

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Respuesta Fisiológica de Semillas de Coliflor (*Brassica oleracea* L.) Aplicando Cepas de *Azospirillum* sp. en Laboratorio e Invernadero

Por:

OSCAR AYALA SALDAÑA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.

Abril 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Respuesta Fisiológica en Semillas de Coliflor (*Brassica oleracea* L.) Aplicando Cepas de *Azospirillum* sp. en Laboratorio e Invernadero

Por:

OSCAR AYALA SALDAÑA

TESIS

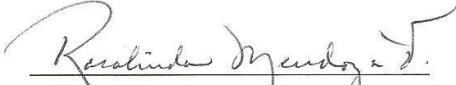
Presenta como requisito parcial para obtener el título de:


INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada


M.P. María Alejandra Torres Tapia

Asesor Principal


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Coasesor


Dr. Víctor Manuel Zamora Villa
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Abril 2014

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar hasta ahora, por ser mi fortaleza cada día que pasa, por prestarme salud, bienestar y sobre todo por permitirme disfrutar de este gran logro al lado de los seres que más aprecio en esta vida.

A los seres que más amo en este mundo, mis padres:

José Ayala Negrete y Ma. Candelaria Saldaña Sandoval

A ellos que me han brindado todo su cariño y afecto a lo largo de mi vida.

Por haberme llevado por el buen camino mostrándome lo bueno y lo malo de la vida, por el gran sacrificio que han realizado al apoyarme a lo largo de todo este tiempo, ya que sin su apoyo esto no sería posible. Muchas Gracias.

A mis hermanos:

Marco Antonio José Juan Fabiola Edgar e Iván

Con quienes he vivido experiencias inolvidables, porque siempre me brindaron su apoyo, cariño y comprensión, sobre todo por sus palabras de aliento y por motivarme a salir avante en todo momento. A mis sobrinos: Ana Arely, Esteban y J. Ángel.

A mis abuelos y tíos:

Que siempre me han apoyado de una u otra manera, sobre todo por sus consejos, que me han servido para ir por el buen camino de la vida.

A mis primos:

Con quienes he pasado buenos y malos ratos; Juan (mi compa), Raymundo, Refugio (el cuco), Irene y Eustaquio junto con su hijo E. Julián, Rigoberto, Jorge, Jaime, Eduardo, Elías, Noé, Martín, Francisco (el gordo) entre otros, son ellos que han formado parte de mi vida y con los que he pasado momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi alma terra mater, por haber contribuido en mi formación profesional.

A la M. P. María Alejandra Torres Tapia, por haberme brindarme su tiempo, apoyo y paciencia, sobre todo por los conocimientos adquiridos durante la elaboración de este trabajo de tesis.

Al Dr. Víctor Manuel Zamora Villa, por su colaboración con la elaboración de este trabajo.

A la Dr. Rosalinda Mendoza Villareal, por haber contribuido aportando las cepas de *Azospirillum sp.* para llevar a cabo este trabajo, y de igual manera contribuyendo en la revisión de este trabajo

Al Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo y al M. C. Víctor Manuel Villanueva Coronado por haberme brindado su amistad y apoyo.

A cada uno de los profesores, quienes contribuyeron con un granito de arena en mi formación profesional dentro y fuera de las aulas, a todos ellos que me brindaron sus conocimientos y experiencias.

A mis amigos en la UAAAN, a ellos que fueron compañeros y amigos a lo largo de mi estancia en la Universidad, Luis Enrique (el chivo), Abraham, Erick y los jóvenes del 424; a mis compañeros y amigos de la carrera, José Luis, José Antonio, Ansony, José Leonardo, gracias por haberme brindado su amistad en todo este tiempo.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo General.....	2
1.2 Hipótesis.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Origen del cultivo de Coliflor.....	3
2.2 Importancia y producción de coliflor.....	4
2.3 Variedades de coliflor.....	4
2.4 Características botánicas.....	5
2.5 Requerimientos agroecológicos del cultivo.....	6
2.6 Producción de semillas.....	7
2.7 Bacterias del género <i>Azospirillum sp.</i>	8
2.7.1 Generalidades del género <i>Azospirillum sp.</i>	10
2.7.2 Características fisiológicas del género <i>Azospirillum sp.</i>	10
2.7.3 Biología del género <i>Azospirillum sp.</i>	11
2.7.4 Metabolismo del género <i>Azospirillum sp.</i>	11
2.7.5 Aislamiento.....	12
2.7.6 Identificación.....	12
2.8 Colonización de raíces.....	13
2.9 Asociación planta-bacteria.....	13
2.10 Efectos de <i>Azospirillum sp.</i> en la planta.....	14
2.11 Tratamiento en semillas.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Ubicación del área experimental.....	17
3.2 Material genético.....	17
3.3 Tratamientos.....	18
3.4 Metodología.....	18
3.4.1 Etapa: Laboratorio.....	18
3.4.2 Etapa: Invernadero.....	18

3.5 Variables Evaluadas.....	19
3.5.1 Etapa: Laboratorio.....	19
3.5.2 Etapa: Invernadero.....	20
3.6 Diseño experimental.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Etapa: Laboratorio	22
4.1.1 Capacidad de germinación	22
4.1.2 Vigor	27
4.2 Etapa: Invernadero	35
4.2.1 Capacidad de germinación	35
4.2.2 Vigor	40
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. LITERATURA CITADA.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

No. de Cuadro		Pagina
2.1	Principales productores de coliflor en México, 2008-2012.....	4
3.1	Identificación de tratamientos en el estudio.....	18
4.1	Cuadrados medios y significancia en la prueba de capacidad de germinación en semillas de Coliflor tratadas con cepas de <i>Azospirillum sp.</i> de origen de Chile y Nopal en laboratorio, 2013.....	22
4.2	Comparación de medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	23
4.3	Comparación de medias entre concentraciones de <i>Azospirillum sp.</i> en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	24
4.4	Cuadrados medios y significancia en la prueba de vigor en semillas de Coliflor tratadas con cepas de <i>Azospirillum sp.</i> de origen de Chile y Nopal en laboratorio, 2013.....	28
4.5	Comparación de medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> en las pruebas de vigor en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	29
4.6	Comparación de medias entre concentraciones de cepas <i>Azospirillum sp.</i> en vigor en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	30
4.7	Cuadrados medios y significancia en la prueba de capacidad de germinación en semillas de Coliflor tratadas con cepas de <i>Azospirillum sp.</i> de origen de Chile y nopal en invernadero, 2013.....	36
4.8	Comparación de medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en	

	invernadero, 2013.....	36
4.9	Comparación de medias entre Concentraciones de <i>Azospirillum sp.</i> en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.	37
4.10	Cuadrados medios y significancia en la prueba de vigor en semillas de Coliflor tratadas con cepas de <i>Azospirillum sp.</i> de origen de Chile y Nopal en invernadero, 2013.....	41
4.11	Comparación de medias entre Concentraciones de <i>Azospirillum sp.</i> en vigor en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura		Pagina
3.1	Ubicación del área experimental; laboratorio e invernadero. (Google Maps).....	17
4.1	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PN en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	25
4.2	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PA en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	26
4.3	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable SSG en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	27
4.4	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en el vigor en la variable IVE en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	32
4.5	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en el vigor en la variable PC en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	32
4.6	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en el vigor en la variable LMH en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	33
4.7	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en el vigor en la variable LMR en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	34
4.8	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en el vigor en la variable PS en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.....	35
4.9	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PN en	

	semillas de Coliflor en invernadero, 2013.....	38
4.10	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PA en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.....	39
4.11	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable SSG en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.....	40
4.12	Medias entre cepas de <i>Azospirillum sp.</i> y concentraciones en vigor en la variable IVE en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.....	42

RESUMEN

En los últimos años, se han buscado en la producción de cultivos sistemas sustentables y orgánicos para reducir de alguna forma las aplicaciones de fertilizantes químicos, resultando conveniente el uso de bacterias benéficas que puedan sustituir la acción de estos productos de forma natural. Se planteó determinar el efecto en la capacidad de germinación (CG) y vigor de la semilla de coliflor (*Brassica oleracea L.*) aplicando cepas de *Azospirillum sp.* bajo dos condiciones laboratorio e invernadero; utilizando semillas de coliflor variedad Snowball, inoculando cepas originarias de Chile y Nopal a concentraciones de 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC/mL y un testigo con agua (0 UFC/mL) en tres repeticiones por tratamiento, determinando la capacidad de germinación (PN, PA y SSG) y vigor (IVE, PC, LMH, LMR y PS) de la semilla; analizando bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial; no se encontraron diferencias significativas en CG entre las condiciones, las cepas y las concentraciones; pero en laboratorio, numéricamente el testigo tuvo el mayor valor en PN seguido de la cepa de origen de Chile (82.5 %), PA (8.3 %); mientras que en el vigor, existió diferencia significativa entre concentraciones siendo superior el testigo en IVE (11.87 plántulas/día), PC (85 %), LMR (5.20 cm), seguido de la cepa de origen de Chile a 10^6 UFC/mL en IVE (11.55 plántulas/día), LMR (4.18 cm). En invernadero, la cepa de origen de Nopal en CG, resultó numéricamente mejor en PN (74.9 %) en una concentración de 10^4 UFC/mL obteniendo hasta 79.2 % de PN y 15 % de SSG; mientras que en el vigor, las cepas y las concentraciones tuvieron diferencias significativas donde la cepa de origen de Nopal a 10^4 UFC/mL tuvo hasta 12.9 plántulas/día en IVE. La aplicación de *Azospirillum sp.* de origen de Chile y Nopal tiene efectos estadísticos en el vigor de la semilla en laboratorio, sobresaliendo la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile, a una concentración 10^6 UFC/mL en PN, IVE, PC, LMH y LMR y a 10^4 UFC/mL en

PA y a 10^8 UFC/mL en SSG y PS. En invernadero la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal tiene efectos positivos en IVE a una concentración de 10^4 UFC/mL en PN e IVE y a 10^6 UFC/mL en PA y a 10^8 UFC/mL en SSG.

Se concluye que el *Azospirillum* de raíces de chile a 10^6 UFC/mL tiene mayor influencia en la germinación y vigor de la semilla de coliflor y en 10^4 UFC/mL el *Azospirillum* de raíces de nopal la germinación.

Palabras clave: *Brassica oleracea L.*, *Azospirillum sp.*, germinación, vigor.

I. INTRODUCCIÓN

La coliflor es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial. Estas plantas se cultivan anualmente por sus pellas, que se consumen principalmente como verduras o en ensaladas, en forma cruda, cocida, en encurtidos o industrializadas.

La necesidad de sustituir la agricultura convencional a base de agroquímicos por una agricultura sostenible menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevos productos que sean biotecnológicamente viables con un impacto mínimo para el ecosistema y para la salud humana, permitiendo aumentar la calidad nutricional y rendimientos de los cultivos dentro de tecnologías más amigables con la naturaleza.

Una alternativa viable que contribuye favorablemente con este propósito es el uso de los biofertilizantes, los cuales recuperan la fertilidad y productividad del suelo y permiten darle a las plantas los nutrimentos necesarios para su crecimiento contribuyendo en este sentido a mejorar la calidad de los cultivos para su producción agrícola.

Por lo tanto en este sentido, una alternativa es la inoculación de microorganismos fijadores de nitrógeno, como es el caso de las bacterias del genero *Azospirillum sp.* que promueve el desarrollo vegetativo de la planta.

La importancia de la inoculación con *Azospirillum sp.* es la de fijar N_2 por medio de la enzima nitrogenasa para que esté disponible en forma de amoniaco o nitrato, de tal manera que la planta lo asimile de manera más fácil. Además se ha demostrado que la bacteria del genero *Azospirillum sp.* producen auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas, hormonas que participan en el desarrollo vegetal.

1.1 Objetivo General

Determinar el efecto en la germinación y el vigor de la semilla de coliflor (*Brassica oleracea L.*) aplicando cepas de *Azospirillum sp.* de origen de Chile y Nopal bajo condiciones de laboratorio e invernadero.

1.2 Hipótesis

Al inocular la semilla de coliflor (*Brassica oleracea L.*) con *Azospirillum* de alguna cepa de las estudiadas se generará un efecto positivo en la germinación y vigor de esta semilla, bajo las condiciones de laboratorio e invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen del cultivo de Coliflor

El origen de la coliflor está ligado al mar Mediterráneo, concretamente a su vertiente oriental, donde se encuentran Asia Menor, Líbano y Siria como referentes históricos de esta verdura. Existen hipótesis que la asocian a una única especie proveniente de la forma silvestre, introducida al Mediterráneo.

