

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Azospirillum* sp. EN PLANTAS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacquin)

[EFFECT OF *Azospirillum* sp. INOCULATION IN HABANERO CHILE PLANTS (*Capsicum chinense* Jacquin)]

J.C. Canto-Martín¹, S. Medina-Peralta² y D. Morales Avelino^{1,3}

¹Licenciatura en Biología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Apdo. Postal 114 Itzimná, 97100, Mérida, Yucatán, México. mavelino@tunku.uady.mx

²Facultad de Matemáticas, Apdo. Postal 172 Cordemex, 97110.

Mérida, Yucatán, México. mperalta@tunku.uady.mx

Universidad Autónoma de Yucatán

³Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida. Av. Tecnológico Km. 4.5. Mérida, Yucatán, México.

SUMMARY

An *Azospirillum* strain from *Cenchrus echinatus* roots was isolated, and a pure culture of the strain was used as inoculum to induce root growth in *Capsicum chinense* seedlings. The inoculum concentration effects were evaluated on seeds germination rate, radicular system, and shoots growth. The inoculated seeds germination occurred a day before non inoculated seeds. An increase ($P < 0.001$) in tertiary, and secondary root number, and in shoot growth was obtained. A significant difference of seedlings growth ($P < 0.01$) in sterilized and non sterilized, soil was observed. The optimal inoculum size were 3×10^7 fcu ml^{-1} and 1×10^7 fcu ml^{-1} . It is suggested that inoculum size has played an important role as modulator of indigenous microorganisms interactions.

Key words: *Azospirillum* sp., biofertilization, *C. chinense*, inoculación.

RESUMEN

Se obtuvo un cultivo puro de *Azospirillum* sp. de las raíces del pasto muul o tak' suuk (*Cenchrus echinatus*). Se evaluó el efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en la capacidad de germinación de las semillas y en el desarrollo inicial de las plantas de *C. chinense*. Se encontró que la inoculación aceleró por un día la germinación y los porcentajes de germinación no varían. La inoculación a diferentes concentraciones y en los dos tipos de tierra, estéril y no estéril, influye significativamente ($P < 0.001$) en el desarrollo del sistema radical (mayor número de raíces secundarias y terciarias) y de la porción aérea de la planta. En tierra estéril el desarrollo de la planta fue significativamente menor que en la tierra normal sin esterilizar ($P < 0.01$). La concentración de inóculo que mayor efecto tuvo fue de 3×10^7 ufc ml^{-1} y 1×10^7 ufc ml^{-1} . Para que la bacteria influya directamente en el rendimiento de la planta debe de interactuar con otros microorganismos nativos del suelo.

Palabras claves: *Azospirillum* sp., biofertilización, *C. chinense*, inoculación.

INTRODUCCIÓN

En las interacciones entre plantas y ciertos microorganismos promotores del desarrollo vegetal, la raíz desempeña un papel central por su capacidad para ser colonizada (Chiarine *et al.*, 1998; Jiang y Sato, 1994).

En los últimos años se ha visto un creciente interés en la bacteria del género *Azospirillum* por su posible contribución en el rendimiento de varios cereales (Kapulnik *et al.*, 1983). Inicialmente, los reportes sobre la asociación de *Azospirillum* se restringían únicamente a las Poaceae (Graminaceae), que poseen la ruta fotosintética C_4 ; sin embargo existen reportes

de asociaciones de este tipo de microorganismos con las raíces de plantas dicotiledóneas (Rao y Venkateswarlu, 1982).

Varias especies de microorganismos han sido utilizadas, en la práctica, para incrementar la producción de algunos cultivos, ya sea por su participación en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenos o por su capacidad para la fijación del nitrógeno atmosférico (Zhang *et al.*, 1996).

De hecho, se ha desarrollado una tecnología sencilla y económica para el establecimiento exitoso de leguminosas con una amplia variedad de cultivos. Esto incluye la práctica de la inoculación de *Rhizobium*

(Hubbell, 1986a), *Pseudomonas* (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2000), *Azospirillum* (Kapulnik *et al.*, 1985; Gowda y Watanabe, 1985) y de otros microorganismos en el suelo o en las semillas para la infección, nodulación y fijación de nitrógeno por la planta o para la promoción del desarrollo de algunos cultivos (Hubbell, 1986b).

