

Efecto de la Inoculación de Cepas de *Azospirillum* sp. sobre Altura, Biomasa y Contenido de Nitrógeno en Genotipos de Maíz Forrajero

Rosalinda Mendoza Villarreal^{1*}, Sergio Rodríguez Herrera¹, Marco Aurelio Puente Flores² Arnoldo Oyervidez².

¹Departamento de Ciencias Básicas, ²Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. 25315. Saltillo, Coah., México. E-mail: rosalingdamendoza@hotmail.com (*Autor responsable).

Abstract

Forage maize is the main food in the diet of ruminants thus, it is necessary that it has both a nutritious quality, and a high yield; for this reasons it demands a chemical fertilization, as it is traditionally done. Nevertheless, for the time being there exist alternative s of organic fertilization like the biological one; for instance, bacteria of the *Azotobacter* and *Azospirillum* genera, and fungi like *mycorrhizae*. The objectives of this assay were: a) to isolate and to identify strains of *Azospirillum* sp. of three localities and b) to evaluate the effect of the inoculation of seed in two elite lines of forage maize with strains of *Azospirillum* sp. in height and N content in plant. Seed of 2 elite lines of forage maize was used, the CML-384 selected under low conditions of content of N and CML-321 with a normal content of N. The evaluated variables were: height of plant, fresh weight, and dry weight of foliage and root, and N content. An experimental completely randomized design was used. The statistical analysis was performed with the help of the SAS software. Forty strains of *Azospirillum* sp., from three localities: Torreón Coah., Celaya Gto., and Buenavista Coah. Were obtained and isolated, and it was shown that the best strains were numbers 4 and 21, since it is possible to associate them to different types of lines generating an increase in the content of N.

Key words: *Azospirillum*, fertilization, forage, *Zea mays* L.

Resumen

El maíz forrajero es el alimento principal de la dieta de rumiantes por lo cual es necesario que tenga calidad nutritiva y alto rendimiento; para esto se requiere de fertilización química, como se hace tradicionalmente. Sin embargo, actualmente existen alternativas de fertilización orgánica como la biológica, por ejemplo, las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* además de hongos como micorrizas. Los objetivos de este estudio fueron: a) aislar e identificar cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades y b) evaluar el efecto de la inoculación de semilla en dos líneas élite de maíz forrajero con cepas de *Azospirillum* sp. en la altura y contenido de N en planta. Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, la CML-384 seleccionada en condiciones de bajo contenido de N y CML-321 con N normal. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, peso fresco y peso seco de follaje y raíz y contenido de N. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial AXB, líneas y cepas, con 2 y 42 niveles respectivamente. Se logró el aislamiento y la identificación de 40 cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades: Torreón Coah., Celaya Gto. y Buenavista Coah. y se demostró que las mejores cepas fueron la 4 y la 21 ya que se pueden asociar a diferentes tipos de líneas provocando un incremento en el contenido de N.

Palabras clave: *Azospirillum*, fertilización, forraje, *Zea maíz* L.

Introducción

La producción de forrajes y granos requiere del manejo de estrategias en los sistemas tradicionales para la alimentación animal, sobre todo para los productores de carne o pie de cría que demandan forraje todo el año para el mantenimiento y producción de los animales.

Anteriormente el maíz forrajero se seleccionaba por el contenido de materia seca sin interesar la calidad nutritiva (Núñez *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos híbridos actualmente utilizados presentan rendimiento de grano y proporción de materia seca altos,

siendo el maíz forrajero la fuente de energía en la alimentación del ganado productor de leche.

Entre los insumos que requiere el cultivo se encuentran los fertilizantes con su respectivo costo, sin embargo para obtener un maíz forrajero de alta calidad es necesario utilizar dosis altas de fertilizantes químicos, que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo y los mantos freáticos, dicha contaminación puede afectar a cultivos posteriores y al consumidor.