En un principio era utilizada simplemente como fármaco natural para aliviar los dolores de cabeza o la diarrea. Serían los romanos quienes comenzaron a cultivarla para su producción, comercialización y consumo.

Clasificación Botánica

Según Nuez *et al.*, (1999); la clasificación taxonómica de la coliflor es:

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliopyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Sub. Clase:	<i>Dilleniidae</i>
Orden:	<i>Capparales</i>
Familia:	<i>Brassicaceae</i>
Género:	<i>Brassica</i>
Especie:	<i>oleracea</i>
Variedad:	Botrytis L.

2.2 Importancia y producción de coliflor

La coliflor es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial. Se cultiva anualmente, se consume principalmente como verdura o en ensalada; puede utilizarse cruda, cocida, en encurtidos o industrializada. En México en el 2002 se produjeron 200,000 toneladas, China es el país que más produce (6, 389,118 toneladas) y Portugal el menor productor (35, 000 toneladas).

De acuerdo a los datos de SAGARPA en el resumen nacional por delegación, hasta marzo del año 2014 en el cultivo de coliflor, incluyendo la producción de riego y temporal, los estados con mayor producción son: Puebla, Hidalgo, Michoacán, Guanajuato y Aguascalientes, y en los últimos años el estado que tuvo las más alta producción fue Hidalgo, destacándose en tres años consecutivo (2009, 2010 y 2011), con producciones que van desde las 15 mil hasta más de 25 mil toneladas.

Cuadro 2.1 Principales productores de coliflor en México, 2008-2012.

Estado	Año 2008 (ton)	Año 2009 (ton)	Año 2010 (ton)	Año 2011 (ton)	Año 2012 (ton)
Puebla	13,398.00	13,687.56	13,645.95	13,600.99	13, 693.98
Hidalgo	12.670.00	25,243.00	19,882.00	15,066.00	13,398.90
Michoacán	7,448.00	7,201.00	9,451.77	9,612.00	9,994.90
Guanajuato	13,719.50	19,232.75	14,757.20	11,282.00	7,607.40
Aguascalientes	7,501.00	4,822.00	5,846.00	7,419.00	6.066.50

Ciclo: Cíclicos y Perennes 2008-2012, Modalidad: Riego + Temporal. Producción en toneladas (SIAP), 2014.

2.3 Variedades de coliflor

Según los requerimientos térmicos para la formación de la pella se reconoce la existencia de tres clases de coliflores (Krarup y Moreira, 1998):

Coliflores tropicales. Aquellas capaces de producir pellas de ápices vegetativos, de calidad aceptable, en condiciones de temperatura superior a 20°C. Son selecciones hechas con períodos prolongados de altas temperaturas, como por ejemplo, el cultivar 'Tropical 55' y sus híbridos.

Coliflores vernalizantes. Aquellas que requieren un período de bajas temperaturas para producir pellas constituidas por flores propiamente dichas (ápices reproductivos). Estas son selecciones típicas de los países del norte de Europa, como por ejemplo el cv. 'Walche-ren Winter' y sus derivados, así como el cv. 'Gigante de Nápoles'.

Coliflores no vernalizantes. Aquellas capaces de producir pellas constituidas por ápices vegetativos, de alta calidad, con temperaturas de 14 a 20°C propias de zonas o épocas templadas. En esta clase se encuentra el mayor número de cultivares de polinización abierta y de híbridos obtenidos en la variedad. Los cultivares más tradicionales de este tipo son 'Erfurt', 'Snowball' y sus selecciones, 'Suprimax' y 'Matra'. En los últimos años se ha ido incrementado el uso de híbridos como 'Arfak', 'Guardian', 'Incline' y 'Serrano'.

2.4 Características botánicas

Limongelli (1979), expresa que la coliflor es una planta herbácea, anual o perenne y presenta las siguientes características:

Raíz. El sistema radical, como el de todas la *brassicas* es reducido, con una raíz pivotante de cerca 50 cm. de largo y raíces laterales relativamente pequeñas, provistas de numerosos pelos radicales (Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, 2001).

Tallo. El tallo es corto, grueso y breve.

Hojas. Las hojas de la coliflor son grandes, de 40 a 50 cm. de largo, por unos 20 cm. de ancho, con pecíolos cortos y gruesos, el limbo es de color verde azulado y con nervaduras gruesas.

Pellas. Según la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal (2001); la pella corresponde a una masa voluminosa compacta, densa, apelmaza, esférica, de hasta 30 cm. de diámetro y generalmente color blanquecino. En términos botánicos estrictos, es un órgano pre-reproductivo en los cultivares precoces o tempranos y no es un estado floral como muchas veces se afirma.

Morfológicamente, la pella presenta una estructura de corimbo, que corresponde a un conglomerado de tallos pre-florales (cortos, gruesos y suculentos) y ápices vegetativos indiferenciados que se hacen suculentos. La superficie de la pella está dada por un sinnúmero de meristemas apicales descubiertos o desnudos. Estos se forman a partir de un proceso de sucesivas divisiones, ramificación e hipertrofia de la yema meristemática apical. Los tallos se componen de una delgada capa parénquima y tejido vascular que no llega a lignificarse. No es posible observar ningún botón floral diferenciado en este tipo de coliflores (Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, 2001).

Flores. Estas son hermafroditas, casi actinomorfas, con frecuencia en racimos o corimbos terminales. Presentan cuatro pétalos libres de diversos colores, en dos verticilos 7 dispuestos en cruz, seis estambres, anteras bilocadas, ovario súpero bicarpelar, estilo simple y estigma bilocado.

Frutos. Los frutos son secos, largos, de tipo silicua; dehiscente por dos valvas.

Semillas. Son pequeñas, de forma globular, con un número de 550 por gramo. Además poseen una capacidad germinativa de 5 a 8 años.

2.5 Requerimientos agroecológicos del cultivo

Clima

Requiere temperaturas moderadas y ambientes húmedos. La coliflor tolera condiciones más frías que el repollo, pero demanda siempre más humedad en el suelo (Guerrero, 1993).

Temperatura.

Este cultivo se desarrolla en una temperatura óptima de 12 a 18 °C, sin embargo Señala también una temperatura mínima de 10 °C y una máxima de 27°C (Gómez,1986).

Luminosidad

El cultivo requiere un promedio de 4 a 8 horas sol por día en cielo despejado (Gómez, 1986). Una luminosidad deficiente durante la formación de las pellas influye desfavorablemente en la calidad de las pellas. Por el contrario un exceso de luz, cuando las pellas están formadas y comienza su crecimiento, produce una coloración crema, en éstas que hace que se deprecien sensiblemente. En este sentido, se recomienda, en las variedades que no arrepollan bien, proteger las pellas de los rayos solares tapándolas con las hojas de las plantas, práctica útil, pero enormemente cara (Cotrina, 1981).

Precipitación

El cultivo prospera bien en zonas en las cuales la precipitación anual oscila entre los 800 y 1200 mm, pero con este cultivo al igual que el brócoli se puede efectuar dos veces al año, significa que cada ciclo de cultivo podría llevar a cabo con una disponibilidad entre 400 y 600 mm (Carvajal y Velez, 1996).

Suelos y altitud

Ecológicamente la coliflor se cultiva desde los 10 hasta los 3200 m. s. n. m., requiere suelos fértiles, con buen drenaje, alto contenido de materia orgánica y nitrógeno, con una profundidad de 50 a 60 cm, de textura franco o franco arenoso (Gómez, 1986).

Requiere un pH entre 5.5 y 6.5, es poco tolerante a la acidez y que puede crecer en un pH de 7.66, si no hay deficiencias de algún elemento esencial. La coliflor es propensa a demostrar deficiencias de boro cuando la reacción está cerca del punto neutral. En suelos con pH mayores a 7 puede manifestar deficiencias de magnesio, elemento que la coliflor requiere en grandes cantidades, en estos casos se recomiendan aplican magnesio soluble (Casseres, 1980).

2.6 Producción de semillas

En la producción comercial de semillas la calidad está determinada por un conjunto de atributos, donde la calidad genética, física, sanitaria y fisiológica juega un papel importante (Besnier, 1989; Copeland y McDonald, 1995). La calidad fisiológica

implica la integridad de la estructura y procesos fisiológicos, siendo los principales indicadores: la viabilidad, germinación y vigor, que dependen del genotipo (Perry, 1972; Moreno *et al.*, 1988). Entre los factores que pueden tener efecto en la calidad de la semilla están el grado de madurez y tiempo de maduración de la semilla después de la cosecha.

Los factores relacionados con la calidad física de la semilla son: contenido de humedad, peso por volumen y pureza, también se puede considerar el color, tamaño de semilla, peso de mil semillas y daño por hongos e insectos. Las semillas deben reunir ciertos estándares de calidad dependiendo de la especie para ser consideradas de buena calidad física (Moreno, 1996).

2.7 Bacterias del género *Azospirillum* sp.

La especie *Azospirillum*, fue descrita por primera vez en 1925 por Martinus Willem Beijerinck, este a su vez la denominó en un inicio como *Spirillum lipoferum*, luego de lo cual la bacteria permaneció en el olvido por varias décadas. Las observaciones de Peña y Döbereiner en 1973, inician la época moderna de este microorganismo.

Son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978). Esta bacteria puede ser de vida libre o asociada con las raíces de diversos cultivos de importancia agronómica (Dobbeleare *et al.*, 2001), son conocidas como Gram negativas del grupo de las protobacterias.

Clasificación Taxonómica del Género *Azospirillum* sp.

Según el manual de Bergey (1984)

Reino: Procaryote

División: Glacilicute

Clase: Scotobacteria

Familia: No existe

Género: *Azospirillum*

Especie: *A. Lipoferum* *A. Brasilense*

Distribución

Las bacterias del genero *Azospirillum* sp. muestran una muy amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Aun cuando son más abundantes en las regiones tropicales, también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas (De Coninck *et al.*, 1988; Döbereiner *et al.*, 1976; Haahtela *et al.*, 1981; Tyler *et al.*, 1979). En las regiones templadas del sur de Brasil, los Estados Unidos y Kenia la presencia de *Azospirillum* es menor al 10% en las muestras analizadas (Döbereiner *et al.*, 1976). El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*.

Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aun cuando a pH abajo de 5 se les encuentra en forma esporádica y no lográndose su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5 (Döbereiner *et al.*, 1976; Döbereiner, 1978; New and Kennedy, 1989). Un estudio en el que se evaluaron 23 tipos de suelos con características diferentes mostró que algunos factores abióticos tales como porcentaje de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno afectan positivamente la sobrevivencia de *A. brasilense* (Bashan *et al.*, 1995), en tanto que el tamaño de las partículas de arena y especialmente la alta concentración de

carbonato de calcio afectan negativamente la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas. No obstante, la sobrevivencia de *A. brasilense* en la rizosfera es independiente de la aridez del suelo.

2.7.1 Generalidades del género *Azospirillum sp.*

Características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral. Las células contienen cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Okon & Burris, 1976), observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes.

Las bacterias del género *Azospirillum sp.*, tienen la capacidad de producir auxinas, citoquininas y giberelinas en medios de cultivo. No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas, como el caso del Ácido Indol Acético (AIA), el cual induce al aumento de pelos radiculares, logrando una mayor captación de nutrientes.

En cultivos semisólidos y sólidos con más de 24 horas de incubación se presentan frecuentemente células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes. Una de las características fenotípicas más ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum sp.*, es el color rojo escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado del colorante rojo Congo (Rodríguez, 1982).

2.7.2 Características fisiológicas del género *Azospirillum sp.*

Las bacterias del género *Azospirillum sp.*, son eubacterias gram-negativas, de forma bacilar con un diámetro de (1,0 μm x 2,1-3,8 μm), su movilidad se debe a la presencia de material fibrilar creciendo en concentraciones bajas de oxígeno.

Son bacterias químio-organotróficas y pueden utilizar como fuente de carbono azúcares, alcoholes, sales de ácidos orgánicos y como fuente de nitrógeno pueden disponer de nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos (Holt, 1984).

2.7.3 Biología del género *Azospirillum sp.*

Forma de reproducción: División celular

Mecanismos de supervivencia: *Azospirillum sp.*, produce y acumula gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB), los cuales son empleados por la propia célula como fuentes de carbono y energía durante períodos de inanición e incluso son capaces de formar quistes en condiciones muy desfavorables (Laria, 2003).

