, PARA; Palomino, HG; Castillo, GF; González, HVA; Livera MM. eds. *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C., Chapingo, edo. de México. México. p. 161-185.
- Pavinato, PS; Merlin, P; Rosolem, CA. 2008. Organic compounds from plants extracts and their effect on soil phosphorus availability. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(10):1379-1388.
- Pecina-Quintero, V; Díaz-Franco, A; Williams-Alanís, H; Rosales-Robles, E; Garza-Cano, I. 2005. Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en sorgo. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(4):389-392.
- Pedrosa, FO; Yates, MG. 1984. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasiliense* by nif-A and ntr (5 ln) type genes products. *FEMS Microbiology Letters* 23:95-101.

- Penot, I; Berges, N; Guiguene, C; Fages, J. 1992. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. Canadian Journal of Microbiology 38:798-803.
- Pereyra, CM; Ramella, NA; Pereyra, MA; Barassi, CA; Creus, CM. 2010. Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasiliense* inoculation. Plant Physiology and Biochemistry 48(1): 62-69.
- Postgate, JR. 1982. The fundamentals of Nitrogen fixation. Cambridge University Press. p. 60-102.
- Purushothaman, D; Obisami, G. 1985. *Sorghum* cultivars differ in nitrogen fixation. News Letter 14:2.
- Ramos, HJO; Roncato-Maccari, LDB; Souza, EM; Soares-Ramos, JRL; Hungria, M; Pedrosa, FO. 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusa genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. Journal of Biotechnology 97:243-252.
- Riedell, WE. 2010. Mineral nutrient synergism and dilution responses to nitrogen fertilizer in field grown maize. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 173:869-874.
- Roesch, LFW; Camargo, FAO; Bento, FM; Triplett, EW. 2008. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. Plant and Soil 302(1-2):91-104.
- Sánchez GJ; Goodman, MM; Stuber, CW. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. Economic Botany 54(1):43-59.
- Sapak, Z; Meon, S; Ahmad, ZAM. 2008. Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm. International Journal of Agriculture and Biology 10:127-132.
- Sevilla, M; Burris, RH; Gunapala, N; Kennedy, C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and <sup>15</sup>N<sub>2</sub> incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif<sub>\_</sub> mutant strains. Molecular Plant-Microbe Interactions 14:358-366.
- Somesagaran, P; Hoben, H; Halliday, J. 1981. Ejercicios prácticos en tecnología de *Rhizobium-leguminosas*. Curso Internacional en Tecnología de *Rhizobium*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, estado de México. México. 87 p.
- Steenhoudt, O; Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews 24:487-506.
- Tien, TM; Gaskins, MH; Hubbell, DH. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology 37:1016-1024.
- Tirado, TJL. 1987. Contribution a L'étude des activités glutamine sintétase et glutamato deshydrogenase comme marqueurs du metabolisme azote chez la feville de soja. Docteur d'etat mention sciences. University des Sciences et Techniques du Languedoc Montpellier, France. 205 p.
- Wani, SP; Chandrapalaih, S; Dart, PJ. 1985. Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. Experimental Agriculture 21:175-182.
- Wellhausen, EJ; Roberts, LM; Hernández XE; PC Mangelsdorf. 1985. Razas de maíz en México: Su origen, características y distribución. In Hernández, XE. ed. Xolocotzia Vol. II. Revista Geografía Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México. México. p. 609-750.
- Wright, DL; Newman, YC; Whitty, EB. 2008. Inoculation of Agronomic Crop Legumes. SS-AGR-154 Series, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. Agronomy Department, University of Florida. Consultado 10 set. 2010. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu>.