Una alternativa para disminuir la fertilización química es la biofertilización con microorganismos, los cuales fijan N atmosférico (Bashan *et al.*, 1996) como se ha demostrado con rizobacterias como *Azospirillum* sp y *Pseudomonas ferruginosa* por separado y, en conjunto, en trigo (*Genus triticum*), y lo transforman en formas asimilables para las plantas, éstas a su vez proporcionan la fuente de C para los microorganismos llevando a cabo una asociación favorable para ambos organismos. Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizosfera, incluyendo cereales como maíz, trigo, sorgo, arroz, avena, pastos forrajeros, algunas especies de henequén y plantas cactáceas (Michiels *et al.*, 1989). De las especies más estudiadas en maíz se encuentra el *A. brasilense* que crece a una temperatura entre 35 y 37 °C, un pH óptimo entre 5.8 a 6.5 y utiliza ácidos orgánicos para su crecimiento (Eory *et al.*, 1995). Además produce sideróforos y fitohormonas como giberelinas, citocininas y auxinas a partir del triptófano, por lo que se le clasifica como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, de aquí su importancia agrícola (Lucangeli y Bottini, 1997).

Mendoza (1986) ha demostrado que cepas de *Azospirillum* sp. provocan cambios sobre el rendimiento y calidad de grano de maíz Lucio Blanco AN-361, comparando estos efectos con los de fertilización química bajo condiciones de invernadero y campo, concluyó que los mejores efectos en la fenología del cultivo (emergencia, floración, altura de planta y madurez fisiológica) fueron aquellos en los que se aplicó *Azospirillum* sp y *Azospirillum brasilense*.

Con la aplicación a la semilla, como formulaciones comerciales, se ha favorecido el amacollamiento, altura de planta, longitud de raíces, peso seco y número de granos Cracogna *et al.* (2003). Canto- Martin *et al.* (2004) inocularon semilla de chile habanero, encontrando una disminución en el tiempo de germinación y un incremento en el número de raíces a una concentración de 1 y 3x 10⁷ UFC mL⁻¹ además Kalpulnik (1996), encontró que existe una asociación no simbiótica en la zona de elongación de la raíz a concentración de 10⁶ a 10⁷ UFC mL⁻¹ incrementándose las raíces laterales favoreciendo la

absorción de agua y nutrientes.

Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: a) aislar e identificar cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades y b) evaluar el efecto de la inoculación de semilla en dos líneas élite de maíz forrajero con cepas de *Azospirillum* sp. en la altura y contenido de N en planta.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepas e inoculación de semilla

Se colectaron plántulas de maíz y trigo con raíz, en cada localidad; Torreón, Coah.; Celaya, Gto. y Buenavista, Coah., México. De las raíces de las plántulas colectadas, se aislaron 300 cepas de *Azospirillum* sp en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) por medio de una solución de NaCl al 0.85 %, se eliminaron las que no crecieron en medio NFb y rojo congo (Rodríguez-Cáseres, 1982), la tinción de Gram (-) y movilidad (+). Se clasificaron 40 cepas nativas como *Azospirillum*, además se utilizaron 4 cepas comerciales de *Azospirillum brasilense* como testigo (Cuadro 1). Una vez aisladas se colocaron dentro de un sustrato orgánico líquido, previamente disuelto con agua esterilizada, y se incubaron a 30 ± 1 °C por 72 h. Después se cuantificó la concentración de UFC mL⁻¹ por el método de dilución y se diluyó con agua esterilizada hasta obtener 10⁹ UFC mL⁻¹.

Se aplicó 1 mL de biofertilizante por gramo de semilla de maíz y se dejaron reposar por 2 h para que la semilla absorbiera la mayor cantidad de inóculo.

Cuadro 1. Cepas aisladas e identificadas como *Azospirillum* sp. de diferente origen.

Origen	Número de Cepas
Torreón, Coah.	1-17
Celaya, Gto.	18-26
Saltillo, Coah	31-40
Comercial	27-30

Desarrollo de plántulas de maíz

Se sembraron semillas de maíz, bajo condiciones de invernadero, inoculadas con la bacteria, en macetas de plástico, con suelo de bosque previamente esterilizado. Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, la Línea 1 seleccionada para N normal CML-321(Kikafunda *et al.*, 2001) y la Línea 2, seleccionada con bajo contenido de N CML-384 (Worku *et al.*, 2001). Una vez realizada la inoculación se sembraron 4 semillas en cada maceta. Se utilizaron 3 repeticiones por cepa y 2 líneas de maíz forrajero, con 240 macetas en total. Se tomaron lecturas de altura de planta (AP) cada semana durante un mes.

Posteriormente, las plántulas se retiraron del invernadero y se llevaron al laboratorio donde se separaron en raíz y follaje, y se pesaron en fresco en una balanza analítica. El peso se registró por separado, como peso fresco de raíz (PFR); y follaje (PFF). Después las plantas se secaron al sol durante 2 semanas para eliminar humedad, las muestras se volvieron a pesar y se registraron los datos como peso seco de raíz y follaje (PSR y PSF); finalmente se obtuvo la biomasa en cada tratamiento.