Competencia: El crecimiento de este microorganismo en la rizósfera viene determinado fundamentalmente por la disponibilidad de sustratos que estén presentes en el medio rizosférico y que sean necesarios para su desarrollo. También diversas sustancias de origen vegetal y microbiano que estén presentes en la rizósfera pueden afectar el desarrollo de estas bacterias mediante efectos estimuladores e inhibidores. Se considera que los aminoácidos derivados de las plantas pueden estimular o reprimir la actividad de la enzima nitrogenasa en ciertas cepas de *Azospirillum sp.*

La riqueza en compuestos orgánicos en la espermósfera/rizósfera conduce a intensas actividades e interacciones microbianas. Algunos estudios indican que la quimiotaxis a los exudados de raíz es uno de los factores que influyen en la llegada de los microorganismos a la rizósfera (Schmidt, 1979).

2.7.4 Metabolismo del género *Azospirillum sp.*

Las especies de *Azospirillum sp.*, difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno. Estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos monosacáridos y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico y succínico y algunos aminoácidos (Hartmann & Burris, 1988). Para el uso de diferentes fuentes de carbono, tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen todas las enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de la vía de Entner-Doudoroff (Westby *et al.*, 1983). Tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H₂ y CO₂, proceso en el que participa la ribulosa-1,5-difosfatocarboxilasa (Tilak *et al.*, 1986).

Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que le permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. Como fuentes nitrogenadas, *Azospirillum sp.*, puede utilizar un amplio rango de sustratos como: amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, puede enquistar, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de β -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente carbonada (Bashan & Vazquez, 2000).

2.7.5 Aislamiento

El aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum sp.* resulta en lo general muy simple, ya que a partir de suelo rizosférico o de la superficie de las raíces (rizoplaneo) de numerosas plantas hospedadoras. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas.

También se ha aislado del interior 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).

Azospirillum ha sido aislado de la rizósfera de una gran variedad de plantas, incluyendo pastos forrajeros como *Poa pratensis L.* y *Festuca arundinacea Schribn* (Sundaram *et al.*, 1988).

2.7.6 Identificación

El género *Azospirillum sp.* pertenece a la subclase alfa de las protobacterias (Young, 1992), siendo *A. lipoferum* la especie tipo (Tarrand *et al.*, 1978).

El género *Azospirillum* presenta una morfología vibroide, pleomorfismo y movimiento en espiral. Posee un flagelo polar y corresponde a bacterias Gram negativas a Gram variables (Tarrand *et al.*, 1974).

2.8 Colonización de raíces

Azospirillum posee un flagelo polar que lo utiliza para desplazarse en medios líquidos, mediante el cual migra hacia las raíces y se adhiere a la superficie radicular. Bajo condiciones de medios sólidos se induce la expresión de múltiples flagelos laterales (Moens *et al.*, 1995), estas estructuras laterales en la colonización de las raíces, permitiendo a la bacteria adherirse a ellas.

El éxito colonizador de *Azospirillum* depende de un proceso indispensable llamado “quimiotaxis”. Este evento corresponde a una fuerte atracción entre estas bacterias con las raíces de las plantas a través de sus propios exudados radicales. Entre estos compuestos se encuentran: maltos, succinato y fructuosa (Alexandre y Zhulin, 2000).

2.9 Asociación planta-bacteria

Los sitios colonizados elegidos por estas bacterias corresponden a las áreas de elongación celular de las zonas radicales y a las bases de los pelos radicales (Kapulnik *et al.*, 1985).

Los responsables de una efectiva asociación entre planta-bacteria son las proteínas y polisacáridos de la membrana exterior de *Azospirillum sp.*, estos permiten una fuerte adhesión a las raíces de la planta inoculada (Burdman *et al.*, 2001).

La asociación de *Azospirillum sp.* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes (Michiels *et al.*, 1991). La primera consiste en una absorción 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; Michiels *et al.*, 1991).

La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum sp.* (Michiels *et al.*, 1991).

2.10 Efectos de *Azospirillum sp.* en la planta

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.*, 1985b). 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).

Las bacterias del genero *Azospirillum sp.* mejoran el crecimiento vegetal dada la producción y liberación de fitohormonas como auxinas, citocininas y giberelinas. Estas hormonas vegetales promoverán la capacidad de *Azospirillum sp.* como fijadora de nitrógeno (De Bashan *et al.*, 2007). La fitohormona más importante producida por *Azospirillum sp.* es la auxina ácido indol-3-acético (AIA).

Si la bacteria produce sustancias como auxinas, observa un decremento en la longitud de la raíz y un incremento en la formación de pelos radicales (Bashan y de Bashan, 2010). Dobbelaeres *et al.* (1999) demostraron que la inoculación de *A. brasilense* en semillas tienen un efecto pronunciado sobre el desarrollo y la morfología de raíces, a bajas concentraciones como 10^6 UFC ml⁻¹ es casi tan alta como para inducir la elongación de la raíz y fuertemente inhibida a altas concentraciones celulares (10^9 UFC ml⁻¹).

Las plantas presentan cambios morfológicos en las raíces, así como también una mejor absorción de minerales después de inocularse con *Azospirillum sp.*; estos cambios se atribuyen a la liberación de AIA de esta bacteria (Steenhodt y Vanderleyden, 2000).

La asociación de *Azospirillum*-planta da como resultado cambios importantes en diferentes parámetros del crecimiento (Bashan y Holguin, 1998); tal como: el incremento en el desarrollo radicular de la planta, mayor desarrollo de materia verde y mayor producción de materia seca (García *et al.*, 2005; Díaz y Ortegón, 2006).

Bashan & Levanony (1990), Summer (1990), Fages (1994), Okon y Labandera-Gonzalez (1994), citados por Dobbelaere *et al.*, (2001), concluyen que la inoculación

con *Azospirillum sp.* incrementa significativamente de un 5-30 % en rendimiento de materia seca foliar, grano y proteína foliar, así como en el desarrollo radical, en alrededor de 60-70 % de los experimentos en campo.

El efecto favorable de *Azospirillum sp.* produce un mayor desarrollo del sistema radical, traduciendo en mayor superficie de absorción de agua y nutrientes así como un mayor desarrollo de las partes aéreas de la planta (Liriano *et al.*, 2005), teniendo potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés hortícola (Díaz *et al.*, 2001).

Una población abundante compite por nutrientes con las plantas, un ejemplo de estos es la inmovilización del nitrógeno cuando se incorpora al suelo material vegetal con relación C/N alta. Esto indica que no se puede sobrepasar ciertos niveles de población y por consiguiente, de actividad microbiana (Gómez, 1996). La competencia por otros microorganismos y las propiedades físicas y químicas del suelo pueden afectar el potencial de *Azospirillum sp.* al ser inoculado en la planta hospedera (Arzanesh *et al.*, 2010).

2.11 Tratamiento en semillas

El tratamiento de semilla con *Azospirillum brasilense* permite el aumento del crecimiento radical, incrementando la exploración del suelo y mejorando el acceso al agua y a los nutrientes limitantes para la normal producción de los cultivos, y de esta manera se logran aumentos en la producción de los mismos. Como consecuencia de esta mejora se reducen procesos de pérdida de nutrientes móviles, se atenúan períodos de moderado estrés hídrico y se logra mantener tasas de crecimiento activo del cultivo mejorando su capacidad de fijación de carbono resultando en mayor producción inicial de biomasa, aprovechamiento de la radiación y fijación de granos (Díaz y Fernández, 2008).

En condiciones de producción representativa de la región Pampeana (Argentina), Díaz y Fernández (2008) estudiaron durante 4 años (2002-2006) la producción de trigo según tratamientos de semilla. Observaron en el 76% de los 273 lotes de producción de trigo (con rangos de rendimientos de 850 y 8050 kg ha⁻¹) aumentos

de rendimiento mayores a los 50 kg ha⁻¹ por la aplicación del tratamiento de semillas con *Azospirillum sp.*, y determinaron respuestas medias de 258 kg ha⁻¹. Los incrementos de rendimientos por el uso de *Azospirillum sp.* varían con el manejo del cultivo y la disponibilidad de agua durante el ciclo del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2008).

Un estudio realizado por Canto *et al.*, (2004), 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. Los resultados sobre la capacidad de germinación de las semillas mostraron que en los tres tratamientos no aumentaron ni disminuyeron 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.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área experimental

La evaluación se llevó a cabo en dos etapas, la primer etapa se realizó en el Laboratorio de Producción de Semillas, perteneciente al Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas, la segunda etapa se realizó en el invernadero No. 3, que encuentran en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicación en en el municipio de Saltillo Coahuila (Figura 3.1), cuyas coordenadas geográficas son 25°22' latitud norte y 101°1' longitud oeste, a una altura de 1742 msnm.



Figura 3.1 Ubicación del área experimental; laboratorio e invernadero. (Google Maps).

3.2 Material genético

Semilla de coliflor

Se utilizó semilla de coliflor comercial variedad Snowball, perteneciente al lote: 569, la cual fue producida en el 2013.

Cepas del Género *Azospirillum* sp.

Se utilizaron cepas de *Azospirillum* sp. aisladas de raíces de chile y nopal, las cuales fueron caracterizadas en un medio NFb.

3.3 Tratamientos

Se evaluaron dos cepas de *Azospirillum* sp. de diferente origen chile y nopal en cuatro concentraciones (0, 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/mL); considerando la concentración 0 UFC/ mL como el testigo por contener solo agua. Teniendo tres repeticiones por tratamiento y concentración como lo muestra el Cuadro 3.1, con la identificación de tratamientos correspondientes.

Cuadro 3.1 Identificación de tratamientos en el estudio

No. Tratamiento	Tratamiento	Concentración UFC/mL
1	<i>Azospirillum</i> sp. origen chile	0, 10^4 , 10^6 , 10^8
2	<i>Azospirillum</i> sp. origen nopal	0, 10^4 , 10^6 , 10^8

3.4 Metodología

3.4.1 Etapa: Laboratorio

Se sembraron 20 semillas de coliflor de la variedad Snowball por repetición por tratamiento en cajas Petri sobre un filtro Watman. No. 1, inoculando 3.5 mL de la bacteria por tratamiento, según la bacteria y su concentración, después de haber inoculado la semilla, las cajas Petri fueron llevadas a una cámara de germinación a una temperatura de 28-30 °C por 7 días; evaluando la capacidad de germinación y vigor mediante el porcentaje de Plántulas Normales (PN), Plántulas Anormales (PA) y Semillas Sin Germinar (SSG), además, así como Índice de Velocidad de Emergencia (IVE), Longitud Media de Hipocótilo (LMH), Longitud Media de Radícula (LMR) y Peso Seco (PS)

3.4.2 Etapa: Invernadero

Se sembraron 20 semillas de coliflor Var. Snowball por repetición por tratamiento, inoculando 10 mL por tratamiento en cajas Petri sobre un filtro Watman. No. 1, según

la bacteria y su concentración, después de haber inoculado la semilla con la cepa de *Azospirillum sp.* se sembró, para después evaluar la capacidad de germinación y vigor mediante el porcentaje de Plántulas Normales (PN), Plántulas Anormales (PA), Semillas Sin Germinar (SSG) e Índice de Velocidad de Emergencia (IVE).

Se estuvo evaluando el número de emergencias por día, a los 10 días después de la siembra se evaluó el número de plantas normales (PN), plantas anormales (PA) y semillas sin germinar (SSG).

3.5 Variables Evaluadas

3.5.1 Etapa: Laboratorio

3.5.1.1 Capacidad de germinación

Plantas normales (PN): se consideró como plantas normales todas aquellas que ya tenían bien definidas sus hojas primarias.

Plantas anormales (PA): se consideró como plantas anormales todas aquellas que no tuvieran bien definidas sus hojas primarias o que tuvieran una anomalía.

Semillas sin germinar (SSG): se consideraron semillas sin germinar todas aquellas que no hayan germinado.

3.5.1.2 Vigor

Índice de velocidad de emergencia (IVE). Se realizó evaluando a diario el número de emergencia por día, se consideró como emergencia toda aquella que estuviera brotando.

Longitud media de hipocotilo (LMH): en cada evaluación se tomó la planta completa sin dañarla, se evaluó midiendo con una regla métrica desde la base hasta las hojas primarias, considerando únicamente las plantas normales.

Longitud media de radícula (LMR): en cada evaluación se tomó la planta completa sin dañarla, se evaluó midiendo con una regla métrica desde la base hasta el ápice de la raíz más larga, considerando únicamente las plantas normales.

Peso seco (PS): después de haber estado a 65 °C, durante 24 horas, se procedió a pesar cada una de las muestras, para obtener el peso seco del follaje y raíz.

3.5.2 Etapa: Invernadero

3.5.2.1 Capacidad de germinación

Plantas normales (PN): se consideró como plantas normales todas aquellas que ya tenían bien definidas sus hojas primarias.