Se ha demostrado que los cultivos puros de *Azospirillum sp.* producen auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas, hormonas que participan en el desarrollo vegetal (Kapulnik *et al.*, 1985). Por lo tanto, el género *Azospirillum* pudiera resultar benéfico para estimular el desarrollo vegetal (Schnak *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1984), el rendimiento de granos y semillas y producir tasas de fijación de nitrógeno en gramíneas de hasta 30 a 40 kg/ha/año (Okon, 1982).

La inoculación con *Azospirillum* a diferentes tiempos no tienen una influencia significativa en el rendimiento aéreo y radicular del sorgo; sin embargo, a diferentes dosis (1 y 3 ml) y concentraciones (de 10^4 a 10^8 ufc ml^{-1}) los resultados difieren (Hernandez *et al.*, 1996).

En nuestro estado existen grandes áreas destinadas al cultivo de chile y otros cultivos que no reciben fertilización adecuada y que pudieran beneficiarse con el empleo de estas bacterias. Por esto, en el presente trabajo se determinó el efecto de la inoculación de *Azospirillum sp.* en la germinación de semillas, en el desarrollo de la raíz y de las plántulas de *C. chinense*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y purificación de *Azospirillum*.

Para el aislamiento de *Azospirillum*, se cortaron segmentos de la raíz del pasto muul o tak' suuk (*Cenchrus echinatus*), de 1.0 a 1.5 cm de longitud. Los segmentos de raíz fueron lavados sucesivamente con agua de la llave para separar los residuos de suelo adheridos a estos; se esterilizaron mediante un lavado con solución desinfectante –cloro comercial- por 5 min; posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril por 5 min y luego con una solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 durante 5 min; finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril durante 5 min. Los lavados se efectuaron con agitación manual.

Después de lavados y esterilizados, los segmentos de raíz, se sembraron en tubos de ensayo con medio de cultivo NFB semisólido, cuya composición por litro fue: 0.05 g. de extracto de levadura; 0.5 g de K_2HPO_4 al 10%; 0.01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ al 0.1%; 0.002 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ al 1.0%; 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 10%; 0.1 g de

$NaCl \cdot 2H_2O$ al 1%; Azul de Bromotimol al 0.5% -en solución alcohólica-; 2 g de ácido málico y 2.33 g de Agar bacteriológico (para preparar el medio NFB sólido, se utilizan las mismas concentraciones, se agrega 1 g de $(NH_4)_2 SO_4$ y se varía la cantidad de Agar bacteriológico de 2.33 g/L a 18.0 g/L), al final se incubó a 35°C por 24-48 h.

Para la purificación de la cepa aislada de *Azospirillum sp.* se prepararon 4 cajas de Petri con medio de cultivo NFB sólido, de los tubos de ensayo positivos, se tomaron muestras de *Azospirillum sp.* con un asa (previamente esterilizada) y se distribuyeron en estrias, para que las colonias quedaran uniformemente distribuidas. Las cajas de Petri fueron incubadas a 35°C de 24-48 h, dependiendo del crecimiento.

Después de purificar las cepas de *Azospirillum*, se registró su reacción a la tinción de Gram así como las características morfológicas básicas para tomarlas como criterio de discriminación en las pruebas de inoculación posteriores, según lo recomendado por Tarrand, Kreg y Döbereiner (1978) para el género.

Preparación del inóculo.

Para el crecimiento de *Azospirillum sp.* en las condiciones adecuadas en el laboratorio, se preparó en primer lugar el inóculo, siguiendo los pasos que se enumeran a continuación: a) en un matraz de Erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo NFB líquido se añaden 2-3 asadas de la bacteria que creció en la caja de Petri (este paso se realiza en condiciones estériles); luego, b) el matraz se coloca en un orbitador para mantenerlo en agitación. La agitación se realiza a 35 °C durante 24 h a 180 rpm.

Inoculación de las semillas.

Primer experimento. Antes de la inoculación, las semillas fueron esterilizadas con etanol al 1% y cloro comercial al 10%, por 3 y 4 min., respectivamente, y se lavaron con abundante agua estéril. Para realizar la inoculación se tomó un matraz de Erlenmeyer con el cultivo desarrollado (de 6 a 8 h de crecimiento, y aproximadamente 10^7 ufc ml^{-1}) y en ellas se colocaron 100 semillas, previamente esterilizadas, durante 10 min para permitir que se dé la imbibición de la semilla y el establecimiento de la bacteria (tratamiento 1).