Determinación del contenido de N

Al mes de establecido el experimento se cortaron las plantas de cada tratamiento y repetición, se pesaron por separado la raíz y tallo en fresco, se colocaron en la estufa a 70 °C hasta eliminar el exceso de humedad, después se volvieron a pesar para obtener el peso seco de cada parte de la planta, cada muestra fue molida, y se determinó el contenido de N por el método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1980).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial AXB, líneas y cepas, con 2 y 42 niveles respectivamente. Los análisis se realizaron con ayuda del software estadístico SAS.

Resultados y Discusión

La línea CML-321, presentó mayor peso fresco y seco ($P \leq 0.01$), lo cual sugiere que el genotipo, fue la causa del incremento, sin embargo, la línea CML-384 fue seleccionada con bajo contenido de N (Cuadro 2). Lo anterior coincide con estudios realizados en Etiopía con

cepas nativas 22, 20 y 18 (procedentes de Celaya, Gto.) alcanzaron la mayor altura con respecto a los testigos comerciales ($P \leq 0.05$), sin embargo, la Línea CML-384 presentó baja altura (Cuadro 3). Algo similar ocurrió con la Cepa 17 procedente de Torreón, Coah., ya que en la línea 1 provocó una mayor altura y en la línea 2 baja altura ($P \leq 0.05$). Esto puede deberse a la dificultad de las cepas para expresar su genotipo y asociarse a las raíces de las líneas en un ambiente distinto al de su origen.

Por otro lado, la Cepa 1, procedente de Torreón Coah., provocó mayor altura en las líneas 1 y 2 respectivamente, además de presentar alturas superiores para los testigos y las cepas comerciales en ambas líneas ($P \leq 0.05$). Esto puede deberse a que *Azospirillum* sp. tiene la capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas en medios de cultivo, además de que el ácido indolacético producido por las bacterias puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas inoculadas conduciendo a su estimulación y crecimiento, como lo describen estudios anteriores (Bar y Okon, 1992; Lucangeli y Bottini, 1997).

Efecto de la Cepa

El Cuadro 4 muestra el contenido de N en plántulas de maíz. Las mejores cepas fueron la 25, 37, 4, 21 y 5; cada una de ellas presentó valores estadísticamente iguales que el testigo y las cepas comerciales ($P \leq 0.05$). En relación al testigo, las Cepas 25 y 37 presentaron una diferencia de 0.72 %. Lo cual indica una amplia diferencia para efectos de calidad de forraje. Las Cepas 4 y 5 provienen de Celaya Gto., la 21 y 25 de Torreón Coah., y la 37 de Buenavista Coah.

Cuadro 2. Peso fresco y peso seco de follaje y raíz de las líneas de maíz CML-321 y CML- 384, inoculadas a semilla con 40 cepas de *Azospirillum* sp.

Línea	PFF		PSF		PFR		PSR	
	Media		Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media
CML-321	16.79a		CML-321	1.65a	CML-321	3.18a	CML-321	0.72a
CML-384	11.79b		CML-384	1.26b	CML-384	2.19b	CML-384	0.47b

Comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.01$); PFF = peso fresco de follaje; PSF = peso seco de follaje; PFR = peso fresco de raíz; PSR = peso seco de raíz.

líneas de maíz seleccionadas con bajo nivel de fertilización las cuáles tampoco respondieron al nivel de N (Worku *et al.*, 2001).

Efecto de la interacción entre la cepa y la línea en altura de planta

La interacción entre la cepa y la línea presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). Las plántulas de la línea de maíz CML-321, cuya semilla fue inoculada con las

Estas cepas provienen de ambientes climatológicos distintos, sin embargo poseen características que hacen posible la fijación de N disponible en las líneas elite utilizadas.

Al igual que en este experimento, en estudios previos se ha demostrado que *Azospirillum* sp. aumenta el contenido de N, P, K y otros minerales en las plantas inoculadas. (Avivi y Feldman, 1982; Lin *et al.*, 1983; Murthy y Ladha, 1988; Pacovsky, 1985 y Caballero-Mellado *et al.*, 1992).

Cuadro 3. Altura de planta en plántulas de líneas de maíz élite CML- 321 y CML- 384, cuya semilla se inoculó con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26), Buenavista, Coah. (27-40), y cepas comerciales antes de la siembra.