Plantas anormales (PA): se consideró como plantas anormales todas aquellas que no tuvieran bien definidas sus hojas primarias o que tuvieran una anomalía.

Semillas sin germinar (SSG): se consideraron semillas sin germinar todas aquellas que no hayan emergido del suelo.

3.5.2.2 Vigor

Índice de velocidad de emergencia (IVE): se realizó evaluando a diario el número de emergencia por día, se consideró como emergencia toda aquella que emergiera del suelo teniendo sus hojas primarias bien definidas.

3.6 Diseño experimental

La información generada de este trabajo de investigación se analizó mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con tres repeticiones. Cuyo modelo estadístico es:

$$y_{ij} = \mu + \lambda + \beta_j + (\lambda * \beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

y_{ij} = variable observada

μ = media general

λ = efecto del factor A (cepa de *Azospirillum sp.*)

β_j = efecto del factor B (concentración)

$(\lambda * \beta)_{ij}$ = interacción A X B (cepa de *Azospirillum sp.* x concentración)

ε_{ij} = error experimental

Para analizar los datos obtenidos en el estudio se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0 (2002).

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ %. Calculándose mediante la fórmula según Steel y Torrie (1980).

Dónde:

CM_{EE} : cuadrado medio del error

r: número de observaciones usadas para calcular un valor medio.

a: nivel de significancia.

t: valor tabular que se usa en la prueba, con los grados de libertad del error y el nivel de significancia apropiada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Etapa: Laboratorio

4.1.1 Capacidad de germinación

El análisis de varianza, mostró que no existieron diferencias significativas en la prueba de capacidad de germinación en sus variables PN, PA y SSG, tanto en la fuente de variación de cepas de *Azospirillum sp.*, en las concentraciones aplicadas, como en la interacción *Azospirillum sp.* por concentración, lo cual nos muestra que la bacteria no tienen efecto en la capacidad de germinación de la semilla de esta especie, ya que aún en las concentraciones no se logró tener un efecto como se observa en el Cuadro 4.1; resultando con un porcentaje del Coeficiente de Variación (CV) en las variables de 10.35 % en PN; 84.85 % en PA y de 73.47 % en SSG; debido a que hubo una variabilidad en relación a cada parámetro y su media, por tal motivo, al realizar la prueba de comparación de medias entre Cepas de *Azospirillum sp.* y entre concentraciones, se encontró que ambas pruebas mostraron un solo grupo estadístico, corroborando la respuesta expresada en el ANVA.

Cuadro 4.1 Cuadrados medios y significancia en la prueba de capacidad de germinación en semillas de Coliflor tratadas con cepas de *Azospirillum sp.* de origen de Chile y Nopal en laboratorio, 2013.

Fuentes de variación	Grados de libertad	PN	PA	SSG
<i>Azospirillum sp.</i>	1	9.38 ^{NS}	0.00 ^{NS}	9.38 ^{NS}
Concentración	3	76.04 ^{NS}	8.33 ^{NS}	34.38 ^{NS}
Azos. * Conc.	3	34.38 ^{NS}	19.44 ^{NS}	20.49 ^{NS}
Error exp.	16	71.88	50	56.25
CV (%)		10.35	84.85	73.47

^{NS} = diferencia no significativa; ** = diferencia altamente significativa; * = diferencia significativa; CV=coeficiente de variación; Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 0.05 %; PN= Plántulas Normales (%); PA= Plántulas Anormales (%); SSG= Semillas sin Germinar (%)

Prueba de comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.*

Cabe señalar que aunque en el análisis de comparación de medias entre las Cepas de *Azospirillum sp.* (Cuadro 4.2) no existieron diferencias estadísticas en ninguna de las variables, las hubo numéricamente en la variable PN, donde la mejor fue la Cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile, con un 82.500 %, que estuvo por encima de la Cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Nopal.

Cuadro 4.2 Comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.* en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Cepas <i>Azospirillum sp.</i>	Plántulas normales (%)	Plántulas anormales (%)	Semillas sin germinar (%)
Chile	82.500 A	8.333 A	10.833 A
Nopal	81.250 A	8.333 A	9.583 A

NOTA: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Prueba de comparación de medias entre concentraciones

Aunque en la prueba de comparación de medias entre concentraciones no hubo diferencias estadísticas, numéricamente en la variable PN, se encontró la mejor respuesta de germinación en la concentración 0 UFC/mL (testigo) con 86.66 %, seguido de la concentración 10^6 UFC/mL con 82.5 % y en las siguientes se dio una disminución en la germinación como se muestra en el Cuadro 4.3; así mismo en la variable SSG hubo un efecto negativo, ya que al inocular las cepas de *Azospirillum sp.* a las diferentes concentraciones aumentó el porcentaje de esta variable, como se muestra en el Cuadro 4.3 (a 10^4 UFC/mL con 11.67 %, 10^6 UFC/mL con 10.83 % y 10^8 UFC/mL con 11.67 % de SSG), mientras que el testigo con agua (0 UFC/mL) obtuvo un porcentaje de SSG de tan solo 6.67 %. Coincidiendo con Hernández *et al.*, (1997) quienes mencionan 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, por ello se puede atribuir este resultado, a que alguna de las cepas de *Azospirillum sp.*

utilizadas en el trabajo de investigación produjeran una gran cantidad de hormonas, que al acumularse afectarían la capacidad de germinación hasta impedir la germinación de semillas por tal motivo aumentó el porcentaje de SSG.

Cuadro 4.3 Comparación de medias entre concentraciones de *Azospirillum sp.* en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Concentración (UFC/mL)	Plántulas normales (%)	Plántulas anormales (%)	Semillas sin germinar (%)
0 (Testigo)	86.667 A	8.33 A	6.67 A
10 ⁴ (UFC/mL)	79.18 A	9.17 A	11.67 A
10 ⁶ (UFC/mL)	82.50 A	6.67 A	10.83 A
10 ⁸ (UFC/mL)	79.18 A	9.17 A	11.67 A

NOTA: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Interacción cepas de *Azospirillum sp.* por concentración

Como se mencionó anteriormente no hubo diferencias en la variable PN, sin embargo numéricamente sobresalió el testigo (0 UFC/mL) en ambas cepas con 86.6 % de PN como se muestra en la Figura 4.1. Es de mencionar que la respuesta de la aplicación de las cepas se reflejó diferente en esta especie, ya que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal obtuvo mejores valores de germinación (PN) que la de origen de Chile en las concentraciones de 10⁴ y 10⁸ UFC/mL ambas con 81.67 % ; mientras que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile tuvo su mejor respuesta a una concentración de 10⁶ UFC/mL con 80 % de PN, a diferencia de 10⁴ UFC/mL y 10⁸ UFC/mL donde ambas obtuvieron 76.6 % de PN (Figura 4.1).

Estos resultados difieren en lo encontrado por Canto *et al.*, (2004), quienes aplicaron *Azospirillum sp.* en semillas de tomate y no obtuvieron diferencias en la germinación, lo cual pudiera mencionarse que la disminución de la germinación en ambas cepas fue debido a la producción tal vez excesiva de hormonas como auxinas, citocininas, etc, quienes tienen un efecto de inhibición en la germinación cuando se encuentran en altas concentraciones.

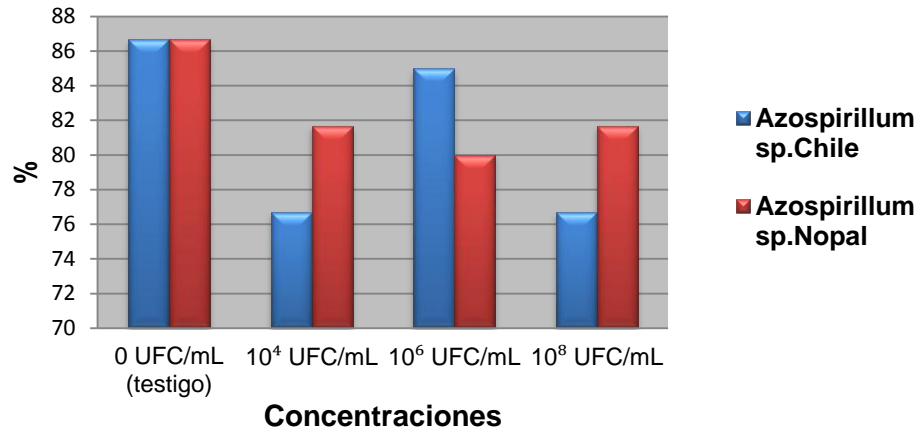


Figura 4.1 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PN en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Con respecto a la variable PA, no existió diferencia estadística, sin embargo los valores de respuesta mostraron que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile obtuvo un valor superior a todos los tratamientos en la concentración 10⁴ UFC/mL con 11.6 % de PA como se muestra en la Figura 4.2, confirmando el efecto negativo en la capacidad de germinación en esta semilla al aplicar una baja concentración de la bacteria, al tener mayor número de anomalías causado por la acumulación de hormonas (auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas) como mencionan Kapulnik *et al.*, 1985; mientras que a una mayor concentración de 10⁶ UFC/mL disminuyó la respuesta de anomalías con 5 %, debido posiblemente a una mayor aportación de giberelinas, tal y como lo propusieron Ikuma y Thimann, 1963; Lewak y Khan, 1977; Mehanna *et al.*, 1985; Karssen *et al.*, 1989; Baskin, 1998; Tigabú y Odén, 2001, quienes mencionan que las giberelinas tienen una función clave en el control de la germinación de la semillas causando una respuesta positiva en la capacidad de germinación ya que estas tienen la acción de controlar la germinación de las semillas y por ello son ampliamente utilizadas para promover o inducir la germinación de semillas en diversas especies de plantas, por lo que es de mencionar que las giberelinas producidas por la bacteria a una concentración de 10⁶ UFC/mL beneficiaron positivamente la capacidad de germinación de la semilla.

El comportamiento de la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal en la variable PA, resalta la concentración 10^8 UFC/mL por obtener una respuesta negativa superior a las demás concentraciones con 10 % de PA, lo que muestra que la aplicación de la bacteria a esta concentración provoca una alteración en las plántulas emergidas precisamente por la aportación de diferentes hormonas y cantidad de ellas; sin embargo a baja concentración disminuyó el número de anomalías como fue a 10^4 UFC/mL con 6.6 %, lo cual puede representar que a menor concentración menor producción de hormonas.

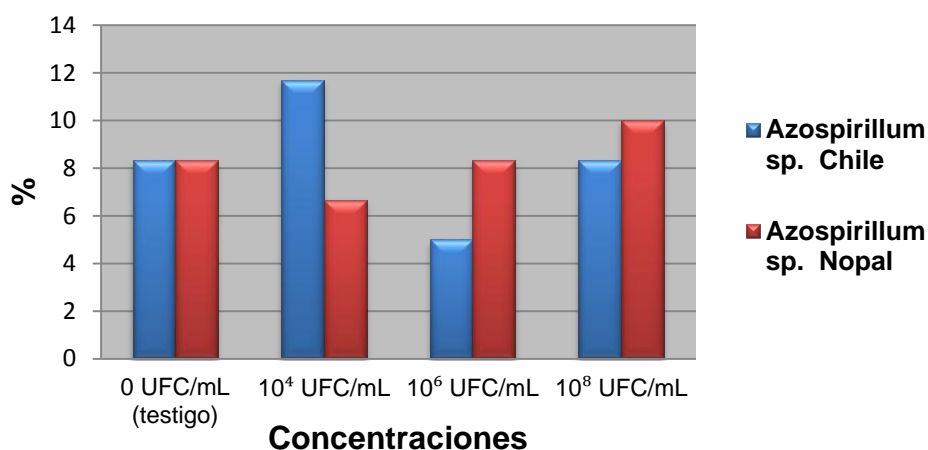


Figura 4.2 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PA en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

La Cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile en la variable SSG, numéricamente sobresalió la concentración 10^8 UFC/mL con un valor de 15 %, siendo mayor a las demás concentraciones (Figura 4.3), marcando un efecto negativo en la capacidad de germinación de la semilla de coliflor y aún más en altas concentraciones por la generación de altas cantidades de hormonas por parte de la bacteria de origen de Chile; mientras que el testigo (0 UFC/mL) obtuvo el más bajo porcentaje con 6.6 % por no tener ninguna aplicación de bacteria.

En la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Nopal en esta misma variable (SSG), se encontró una respuesta negativa en las concentraciones de 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL ambas con 11.6 % (Figura 4.3), portando tal vez cantidades excesivas de

hormonas causantes de la inhibición de la germinación, por tal motivo aumentan las semillas sin germinar.