Se realizó un control (tratamiento 2) en el que la imbibición de las 100 semillas se dio únicamente con agua. Para evaluar sólo el efecto de *Azospirillum sp.* en la germinación de las semillas y eliminar el efecto del medio de cultivo, se colocó de igual manera otro grupo de 100 semillas en imbibición solamente con el medio

líquido (tratamiento 3) durante el mismo tiempo que los otros dos tratamientos.

Efecto de la inoculación en la capacidad de germinación de las semillas.

Para determinar el efecto de la inoculación se colocaron grupos de 25 semillas de *C. chinense* en placas de Petri (con un total cuatro cajas para cada tratamiento) sobre dos capas de papel filtro húmedo y se conservaron a 28 – 30 °C en la oscuridad. Se consideró que la semilla había germinado cuando se rompió la testa.

Efecto de la inoculación en el desarrollo de la raíz y de la planta.

Segundo experimento. Para medir el efecto de la inoculación en el desarrollo de la planta, se utilizaron bolsas de plástico de 1.5 kg con suelo estéril y no estéril (tomado de un mismo sitio) y a diferentes dosis de inóculo (1, 3 y 6 ml); el inóculo se tomó de los cultivos desarrollados en matraces Erlenmeyer, de 6 a 8 h de crecimiento y concentración aproximada de 10^7 ufc ml⁻¹. En este experimento se utilizó un control sin inóculo.

El suelo se tomó de los primeros 15 cm de profundidad, siendo del tipo Kaan Kab (Luvisol) o tierra roja. La tierra se esterilizó por flujo de vapor durante 4 h por tres días consecutivos.

Para el experimento se tomaron semillas de *C. chinense* y se germinaron en cajas de Petri con agua destilada y se conservaron a temperatura ambiente. Después de 24 h, las semillas se sembraron en bandejas, lo que permitió que las plántulas se desarrollaran hasta alcanzar 5 cm de altura (15 días después de su germinación). Las plántulas se transplantaron a las bolsas de plástico con el suelo correspondiente.

Los parámetros a medir fueron las ramificaciones secundarias y terciarias de la raíz, el peso seco de la parte radicular y la parte aérea (esta última comprende toda la planta, excepto la parte radicular). La medición de los parámetros se realizó a los 35 días del experimento.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Statgraphics Plus para Windows 4.1. Se empleó el análisis de varianza para un diseño bifactorial de efectos fijos para determinar efectos significativos de la tierra (estéril y no estéril) y la concentración del inóculo (0, 1, 3 y 6 ml) sobre cada uno de los parámetros. Cabe señalar que los parámetros ramificaciones secundarias y terciarias de la raíz

fueron transformadas con raíz cuadrada para dicho análisis. Los ocho tratamientos fueron A: tierra no estéril sin inóculo (control); B: Tierra no estéril con inóculo de 1 ml; C: Tierra no estéril con inóculo de 3 ml; D: Tierra no estéril con inóculo de 6 ml; E: Tierra estéril sin inóculo; F: Tierra estéril con inóculo de 1 ml; G: Tierra estéril con inóculo de 3 ml y H: Tierra estéril con inóculo de 6 ml. Para determinar que tratamientos difieren con el control se realizó la comparación múltiple de Dunnett (Montgomery, 1997; Zar, 1999).

RESULTADOS

Entre 24-48 h de incubación se observó, en los tubos de aislamiento, una zona de crecimiento a manera de una fina película blanquesina por debajo de la superficie del medio líquido, indicando la preferencia por las condiciones microaerofílicas de *Azospirillum*. Posteriormente se obtuvieron cultivos axénicos a partir de los cuales se determinaron sus características morfológicas: la forma de coma (por medio de la tinción de gram) y de la observación en vivo de movimiento vibratorio y oscilatorio de los espirilos.

Efecto de *Azospirillum* en la capacidad germinativa de semillas de *C. chinense*.

Los resultados sobre la capacidad de germinación de las semillas mostraron que los tres tratamientos siguen la misma cinética (Cuadro 1). No aumentó ni disminuyó la capacidad de germinación de las semillas; sin embargo, la inoculación con *Azospirillum* sp. aceleró en un día, el proceso de germinación. En el caso del tratamiento con el medio de cultivo la capacidad de germinación de la semilla inoculada fue similar a la del control.

Al comparar la germinación acumulada de cada uno de los tratamientos se observa que el tratamiento con *Azospirillum* sp. aceleró la germinación.