Línea CML-321		Línea CML-384	
Cepa	Altura	Cepa	Altura
22	66.71a	1	63.98a
20	66.42a	2	63.72b
18	65.83a	3	63.51c
1	64.1a	4	62.77d
17	64.02a	5	61.39e
26	62.21a	6	59.63f
39	61.91a	7	59.5g
21	61.46a	8	59.38h
com28	61.39a	9	59.34h
37	61.06a	10	58.17h
com29	60.92a	11	57.49h
15	60.55a	12	56.67h
35	60.51a	13	56.65h
10	59.8a	14	56.56h
23	59.43a	15	56.32h
36	59.36a	16	55.64h
19	59.3a	17	55.14h
24	59.27a	18	55.02h
com30	59.24a	19	54.95h
7	58.87a	20	54.88h
9	58.63a	21	53.53h
16	58.17a	22	53.06h
2	58.13a	23	53.03h
4	57.83a	24	51.14h
33	56.39a	25	51.01h
Testigo 41	56.17 ^a	26	50.88h
31	54.95a	com27	50.63h
8	54.9a	com28	50.24h
32	54.27a	com29	49.45h
11	53.61a	com30	48.88h
6	53.5a	31	48.74h
38	53.42a	32	48.71h
12	51.62a	33	48.58h
34	51.53a	34	48.12h
3	50.8a	35	46.93h
com27	50.19a	36	46.17h
25	47.47a	37	45.81h
13	41.36a	38	45.31h
5	41.03a	39	43.25h
14	34.14b	40	41.91h
Testigo		42	39.48h

Comparación de medias de Tukey (P<0.05)

Cuadro 4. Contenido de N en plántulas de líneas de maíz élite CML- 321 y CML- 384, cuya semilla se inoculó con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26), Buenavista, Coah. (27-40) y cepas comerciales antes de la siembra.

Línea CML-321		Línea CML-384	
Cepa	N (%)	Cepa	N (%)
253.61a	22	3.12a	
373.61a	36	3.12a	
4	3.54a	7	3.11a
213.50a	18	3.10a	
5	3.46a	28 com	3.07a
203.44a	32	3.03a	
6	3.43a	23	3.02a
8	3.42a	2	3.01a
113.40a	16	2.98a	
403.35a	34	2.92a	
153.31a	38	2.92a	
143.28a	39	2.91a	
133.26a	41	2.89a	
243.26a	30 com	2.84a	
27com	3.25a	26	2.84a
9	3.25a	1	2.70a
3	3.23a	17	2.64a
103.18a	33	2.61a	
193.16a	29 com	2.56a	
123.14a	31	2.33b	
		35	2.25b

Comparación de medias de Tukey (Pd^{''} 0.05)

Efecto de la interacción entre la línea y la cepa en contenido de N

Para la línea CML-321 seleccionada con bajo contenido de N, la cepa 25 procedente de Celaya Gto., fue la mejor, ya que el contenido de N en plántulas fue 3.84%, además estadísticamente igual (Pd^{''} 0.05) que la cepa testigo, con un contenido normal del 2.62% de N y que la mejor de las cepas comerciales 3.33 % (Cuadro 5). La línea CML-384 presentó un contenido de N inferior al de la cepa 3 procedente de Torreón Coah., la cual presentó el mayor contenido 3.64 %. Algo similar ocurrió con las cepas 20, 24 (procedentes de Celaya Gto.), 8 y 6 (procedentes de Torreón Coah.). Lo cual indica que estas cepas son individuos especializados para asociarse con un tipo de línea en específico. Tanto la cepa 4 como la 21, lograron asociarse de manera similar con cada línea, lo cual puede deberse a que son razas que pueden asociarse a líneas con distintos genotipos.

Cuadro 5. Contenido de N en plántulas de líneas de maíz élite CML- 321 y CML- 384, cuya semilla se inoculó con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto. (18- 26), Buenavista, Coah. (27-40) y cepas comerciales antes de la siembra.