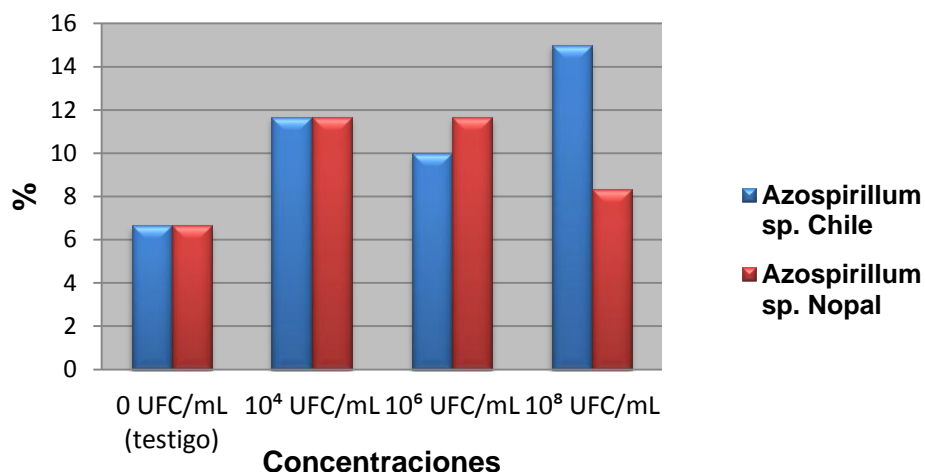


Figura 4.3 Medias entre cepas de *Azospirillum* sp. y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable SSG en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

4.1.2 Vigor

En cuanto al análisis de varianza resultante en las pruebas de vigor, mostró en la variable IVE una diferencia significativa en la fuente de variación *Azospirillum* sp. como se muestra en el Cuadro 4.2, lo que indica que la aplicación de las bacterias tuvo una respuesta de emergencia de las plántulas diferente.

Con respecto a la variable PC, en el ANVA se encontró una diferencia significativa en la fuente de variación entre concentraciones con un CV de 11.76 % (Cuadro 4.2), lo que indica que cuando menos una de las concentraciones fue superior en el porcentaje de germinación a un primer conteo.

Por otro lado, como se muestra en el mismo Cuadro 4.2, en el análisis de varianza para la variable LMR, se encontró una diferencia altamente significativa en la fuente de variación entre concentraciones con un CV de 11.97 %, indicando que al menos una de las concentraciones aplicadas tuvo un valor superior a las demás concentraciones.

Así mismo en la fuente de variación entre la interacción *Azospirillum* sp. por concentración, el ANVA no mostro diferencias significativas en ninguna de las

variables evaluadas, lo cual indica que las cepas en las diferentes concentraciones no tuvieron efectos sobre el vigor en las variables IVE, PC, LH, LR y PS en la semilla de esta especie (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4 Cuadrados medios y significancia en la prueba de vigor en semillas de Coliflor tratadas con cepas de *Azospirillum sp.* de origen de Chile y Nopal en laboratorio, 2013.

Fuentes de variación	Grados de libertad	VIGOR				
		IVE	PC	LMH	LMR	PS
<i>Azospirillum sp.</i>	1	26.46*	204.17 ^{NS}	0.003 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.00000676 ^{NS}
Concentración	3	0.92 ^{NS}	233.33 *	0.04 ^{NS}	2.46 **	0.00000504 ^{NS}
Azos. * Conc.	3	4.18 ^{NS}	93.06 ^{NS}	0.01 ^{NS}	0.56 ^{NS}	0.00000751 ^{NS}
Error	16	2.95	81.25	0.02	0.26	0.00000706
CV (%)		15.09	11.76	10.98	11.97	184.15

^{NS} = diferencia no significativa; ** = diferencia altamente significativa; * = diferencia significativa; CV=coeficiente de variación; Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 0.05 %; IVE= Índice de Velocidad de Emergencia (No. De plántulas/día); PC= Primer Conteo (% PN); LMH= Longitud Media de Hipocótilo (centímetros); LMR= Longitud Media de Radícula (centímetros); PS= Peso Seco (mg/plántula)

Prueba de comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.*

En la prueba de comparación de medias entre cepas para la variable IVE, hubo diferencias, encontrándose dos grupos estadísticos, sobresaliendo la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile con 12.4 plántulas/día, superando a la de origen de Nopal con 10.3 plántulas/día, marcando que el origen de la bacteria tiene un efecto directo en el vigor sobre todo en el IVE, debido posiblemente al tipo de hormonas que producen en cada una, simplemente por los nutrientes disponibles del cultivo del cual fueron extraídas.

Esta relación también se conoce como afinidad u homología entre bacteria y genotipo vegetal, como Penot *et al.*, (1992), quienes encontraron cierta afinidad entre *Azospirillum* y el cultivo de maíz o entre otros cultivos (Wani *et al.*, 1985); mientras que trigo tiene un efecto interactivo bacteria y planta (Alamri y Mostafa, 2009, Díaz y Fernández, 2008).

Así, el éxito de la inoculación con *Azospirillum* se fundamenta en la cepa bacteriana para la especie vegetal apropiada; por lo que se puede decir que la cepa de

Azospirillum sp. de origen de Chile tiene mayor afinidad con la semilla de esta especie (coliflor) que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal, ya que resulto con un mayor número de plántulas por día.

Con respecto a las variables PC, LMH, LMR y PS entre cepas, ambas se encontraron en un mismo grupo estadístico (Cuadro 4.5); sin embargo, numéricamente *Azospirillum sp.* originaria de Chile sobresalió en todas las variables, superando a la de origen de nopal, ya que el *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 correlaciona con la calidad de los exudados radicales típico de la rizósfera, donde el mejor atrayente representa el mejor sustrato de crecimiento (Alexandre *et al.*, 2000); por lo que se puede decir el tipo de compuestos orgánicos que produce esta cepa son más favorables o diferentes que los producidos por la cepa de origen de nopal, teniendo un mejor efecto sobre la semilla de Coliflor.

Cuadro 4.5 Comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.* en las pruebas de vigor en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Cepas <i>Azospirillum sp.</i>	IVE (Plántulas/día)	PC (%)	LMH (cm)	LMR (cm)	PS (mg/plántula)
Chile	12.4417 A	79.583 A	1.32583 A	4.3483 A	0.001973 A
Nopal	10.3417 B	73.750 A	1.30167 A	4.2075 A	0.000912 A

Nota: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

IVE= Índice de Velocidad de Emergencia; PC= Primer Conteo; LMH= Longitud Media de Hipocótilo; LMR= Longitud Media de Radícula; PS= Peso Seco.

Prueba de comparación de medias entre concentraciones

La prueba de comparación de medias entre concentraciones, se confirmó que no hay diferencias estadísticamente en las variables IVE, LH y PS, por encontrarse en un mismo grupo estadístico (Cuadro 4.6); en cambio en la variable PC, se encontraron dos grupos estadísticos formando el primer grupo las primeras tres concentraciones (0, 10⁴ y 10⁶ UFC/mL), sobresaliendo entre ellas el testigo (0 UFC/mL) y quien mostro un mayor porcentaje en plántulas normales con 85 %, a diferencia de la concentración 10⁸ UFC/mL quien resultó con un valor de 70 % en PC y formando

parte del segundo grupo junto con 10^4 y 10^6 UFC/mL como se muestra en el Cuadro 4.4.

Al analizar la regresión se encontró una ecuación de:

$$y = - 0.9333x + 17.667; \text{ con una } R^2 = 0.2631$$

Así mismo en la variable LMR, nuevamente el testigo (0 UFC/mL) destaco y forma el primer grupo estadístico con una longitud de 5.20 cm; mientras que las demás concentraciones formaron el segundo grupo teniendo el valor más bajo la concentración 10^4 UFC/mL con 3.72 cm como se muestra en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6 Comparación de medias entre concentraciones de cepas *Azospirillum sp.* en vigor en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Concentración	IVE (Plántulas/día)	PC (%)	LMH (cm)	LMR (cm)	PS (mg/plántula)
0 UFC/mL (Testigo)	11.87 A	85 A	1.20 A	5.20 A	0.001320 A
10^4 UFC/mL	11.13 A	76.67 AB	1.34 A	3.72 B	0.000978 A
10^6 UFC/mL	11.55 A	75 AB	1.37 A	4.18 B	0.000707 A
10^8 UFC/mL	11.02 A	70 B	1.35 A	4.02 B	0.002765 A

NOTA: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

IVE= Índice de Velocidad de Emergencia; PC= Primer Conteo; LMH= Longitud Media de Hipocótilo; LMR= Longitud Media de Radícula; PS= Peso Seco.

Los resultados obtenidos no mostraron efectos notables como para asegurar los beneficios aportados por la bacteria, como lo aseguran algunos autores como Kapulnik *et al.*, (1985), quienes mencionan que los cultivos puros de *Azospirillum sp.* producen auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas, hormonas que participan en el desarrollo vegetal, además de estimular el desarrollo vegetal (Schnak *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1984); pero entre las concentraciones 10^4 , 10^6 y 10^8 , se logró observar que a mayor concentración de la cepa mayor fue la respuesta de longitud de radícula pero no menor que el testigo (0 UFC/mL), coincidiendo con Hernandez *et al.*, (1996), quienes encontraron que al inocular *Azospirillum sp.* a diferentes dosis y concentraciones (de 10^4 a 10^8 UFC/mL) existió una influencia

significativa en el rendimiento aéreo y radicular en semillas de sorgo; Sin embargo, esta tendencia de respuesta en la LMR entre concentraciones tal vez se debió a la cantidad de auxinas generada y acumulada por la bacteria en cada concentración dada.

Esta disminución del volumen de raíz por la inoculación de *Azospirillum* en el cultivo de coliflor, ha sido similar en otros cultivos como arroz (Cassan *et al.*, 2009), trigo (Steenhout y Vanderleyden, 2000), *sorghum bicolor* y *S. sudense* (Morgenstern y Okon, 1987); razones que surgen para este tipo de respuesta, tal vez sea por una variación en los carbohidratos y otras fuentes de energía exudadas o de sustancias inhibitoras del crecimiento (Kipe *et al.*, 1985), o por el crecimiento abundante de pelos radicales en zona meristemática y de elongación de la raíz (Lerner *et al.*, 2005); o porque el género *Azospirillum* depende de la nutrición y metabolismo de la planta hospedero, así como a la calidad de los exudados radicales típico de la rizósfera (Alexandre *et al.*, 2000); por ende se puede mencionar que la disminución de la LMR pudo verse afectada por los exudados orgánicos que desprende la planta, impidiendo la adaptación o desarrollo de la cepa de *Azospirillum sp.* en la plántula de coliflor, lo que conlleva a no tener una respuesta favorable.

Interacción *Azospirillum sp.* por concentración

En la interacción cepas de *Azospirillum sp.* por concentraciones en la variable IVE, se encontró que la cepa de origen de Chile obtuvo el mayor valor en la concentración 10^6 UFC/mL con 13.5 plántulas/día, superando a la cepa originaria de Nopal y a las demás concentraciones, excepto en el testigo (0 UFC/mL) en ambas cepas por mostrar el mismo valor de IVE de 11.8 plántulas/día y resultando el más bajo.

En el caso de la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Nopal, mostró un efecto negativo en las diferentes concentraciones, conforme se aumentó la concentración disminuyó el IVE en la semilla, como se muestra en la Figura 4.4.

En el caso de la variable PC, la respuesta resultó mejor en el testigo (0 UFC/mL) con 85 % seguido de la cepa *Azospirillum sp.* originaria de Chile a una concentración de 10^6 UFC/mL obteniendo un porcentaje de PN al PC de 83.3 %. Como se muestra en

la Figura 4.5; en cambio la cepa *Azospirillum sp.* originaria de nopal obtuvo los valores más bajos en el primer conteo de plántulas normales en las concentraciones 10^6 y 10^8 UFC/mL ambas con 66.6 %, observando el mismo comportamiento que en la variable anterior donde a mayor concentración de esta cepas disminuye su porcentaje de plántulas normales.