Cuadro 1. Germinación de semillas de *C. chinense* del día 5 al 14 del período experimental

Tratamiento/día	Semillas germinadas ¹													
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total			
Agua	0	2	6	9	17	15	13	9	2	0	73			
<i>Azospirillum</i> ²	5	11	9	16	16	10	2	3	2	1	75			
Medio	0	0	4	15	13	12	16	8	2	2	72			

¹Valores corresponden a número total de semillas germinadas en 3 de lotes de 25 semillas c/u en el día señalado.

²El inóculo de *Azospirillum* se tomó de un cultivo de 6 a 8 h de crecimiento y aproximadamente 10^7 ufc ml⁻¹.

Efecto de la inoculación en plántulas de *C. chinense*

El efecto de la interacción entre la inoculación en diferentes concentraciones y en los dos diferentes tipos de suelo (estéril y no estéril) tuvo un efecto en la radiculación (número de raíces secundarias ($P<0.001$) y terciarias ($P<0.0001$) así, como en la acumulación de materia seca aérea ($P<0.0001$) y radicular ($P<0.0001$).

Se observó una diferencia entre los dos tipos de suelo. El suelo esterilizado mostró poco o lento desarrollo de la plántula de chile comparado con el del suelo no esterilizado, donde el crecimiento fue mayor (Figura 1).

En el desarrollo radicular, los datos del cuadro 2 y la figura 2 muestran las diferencias que se obtuvieron entre suelo esterilizado y no esterilizado a diferentes concentraciones, donde las plántulas crecidas en suelo no esterilizado desarrollaron mayor número de raíces secundarias y terciarias que las de suelo esterilizado ($P<0.01$).

La diferencia ($P<0.01$) entre concentraciones muestran que el inóculo con mejor resultado fue el de 3 ml. seguido por el de 1ml., con suelo no estéril (tratamiento C y B respectivamente) contra el control (tratamiento A), Cuadro 2.



Figura 1. Influencia de la inoculación del *Azospirillum sp.* en las plantas de *C. chinense*. A: Tierra no estéril (NE) sin inóculo –Control-; B: (NE) y 1 ml; C: (NE) y 3 ml; D: (NE) y 6 ml; E: estéril (E) y 0 ml; F: (E) y 1 ml; G: (E) y 3 ml; y H: (E) y 6 ml.

Cuadro 2. Efecto de la inoculación de *Azospirillum sp.* en la radiculación, en el peso de plántulas de Chile Habanero (*C. chinense*) a los 35 días de la inoculación.

Tratamientos	Peso Aéreo seco (g/planta)	Peso Radical seco (g/planta)	Número de raíces secundarias	Número de raíces terciarias	
Control (A)	0.108	0.032	4.112	3.949	
(NE)	B	0.307 *	0.043*	6.054*	6.206*
	C	0.342*	0.066*	7.589*	8.979*
	D	0.303*	0.080*	6.136*	6.271*
	E	0.053*	0.009*	2.504*	2.698*
(E)	F	0.069*	0.031	4.162	3.782
	G	0.066*	0.036	4.542	3.990
	H	0.055*	0.017*	3.693	3.589

*Medias que difieren significativamente del control con $\alpha = 0.01$ (prueba de Dunnett).

A: Control; B: inóculo de 1 ml; C: 3 ml; D: 6ml; E: 0 ml; F: 1 ml; G: 3 ml; y H: 6 ml. (NE): Tierra no estéril; (E): Estéril

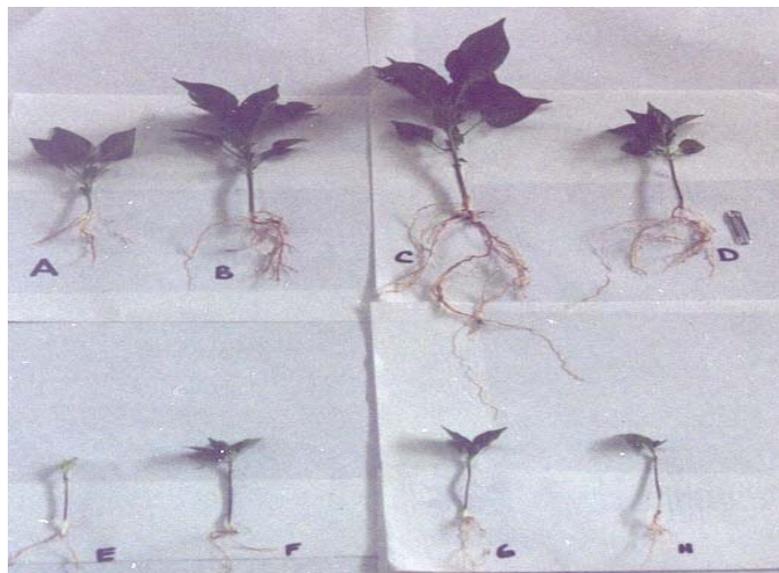


Figura 2. Efecto de la inoculación del *Azospirillum sp.* en la radicación de la planta. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: A,B,C,D,E,F,G,H.