Línea CML-321		Línea CML-384	
Cepa	N (%)	Cepa	N (%)
25	3.84a	3	3.64a
8	3.68a	5	3.57a
20	3.65a	14	3.57a
4	3.64a	11	3.54a
21	3.59a	15	3.49a
6	3.56a	4	3.43a
24	3.54a	21	3.42a
36	3.42a	com27	3.38a
5	3.36a	25	3.37a
com28	3.33a	9	3.36a
13	3.3a	40	3.35a
19	3.29a	22	3.32a
11	3.26a	23	3.30a
17	3.24a	6	3.30a
37	3.22a	10	3.29a
18	3.19a	2	3.28a
7	3.17a	20	3.23a
9	3.15a	39	3.22a
16	3.15a	13	3.22a
12	3.14a	8	3.16a
15	3.13a	12	3.15a
com27	3.12a	Testigo 42	3.15a
32	3.12a	7	3.06a
10	3.06a	34	3.06a
38	3.06a	1	3.05a
35	2.35b	17	2.17a
33	2.34b	35	2.15a
com29	2.11c	31	2.13a
	2	37	2.01a
3	2.82a	32	2.95a
34	2.79a	33	2.93a
26	2.77a	26	2.91a
23	2.74a	com30	2.88a
2	2.74a	com28	2.82a
Testigo 41	2.62a	16	2.82a
39	2.6a	36	2.81a
31	2.52a	38	2.79a

Comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Conclusiones

Se logró el aislamiento e identificación de 40 cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades: Torreón Coah., Celaya Gto. y Buenavista Coah. Las mejores cepas fueron la 4 y la 21 ya que se pueden asociar a diferentes tipos de líneas de maíz, provocando un incremento en el contenido de N.

Literatura Citada

- AOAC. 1980. Official methods of analytical chemistry. 13th edition. Washington, D.C. USA.
- Avivi, Y., and M. Feldman. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. Isr. J. Bot. 31:237-245.
- Bar, T., and Y. Okon. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. Can. J. Microbiol. 39:81-86.
- Bashan, Y.; G. Holguin; R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. Terra 14 (2): 159-193.
- Caballero-Mellado, J., M. G. Carcaño-Montiel, and M. A. Mascarúa-Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13:243-253.
- Canto-Martín, J.C., Medina-Peralta S. y Morales Avelino. D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). Tropic. Subtropic. Agroecosyst. 4: 21 – 27
- Cracogna, M. F., Iglesias M. C., Díaz I., Gonzáles N. y Carvajal M. L. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: A-045
- Eory, V.J., Momo, F.R., Alvarez, M. 1995. Desarrollo y sobrevivencia de *Azospirillum* en la raíz y rizósfera del maíz a diferentes niveles de acidéz. Rev. Argent. Microbiol. 27(2):99-105.
- Kalpulnik, Y. 1996. Nonsymbiotic nitrogen-fixing soil microorganisms. In: Plant roots, the hidden half. Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi. Editors Marcel Dekker, Inc. New York. p. 757-767.
- Kikafunda, J., Kyetere, D.T., Bigirwa, G., Imanowa, I. and Nakayima, A. 2001. Response of maize varieties to nitrogen: selection for N-use efficiency in Uganda. Seventh eastern and southern Africa regional maize conference. p 233-240.
- Lucangeli, C. and Bottini, R. 1997. Effects of *Azospirillum* spp on endogenous gibberellins content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. Symbiosis 23(1):63-72.

- Michiels, K., Vanderleyen J, Gol A. V. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: A review. Biol. Fert. Soils 8:356-368.
- Mendoza V. R. 1986. Respuesta del maíz (*Zea maíz* L) variedad Lucio Blanco (AN-361) a la inoculación de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum* sp. en Derramadero Coahuila. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. 81
- Murthy, M. G., and J. K. Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant Soil 108:281-285.
- Núñez, H.G., E. F. Contreras G, R. Faz C y R Herrera. 1999. Selección de híbridos para obtener mayor rendimiento y alto valor energético en maíz para ensilaje. In: Componentes tecnológicos para la producción de ensilados de maíz y sorgo. SAGAR-INIFAP-CIRNOC-CELALA. 2-5
- Pacovsky, R. S., E. A. Paul and G. J. Bethlenfalvay. 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 85:145-148.
- Peña, R. A., G. Núñez H y F. Gonzáles C. 2002. Potencial forrajero de poblaciones de maíz y relación entre atributos agronómicos con la calidad. Téc. Pecu. Mex. 40:215-228
- Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.
- Worku, M., Tuna, H., Abera, W., Wolde, L., Diallo, A., Afriyie, T. S., Guta, A. 2001. Developing low N tolerant maize varieties for mid altitude subhumid agro-ecology of Ethiopia. Seventh eastern and southern Africa regional maize conference. p197-201.
-