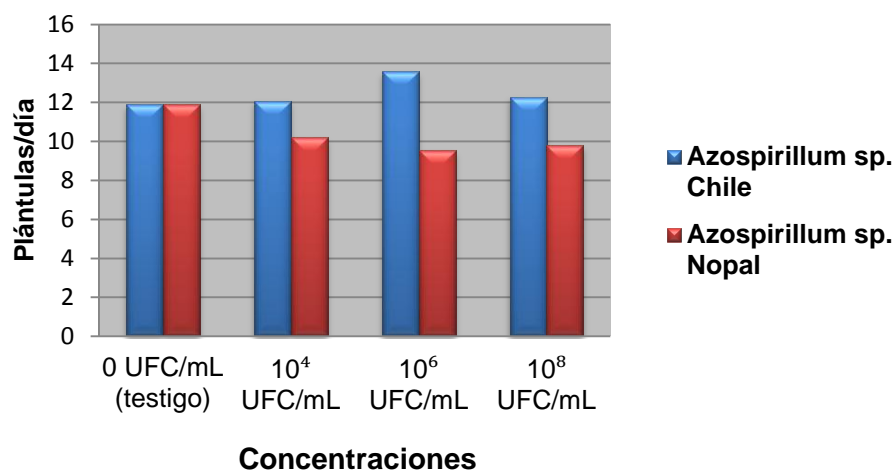


Figura 4.4 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en el vigor en la variable IVE en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

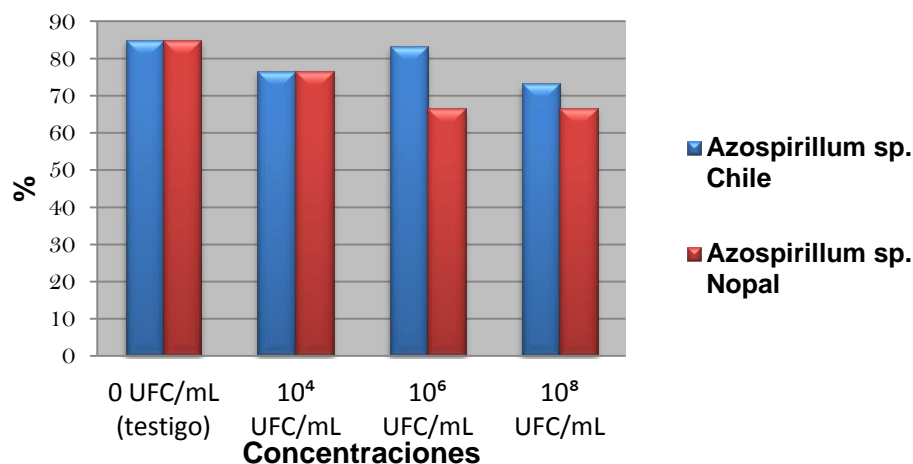


Figura 4.5 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en el vigor en la variable PC en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

En cambio en la variable a la LMH a pesar de que no hubo diferencias significativas entre las cepas de *Azospirillum sp.* y entre concentraciones; las cepas mostraron en efecto positivo en la elongación de los hipocótilos de las plántulas normales

encontradas en la prueba, donde la cepa de origen de nopal, mostro el más alto valor de longitud a una concentración de 10^8 UFC/mL con 1.42 cm, mientras que el testigo tuvo tan solo 1.2 cm (Figura 4.6); así mismo la cepa de *Azospirillum sp.* originaria de chile, obtuvo su mayor valor en la concentración de 10^6 UFC/mL con 1.38, siendo la segunda mejor en la prueba; los resultados coinciden con lo descrito por Bashan y Holguin, 1998; Garcia *et al.*, 2005 y Diaz y Ortegon, 2006, quienes afirmaron que la asociación *Azospirillum*-planta da como resultados cambios en el desarrollo vegetal, al respecto se puede mencionar que la inoculación de la bacteria tuvo efectos favorables, los cuales permitieron un mejor desarrollo de la planta.

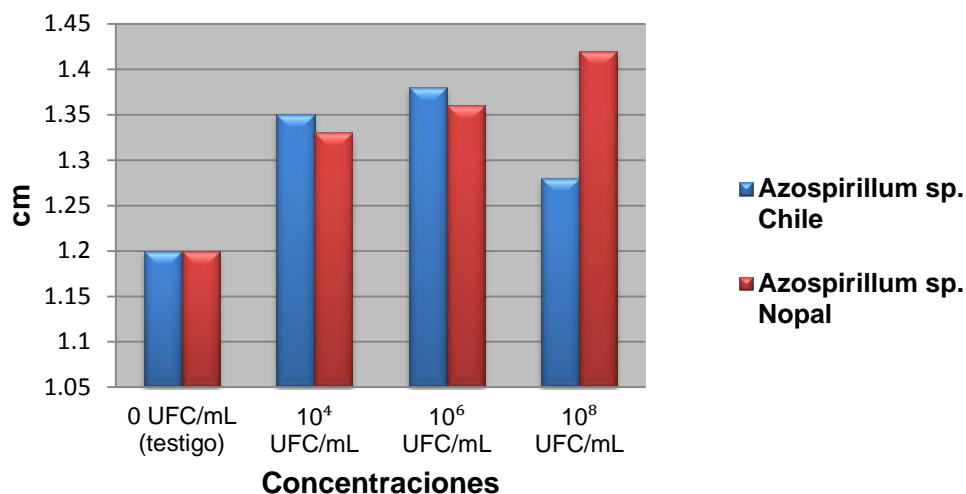


Figura 4.6 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en el vigor en la variable LMH en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

En la variable LMR no hubo diferencias entre las cepas de *Azospirillum sp.* estudiadas, pero entre concentraciones se observó que en ambas cepas el testigo (0 UFC/mL) obtuvo la mayor longitud con 5.19 cm; mientras que la cepa originaria de nopal obtuvo una respuesta similar en las concentraciones de 10^4 y 10^6 UFC/mL y disminuyendo su valor en la más alta concentración con 3.77 cm (Figura 4.7); estos resultados coinciden con lo demostrado por Dobbelaeres *et al.*, (1999), quienes encontraron que al inocular la bacteria *Azospirillum* en semillas, a bajas concentraciones hubo un efecto favorable sobre el desarrollo y morfología de las raíces y se inhibe fuertemente a altas concentraciones.

En la cepa de *Azospirillum sp.* originaria de Chile las respuesta se generó de manera inversa donde el mayor valor fue a la más alta concentración con 4.27 cm y teniendo el más bajo valor a la concentración de 10^4 UFC/mL con 3.23 cm.

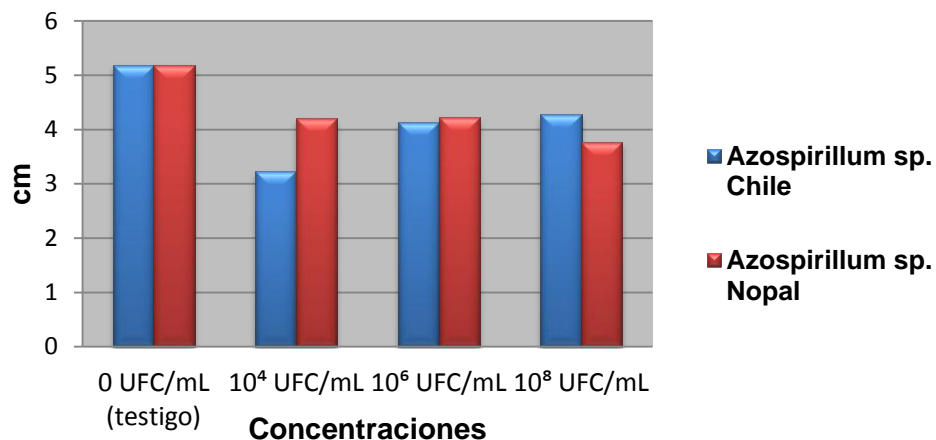


Figura 4.7 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en el vigor en la variable LMR en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

Aunque el análisis de varianza no se mostró diferencias significativas en la variable PS, entre los tratamiento se logró observar que numéricamente resultaron diferentes, con la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile obtuvo el más alto peso a una concentración de 10^8 UFC/mL con 0.00497 mg/planta superior a todos los tratamientos incluyendo al testigo y el más bajo a 10^6 UFC/mL con 0.0076 mg/planta, como lo muestra la Figura 4.8; mientras que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Nopal, sobresalió el testigo (0 UFC/mL) con 0.00132 mg/planta en las siguientes concentraciones la tendencia fue en disminución al aumentar la concentración como se muestra en la Figura 4.8; al respecto se puede decirse que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile a concentraciones altas, resulta benéfica para incrementar el PS, mientras que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Nopal al aumentar la concentración disminuye el peso seco.

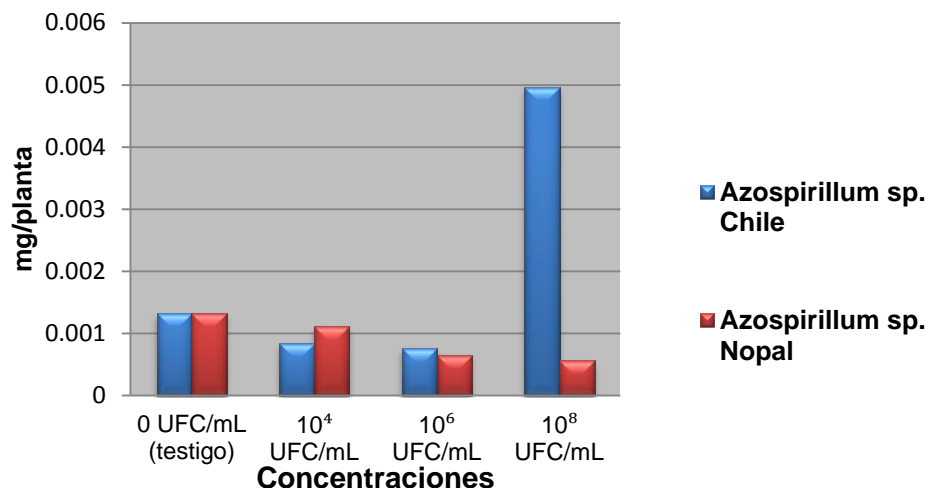


Figura 4.8 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en el vigor en la variable PS en semillas de Coliflor en laboratorio, 2013.

4.2 Etapa: Invernadero

4.2.1 Capacidad de germinación

El análisis de varianza, mostró que no existieron diferencias significativas en la prueba de capacidad de germinación en sus variables PN, PA y SSG, tanto en la fuente de variación de *Azospirillum sp.*, en las concentraciones aplicadas, como en la interacción *Azospirillum sp.* por concentración, lo cual nos indicó que la bacteria no tuvo efecto en la capacidad de germinación de la semilla de esta especie, ya que aún en las concentraciones no se logró tener un efecto como se observa en el Cuadro 4.5; resultando un porcentaje del Coeficiente de Variación (CV) de 17.13 % en PN; 99.91 % en PA y 57.8 % en SSG como se muestra en el Cuadro 4.5; por lo que se observó que no hubo una uniformidad en los parámetros evaluados, por tal motivo, al realizar la prueba de comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y entre concentraciones, se encontró que ambas pruebas mostraron un solo grupo estadístico, corroborando la respuesta expresada en el ANVA (Cuadro 4.7)

Cuadro 4.7 Cuadrados medios y significancia en la prueba de capacidad de germinación en semillas de Coliflor tratadas con cepas de *Azospirillum sp.* de origen de chile y nopal en invernadero, 2013.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Plántulas Normales (%)	Plántulas Anormales (%)	Semillas sin Germinar (%)
<i>Azospirillum sp.</i>	1	4.17 ^{NS}	51.04 ^{NS}	26.04 ^{NS}
Concentración	3	136.11 ^{NS}	17.71 ^{NS}	126.04 ^{NS}
Azos. * Conc.	3	95.83 ^{NS}	17.71 ^{NS}	42.71 ^{NS}
Error Exp.	16	161.46	22.92	147.92
CV (%)		17.13	99.91	57.80

^{NS} = diferencia no significativa; ** = diferencia altamente significativa; * = diferencia significativa; CV=coeficiente de variación; Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 0.05 %.

Prueba de comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.*

Cabe señalar que aunque la prueba de comparación de medias entre las cepas de *Azospirillum sp.* no existieron diferencias estadísticas en ninguna de las variables (Cuadro 4.8), numéricamente en las variables PN y SSG, la cepa *Azospirillum sp.* de origen de nopal fue superior con 74.58 %, aunque en la variable SSG su porcentaje se elevó hasta 22.08 %; mientras que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de chile en las mismas variables, tuvo un valor de 73.75 % en PN y 20 % en SSG; se puede decir que aunque la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal fue ligeramente mejor en las PN, también tuvo un valor alto en las SSG, por lo que podríamos considerar que estas cepas tiene un efecto negativo sobre la capacidad de germinación, aún y teniendo mayor número de PN, ya que también inhibe la germinación de forma considerable.