DISCUSIÓN

En los tubos que contenían las raíces lavadas en el medio semisólido libre de nitrógeno se observó una película densa y blanca a unos milímetros por debajo de la superficie. Este comportamiento ha sido atribuido a la necesidad del microorganismo de migrar hacia una región donde la difusión del oxígeno se encuentre en una proporción adecuada para la respiración bacteriana y que no inhiba la fijación de nitrógeno. Por lo tanto las características observadas del aislamiento de *Azospirillum* concordaron con lo reportado por Döbereiner y Day, 1976, Hernández *et al.*, 1994, Hernández y Sarmiento, 1994 y Becking, 1963.

Si bien es cierto que hay diferentes métodos para inocular bacterias fijadoras de nitrógeno (caldos, inoculantes en soportes y liofilizados bacterianos en cápsulas de alginato), cada una depende de las condiciones en las que se les aplique (García y Sarmiento, 2000). La inoculación de la semilla no mostró grandes diferencias con respecto al control al comparar el total de semillas germinadas al día 14 (cuadro 1).

La falta de algún soporte para la inoculación con *Azospirillum sp.*, pudo ser la causa de que el número total de semillas germinadas no mostrara grandes diferencias entre los tres tratamientos. Dutto y Labandera (1994) indican que la forma de inoculación

podría ser uno de los factores que afectan la inconsistencia de las respuestas.

Respecto al segundo experimento, la inoculación fue realizada después de los 15 días de ser transplantada, ya que la colonización bacteriana es alta en esta etapa en la raíz, lo cual ha sido reportado en otros trabajos (Bashan y Levanony, 1990), y esto es porque el desarrollo radical permite la presencia de exudados, los cuales son la principal fuente de carbono para los microorganismos.

Como se observa en los cuadros y figuras, la inoculación a diferentes concentraciones tuvo un efecto significativo en el incremento del número de raíces secundarias y terciarias, así como en el peso seco radicular y aéreo. Esta respuesta, pudo ser efecto de la producción hormonal de la bacteria. Sin embargo, al incrementar más aún la dosis (6 ml) el comportamiento fue similar al de 1 ml., lo cual indica que solo con pequeñas dosis se pueden obtener estos efectos (Okon, 1982).

Lo anterior puede ser explicado por el hecho de que en el suelo no estéril los microorganismos nativos interfieren con la colonización de la bacteria (Okon, 1982), sin embargo, también se ha observado que los microorganismos nativos pueden ayudar al establecimiento de *Azospirillum* en las raíces de la plántula, en este caso fue más evidente al compararlas con las de suelo estéril. *Azospirillum* es conocido ampliamente por su capacidad para promover el

desarrollo de plántulas; pero los mecanismos involucrados en este proceso aún no se conocen plenamente (Carrillo-Castañeda *et al.*, 2000).

En el suelo estéril se encontró que las dosis de *Azospirillum* no tuvieron grandes efectos como los encontrados en el suelo no estéril; Hernández *et al.*, (1997) reportaron que una sobredosis de bacteria podría provocar un efecto inhibitorio en la planta, ya que en el suelo estéril no se encuentran otros microorganismos que interactúen con *Azospirillum* lo que permite que la producción de hormonas se acumule provocando un efecto depresivo en la plántula (Hernández *et al.*, 1996). Sin embargo, cabe señalar que en este estudio solamente se evaluó el efecto de *Azospirillum* durante el primer mes de desarrollo, por lo que las conclusiones que se enuncian se basan en este hecho.

Se sugiere que los experimentos continúen, en condiciones de campo, durante el desarrollo de las plántulas para medir los efectos en el inicio de la floración y en el número y peso de los frutos; además se valore la respuesta con diferentes tipos de suelo y se considere, previamente, la concentración de nitrógeno en los mismos.

CONCLUSIONES

Azospirillum no tuvo respuesta visible en la capacidad de germinación en semillas de *C. chinense*.

Las plántulas, en los tratamientos con suelo no estéril, y concentraciones de inoculo de 3×10^7 y 1×10^7 ufc ml^{-1} , presentaron incrementos en el peso seco aéreo y radicular y en el número de raíces.

REFERENCIAS

- Bashan, Y., y H. Levanony. 1990. Current Status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology 36: 591-599.
- Becking, J. H. 1963. Fixation of molecular nitrogen by an aerobic *Vibrio* or *Spirillum*. Journal of Microbiology and Serology. 29: 326.
- Carrillo-Castañeda, G., Juárez, J., Ruiz, D. y R. Müller. 2000. Aumento del Rendimiento de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. Biotecnología Aplicada. 17: 171-176.
- Chiarine, L., Bevivino, A., Yabacchioni, S. y Dalmastrí, C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp on *Sorghum bicolor*: root colonization and growth promotion of dual strain inocula. Soil Biology and Biochemistry. 30: 81-87.
- Döbereiner, J. y J. M. Day. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Symposium on nitrogen fixation. Edited by W. E. Newton and J. Nymans. Washington State Univ. Press. Pullman, W.A. pp.518-538.
- Dutto, P. y C. Labandera. 1994. Aplicaciones Agronómicas de *Azospirillum*, un Enfoque. Revista Latinoamericana de Rizobiología. Habana Cuba. Pp 104-108.
- García, O.A. y M. Sarmiento. 2000. Nota sobre la viabilidad de *Azospirillum brasilense* en turba como soporte y en semillas de gramíneas inoculadas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 34: 359-362.
- Gowda T.K.S. y I. Watanabe. 1985. Hydrogen-supported N_2 fixation of *Pseudomonas* sp. and *Azospirillum lipoferum* under free-living conditions and in association with rice seedlings. Canadian Journal of Microbiology. 31: 317-321.
- Hernández, Y., Sistachs, E., Cruz, A.M. y M. Sarmiento. 1994. Estudio preliminar de la presencia de *Azospirillum* sp. en pastos. Cuban Journal of Agricultural Science. 24: 329-333.
- Hernández, Y., Sarmiento, M. y O. García. 1996. Influence of *Azospirillum* inoculation model on grass performance. Cuban Journal of Agricultural Science. 30: 219-226.
- Hernández, Y., Sogo, J. y M. Sarmiento. 1997. *Azospirillum* inoculation on *Zea Mays*. Cuban Journal of Agricultural Science. 31: 203-209.
- Hernández, Y. y M. Sarmiento. 1994. Effect of fertilization and *Azospirillum* inoculation on *Panicum maximum* sown in red and yellow ferrallitic soils. Cuban Journal of Agricultural Science. 31: 211-216.
- Hubbell, D. H. 1986a. Producción y uso de inoculantes. CEIBA, 27 (1): 17-22.

- Hubbell, D. H. 1986b. Proceso de infección de leguminosas por *Rhizobium*. CEIBA, 27 (1): 5-16.
- Jiang, H.Y. y Sato, K. 1994 Interrelationship between bacterial population on the root surface wheat and growth of plant. Soil Science and Plant Nutrition. 40: 683-689.
- Kapulnik Y., Sarig S, Nur Y y Okon Y. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field grown wheat. Canadian Journal of Microbiology. 29: 895-899.
- Kapulnik Y., Felman M., Okon Y. y Y. Henis. 1985. Contribution of Nitrogen Fixed by *Azospirillum* to the N Nutrition of Spring Wheat in Israel. Soil Biology and Biochemistry. 17: 509-515.
- Montgomery, D.C. 1997. Design and Analysis of Experiments. 4th Ed. John Wiley. New York.. Pp 704.
- Okon, Y. 1982. Recent Progress in research on biological nitrogen fixation with non leguminous crops. Phosphorous and Agriculture. 82: 3-8.
- Rao, A.V. y B. Venkateswarlu. 1982. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. Canadian Journal of Microbiology. 28: 778-782.
- Schnak, S. C. Weier, K.L. y I. C. Macroe. 1981. Plant yield and nitrogen content of a *Digitaria* grass in response to *Azospirillum* inoculation. Applied and Environmental Microbiology. 91: 342-349.
- Smith, R.L., Scahank, S.C., Milan, J.R. y A.A. Baltensperger. 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology. 47: 1331-1338.
- Tarrand, J.J., Krieg, N. R. y J. Dobereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology. 24: 967-980.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. 4th Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey. Pp 663.
- Zhang F., Narges D., Hynes R.K. y D.L. Smith. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* L. Merr) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. Annals of Botany. 77: 453-459.

Submitted December 10, 2003 – Accepted April 27, 2004