Cuadro 4.8 Comparación de medias entre cepas de *Azospirillum sp.* en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

Cepas <i>Azospirillum sp.</i>	Plántulas normales (%)	Plántulas anormales (%)	Semillas sin germinar (%)
Chile	73.75 A	6.25 A	20 A
Nopal	74.58 A	3.33 A	22.08 A

Nota: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Prueba de comparación de medias entre concentraciones

La prueba de comparación de medias entre concentraciones en las variables de capacidad de germinación, no mostraron diferencias estadísticas, aunque numéricamente se logró observar en este estudio que las cepas con concentraciones arriba de 0 UFC/mL, resultaron con mayor porcentaje de PN y menor en PA y SSG (Cuadro 4.9), donde en la variable PN, la mejor concentración fue 10^4 UFC/mL con 79.17 %, y el más bajo fue 0 UFC/mL (testigo) con 68.33 %; mientras que en la variable SSG hubo dos concentraciones que tuvieron valores elevados teniendo un efecto negativo, el testigo (0 UFC/mL) con 25 % y 10^6 UFC/mL con 24.17 % siendo los más afectados, en cambio el valor más bajo resulto a una concentración de 10^4 UFC/mL con 15 %, lo cual nos indica que la aplicación de bacteria puede dar mejores resultados a bajas concentraciones al tener mayor número de PN y menor en SSG, aunque esto no quiere decir que sea aceptable el utilizar la cepa de *Azospirillum sp.* a esta concentración, ya que ni aun así se evitó tener un bajo porcentaje de PN y un alto en SSG .

Cuadro 4.9 Comparación de medias entre Concentraciones de *Azospirillum sp.* en la capacidad de germinación en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

Concentraciones	Plántulas normales (%)	Plantulas anormales (%)	Semillas sin germinar (%)
0 UFC/mL (Testigo)	68.33 A	6.67 A	25 A
10^4 UFC/mL	79.17 A	5.83 A	15 A
10^6 UFC/mL	72.5 A	3.33 A	24.17 A
10^8 UFC/mL	76.67 A	3.33 A	20 A

Nota: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Interacción *Azospirillum sp.* por concentración

En la interacción cepas de *Azospirillum sp.* por concentraciones aplicadas, como se mencionó anteriormente no hubo diferencias en la variable PN; sin embargo, numéricamente la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal obtuvo mejores

valores de germinación (PN) que la de origen de Chile en las concentraciones 10^4 y 10^6 UFC/mL con 81.66 y 76.66 % respectivamente; mientras que la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de Chile tuvo su mejor respuesta a una concentración de 10^8 UFC/mL con 81.66 %, a diferencia de 10^4 y 10^6 UFC/mL con 76.66 y 68.33 % cada una; ambas cepas y concentraciones fueron superiores al testigo (0 UFC/mL) con una sola excepción, en la cepa de origen de Chile en la concentración 10^6 UFC/mL, donde ambos obtuvieron un valor de 68.33 %, indicando que las cepas utilizadas en este trabajo de investigación tuvieron efectos favorables en la capacidad de germinación de las semillas de coliflor en esta condición de invernadero, esto debido al aporte de las diferentes hormonas que producen este género de bacterias, coincidiendo con De Bashan *et al.*, (2007), mostrando un efecto beneficioso sobre la capacidad de germinación; así mismo la baja germinación encontrada en la prueba muestra un efecto negativo por la presencia de agentes bióticos en el suelo y los cambios de temperatura del medio ya que no fue constante (Figura 4.9).

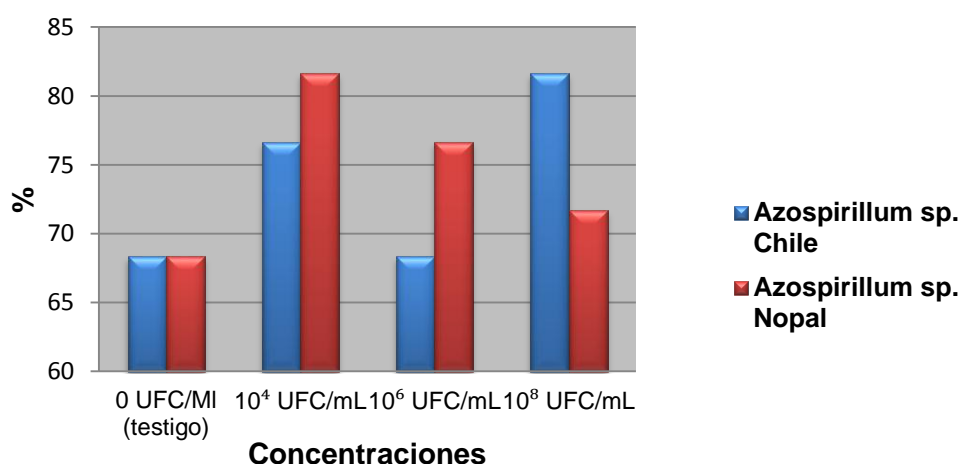


Figura 4.9 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PN en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

Con respecto a la variable PA, no existió diferencia estadística, sin embargo los valores de respuesta mostraron que la cepa de origen de Nopal numéricamente fue mejor que la de origen de Chile (Figura 4.10), sobre todo en las concentraciones 10^4 y 10^6 UFC/mL con 3.33 y 0 % respectivamente, sobresaliendo esta última al no

encontrar PA, mientras que en la concentración 10^8 UFC/mL en ambas cepas obtuvieron 3.33 %, a diferencia del testigo (0 UFC/mL) que obtuvo 6.66 %, siendo el valor más alto y el efecto más negativo a todas las concentraciones, contrario a la cepa de origen de nopal quien tuvo un efecto positivo al reducir el porcentaje de PA en las tres concentraciones.

En la cepa de origen de Chile, la concentración de 10^8 UFC/mL resultó tener menor valor entre las concentraciones estudiadas con 3.3 % de PA; a diferencia de 10^4 UFC/mL con 8.33 % quien resultó con el más alto valor (Figura 4.10); apreciando que la cepa de origen de Chile tuvo un mayor efecto sobre la anormalidad de las plántulas a bajas concentraciones, que a diferencia de las altas tiene un efecto positivo, resultando una disminución en el porcentaje PA, esto debido posiblemente a que a bajas concentraciones la cepa de origen de Chile produce grandes cantidades de hormonas que al acumularse pueden afectar la capacidad de germinación de la semilla, como lo mencionan Kapulnik *et al.*, (1985).

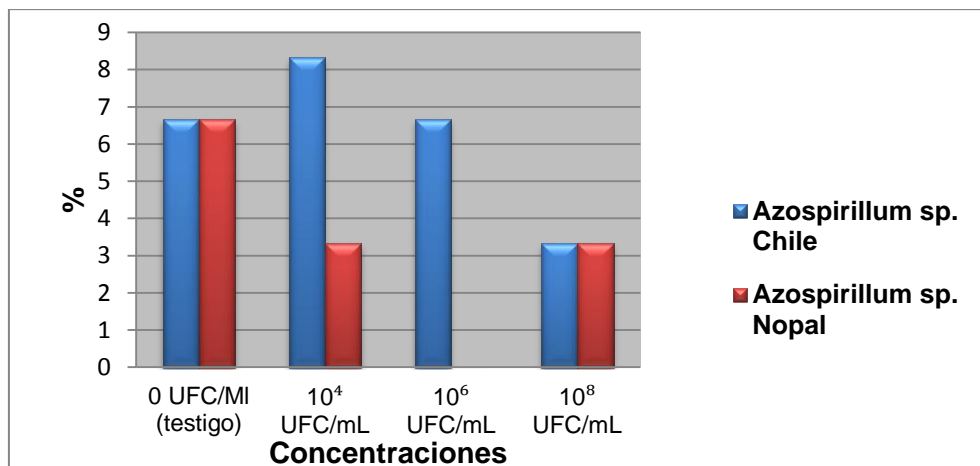


Figura 4.10 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable PA en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

De igual manera para la variable SSG, no hubo diferencias, aunque numéricamente la cepa de origen de Chile fue mejor que la de nopal en la concentración 10^8 UFC/mL con 15 %, mientras que a una de concentración 10^4 UFC/mL en ambas cepas obtuvieron un valor de 15 %, donde 10^6 UFC/mL junto con el testigo (0 UFC/mL) ambas con 25 % de SSG, resultando con un elevado número de semillas sin

germinar; hubo un efecto favorable en dos concentraciones 10^4 y 10^8 UFC/mL ya que en comparación con el testigo (0 UFC/mL) se logró disminuir el porcentaje de semillas sin germinar (Figura 4.11).

En la cepa de origen de nopal, la concentración 10^4 UFC/mL resulto con un bajo valor de 15 %, a diferencia del testigo (0 UFC/mL) y 10^8 UFC/mL quienes tuvieron el más alto valor con 25 % (Figura 4.11), marcando que a baja concentración se disminuye el porcentaje de semillas sin germinar, debido posiblemente a que a altas concentraciones esta cepa producen una gran cantidad de hormonas que al acumularse reflejaron el mismo comportamiento que la variable anterior.

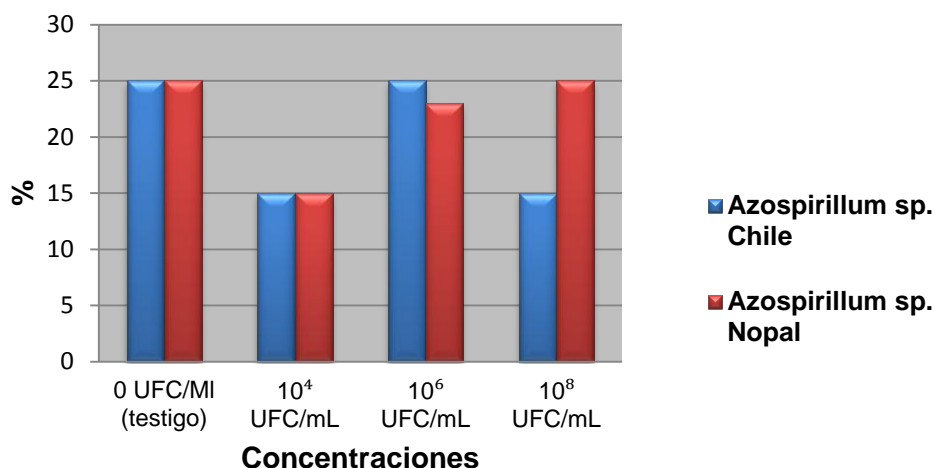


Figura 4.11 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en la capacidad de germinación en la variable SSG en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

4.2.2 Vigor

El análisis de varianza para vigor mediante la variable IVE, no mostro diferencias significativas en la fuente variación *Azospirillum sp.*, ni en la interacción *Azospirillum sp.* por Concentración, pero si hubo diferencias significativas en la fuente de variación Concentración, con un CV de 17.34 % como se muestra en el Cuadro 4.10, lo cual nos indica que alguna de las cepas a alguna concentración tuvo algún efecto sobre el vigor de la semilla de coliflor.

Cuadro 4.10 Cuadrados medios y significancia en la prueba de vigor en semillas de Coliflor tratadas con cepas de *Azospirillum sp.* de origen de Chile y Nopal en invernadero, 2013.

VIGOR		
Fuente de variación	Grados de libertad	IVE (No. de plántulas/día)
<i>Azospirillum sp.</i>	1	0.21 ^{NS}
Concentración	3	11.15 [*]
Azos. * Conc.	3	1.85 ^{NS}
Error Exp.	16	3.90
CV (%)		17.34

^{NS} = diferencia no significativa; ** = diferencia altamente significativa; * = diferencia significativa; CV=coeficiente de variación; Prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 0.05 %.

Prueba de comparación de medias entre concentraciones

La prueba de comparación de medias entre concentraciones, dio por resultado dos grupos estadísticos, donde las concentraciones de 10⁴, 10⁶ y 10⁸ UFC/mL formaron el primer grupo, sobresaliendo la de 10⁴ UFC/mL con 12.804 plántulas/día, en comparación con el testigo (0 UFC/mL) con 9.766 plántulas/día, quien se encontró en el segundo grupo junto con 10⁶ y 10⁸ UFC/mL como se muestra en el Cuadro 4.11, reflejando que la bacteria del genero *Azospirillum sp.* favoreció el índice de velocidad de emergencia de la semilla

Cuadro 4.11 Comparación de medias entre Concentraciones de *Azospirillum sp.* en vigor en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

Concentración	IVE (Plántulas/día)
0 UFC/mL (Testigo)	9.766 B
10 ⁴ UFC/mL	12.804 A
10 ⁶ UFC/mL	10.828 AB
10 ⁸ UFC/mL	12.177 AB

Nota: medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Interacción *Azospirillum sp.* por concentración

En la interacción cepas de *Azospirillum sp.* por concentraciones aplicadas en la variable IVE, ambas cepas de origen de Chile y Nopal resultaron con los valores más altos en todas las concentraciones en comparación con el testigo (9.75 plántulas/día), teniendo el valor más bajo de todos los tratamientos (Figura 4.12); sobresaliendo entre ellas, la cepa de origen de Nopal la cual resultó con la mejor emergencia en las concentraciones de 10^4 y 10^6 UFC/mL con 12.85 y 11.66 de plántulas/día respectivamente, mientras que la alta concentración dio el más bajo valor (10^8 UFC/mL con 11.66 plántulas/día).

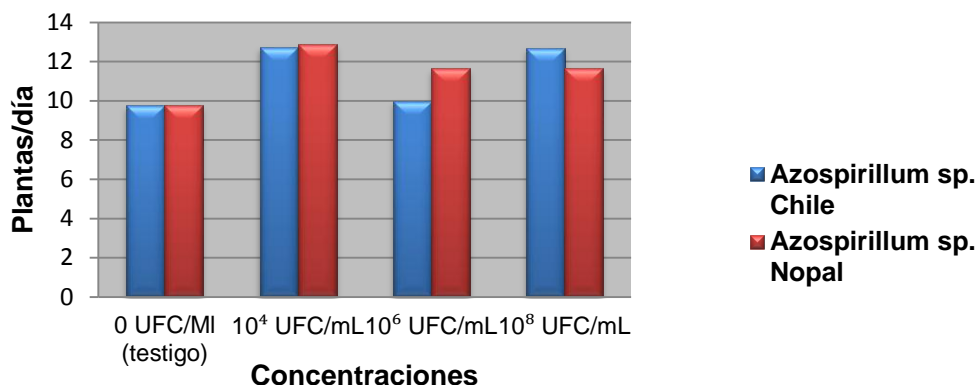


Figura 4.12 Medias entre cepas de *Azospirillum sp.* y concentraciones en vigor en la variable IVE en semillas de Coliflor en invernadero, 2013.

En el caso de la cepa de origen de Chile las mejores concentraciones fueron 10^4 y 10^8 UFC/mL con 12.74 y 12.68 plántulas/día respectivamente, siendo superiores a 10^6 UFC/mL con 9.99, por lo que esta cepa al aplicarse a baja concentración tiene un efecto positivo en el vigor de la semilla, obteniendo un mayor número de plántulas/día.

Por lo que se observó que ambas cepas mostraron un efecto favorable sobre el índice de velocidad de emergencia, ya que ambas obtuvieron valores en las tres concentraciones por encima del testigo, por lo que se puede decir que en invernadero estas cepas mostraron un efecto positivo aportando las diferentes hormonas producidas por esta bacteria.

VI. CONCLUSIONES

La aplicación de *Azospirillum sp.* de origen de chile y nopal no mostro efectos estadísticos en la capacidad de germinación de la semilla de coliflor, tanto en laboratorio como en invernadero.

La aplicación de *Azospirillum sp.* de origen de chile y nopal tuvieron efectos estadísticos en el vigor de la semilla de coliflor, en laboratorio en las variables IVE, PC y LMR sobresaliendo la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de chile, mientras que en invernadero en la variable IVE sobresalió la cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal.

La cepa de *Azospirillum sp.* de origen de chile tuvo efectos positivos al aplicarse a diferentes concentraciones en la capacidad de germinación y vigor de la semilla de coliflor en condiciones de laboratorio, sobresaliendo la concentración de 10^6 UFC/mL en PN, IVE, PC, LMH y LMR ; mientras que a la concentración de 10^4 UFC/mL tuvo mejores valores en PA y a 10^8 UFC/mL en SSG y PS.

La cepa de *Azospirillum sp.* de origen de nopal tuvo efectos positivos al inocularse a diferentes concentraciones en la capacidad de germinación y vigor de la semilla de coliflor en condiciones de invernadero, sobresaliendo la concentración de 10^4 UFC/mL en las variables PN e IVE; mientras que a una concentración de 10^6 UFC/mL fue mejor en PA y a 10^8 UFC/mL en SSG por obtener bajos porcentajes.

VII. LITERATURA CITADA

- Alamri A.S., Y.S. Mostafa. 2009. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. Saudi Journal of Biological Sciences 16(2):101-107.
- Alexandre G., S. Greer, L. Zhulin. 2000. Energy taxi is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 182(21):6042-6048.
- Arzanesh M., H. Alikhani, K. Khavazi, H. Rahimian, M. Miransari. 2010. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. Springer. World Journal Microbiol Biotechnol. 1-9.
- Bashan Y., M. E. Puente, M. N. Rodríguez, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato, S. Pedrin. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61:1938-1945.
- Bashan Y., G. Holguin. 1996. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30, 1225-1228.
- Bashan Y., P. Vazquez. 2000. Effect of calcium carbonate, sand and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils, Biol Fertil soils 30: p. 450-459. Disponible en: <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/ronaldpgpb8.pdf>.
- Bashan Y., L. de Bashan. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-acritical assessment. Adv. Agronomy 108:77-136.
- Baskin C. C., J. M. Baskin, 1998. Seeds-Ecology; Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, USA.

- Bergey's Manual. 1984. Bacteriología sistemática. Ed. I, vol. I, sección 2. En: Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.). Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofoma, control biológico, planta-microorganismo. Trillas, México. Pp 177-224.
- Besnier R. F. 1989. Semillas: biología y tecnología. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Burdman S., G. Dulguerova, Y. Okon, E. Jurkevitch. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. American Phitopath. Soc. 14:551-561.
- Canto M. J., A Medina y Flores. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum sp.* en plantas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* jacquín). Tropical and Subtropical Agroecosystems. México. Vol 4. 7p.
- Carvajal M., D. Velez. 1996. Estudio fenológico del brócoli, Quito (Ecuador). INAMHI. Nacimiento y precipitación, p. 3-4.
- Cassan F., S. Maiale, O. Masciarelli, A. Vidal, V. Luna, O. Ruiz. 2009. Cadaverine production by *Azospirillum sp. brasilense* and its posible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. European Journal of Soil Biology 45(1): 12-9.
- Casseres E. 1980. Producción de hortalizas. 3ª ed. San José (Costa Rica): Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola, p. 129 177, 310.
- Copeleand O. L. and B. M. McDonald. 1995. Principles of seed science and technology. Third edition. Chapman and Hall. New York, USA 409 p.
- Cotrina F. 1981. Cultivo de la coliflor, Hojas Divulgadoras (España). N° 21:1-28.
- Croes C. L., S. Moens, E. VanBastelaere, J. Vanderleyden, and K. W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J. Gen Microbiol. 139:2261-2269.

- De Bahsan L. E., G. Holguin, B.R. Glick, Y. Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Biotechnology Advances*.16:729-770
- 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.
- Diaz-Franco A., y M. A. Ortegón. 2006. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Revista Fitotecnica Mexicana* 29:63-67.
- Díaz V. P., C. R. Ferrera, S. J. Almaraz, R.G.G. Alcanta. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19:327-335.
- Diaz-Zoria, M. y M.V. Fernandez-Canigia. 2008. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology* 45(1):3-11.
- Díaz-Zorita, M. & M.V. Fernández-Canigia, 2008. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. Capítulo 10. Pp. 155-164
- Döbereiner J., I. E. Marriel, 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.
- Dobbelaere S., A. Croonenborghs, D. Thys, D. Ptacek, C. Labandera, J. Caballero, J. Aguirre, S. Burdman, S. Sang, J. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. Journal. Plant physiology.* 28:p. 871-879.
- Dobbelaere A., A. Thys, S. Vande, J. Vanderleyden. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in AIA production on wheat. *Plant and Soil.* 212:155-164.

- Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Santiago (Chile). (2001). Cultivos de hortalizas. Santiago, Chile, Editorial Universitaria.
- Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Santiago (Chile). (2004). Hortalizas de estación fría. Disponible en: www.puc.cl/sw_educ/hort049
- Guerrero T. 1993. Horticultura. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, p. 10-15.
- Gómez J. 1996. Sustitutos de la fertilización. Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p. 23-28.
- Gómez, J. 1986. Requerimientos ecológicos para algunos cultivos en el Ecuador. Quito, Ministerio de Agricultura y Ganadería. p. 26.
- Haahtela K., T. Wartiovaara, V. Sundman, and J. Skujins. 1981. Root-associated N² fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and Azospirillum strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:203-206.
- Hernández Y., Sogo, J. y M. Sarmiento. 1997. *Azospirillum* inoculation on *Zea mays*. *Cuban Journal of Agricultural Science.* 31:203-209.
- Hernández Y., M. Sarmiento, y O. García. 1996. Influence of *Azospirillum* inoculation model on grass performance. *Cuban Journal of Agricultural Science.* 30:219-226.
- Holt J. 1984. *Azotobacteraceae* In: Bergey's of systematic bacteriology. Baltimore : Williams and Wilkins, Vol. 1. p. 220-229.
- Ikuma, H. and K.V. Thimann, 1963. Action of Kinetin on photosensitive germination of lettuce seed as compared with that of gibberellic acid. *Plant Cell Physiol.*, 4:113-128.
- Kapulnik Y., M. Felman, Y. Okon y Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31:881-887.

- Kapulnik Y., M. Felman, Y. Okon y Y. Henis. 1985b. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil Biology and Biochemistry*. 17:509-515.
- Karszen, C. M., S. Zagorski, J. Kepezynski y S. P.C. Groot, 1989. *Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. Ann. of bot.*, 63: 71-80.
- Krarup, C. e I. Moreira. 1998. Hortalizas de estación fría. Biología y diversidad cultural. Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Santiago. En: http://www.puc.cl/sw_educ/hort0498; consulta: marzo 2014.
- Lewak, S. and A. A. Khan. 1997. Mode of action gibberellic acid and light on lettuce seed. *Plant Physiol.*; 60: 575-577.
- Limongelli. J. 1979. El repollo y otras crucíferas de importancia en la huerta comercial. Buenos Aires. Hemisferio Sur. p.45- 53, 60-115.
- Michiels, K. W., C. L. Croes , and J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen . Mricobiol.* 137:2241-2246.
- Moens S., K. Michiels, V. Keijers, F. Van leuven y J. Vanderleyden. 1995. Cloning, sequencing and phenotypic analysis of *laf 1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacterial.* 177:5419-5426.
- Moreno M. E., E. M. Vasquez, A. Rivera, R. Navarrete and F. Esquivel. 1988. Effect of seed shape and size on germination of corn (*Zea mays* L.) stored under adverse condition. *Seed Sci. Technol.* 26:439-448.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis químico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Autónoma de México. México. ISBN. Pp. 259 y 260.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Tercera Ed. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México (UNAM) México. 393 p.

- Nuez, F. 1999. Colección de semillas de coliflor y brócoli. Madrid. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, p. 5,13-18,23, 32,39.
- New, P. B., and I. R. Kennedy. 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17:299-309.
- Okon, Y., S. L. Albrecht, & R. H. Burris. 1976. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 128:p. 592-597.
- Okon, Y. 1982. Recent Progress in research on biological nitrogen fixation with non leguminous crops. *Phosphorous and Agriculture.* 82:3-8.
- Penot I., N. Berges, C. Guiguene, J. Fages. 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.
- Perry, D. A. 1972. Seed vigour and field establishment. *Horticultura Abstracts.* 42:334-342.
- Rodríguez C. E. A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44:p. 990-991.
- SAGARPA-SIAP. 2014. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Cierre de la producción Agrícola por cultivo.
- Schnak S. C., K.L. Weier 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.
- Schmidt E. L. 1979. Initiation of plant root microbe interactions. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: p. 355-376

- Smith R.L., S.C. Schank, J.R. Milam 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.
- Steenhoudt, O., J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated pects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487-506.
- Sundaram, S., A. Arunakumari y R. V. Klucas. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34:212-217.
- Tarrand J. J., N. R. Krieg and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species. *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.
- Tarrand M., N. Krieg y J.Döbereiner. 1974. The genus *Azospirillum*. In: N. Krieg and J. Döbereiner (eds). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* 8th. Edn. Williams and Wilkins, Baltimore. pp 94-104.
- Tigabú M. and P. C. Odén, 2001. Effect of scarification, gibberellie acid and temperature on seed germination of tow multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Sci. Technol.*, 29:11-20.
- Tyler, M.E., J. R. Milam, R. L. Smith, S. C. Schank, and D. A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol.* 25:693-697.
- Wani, S.P., S. Chandrapalaih, P.J. Dart. 1985. Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. *Experimental Agriculture* 21:175-182.
- Westby C. A., D. S. Cutshall & G. V. Vigil. 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 156:p. 1369-1372.
- Young J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, N. Y. 43-86 Pp.