

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**



**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum sp* EN SEMILLAS DE  
CINCO GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO**

**Por:**

***Gisel Esperanza Morales Espinoza***

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Buenavista, saltillo Coahuila, México

Octubre 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA**

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Azospirillum sp* EN SEMILLAS DE  
CINCO GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO.**

**POR:**

*Gisel Esperanza Morales Espinoza*

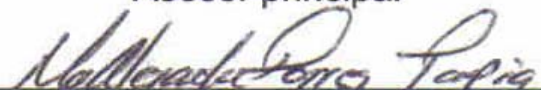
**TESIS**

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador, como  
requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobado por el Comité de Tesis:

Asesor principal

  
M.C. M. Alejandra Torres Tapia

Sinodal

  
Dr. Víctor M. Zamora Villa

Sinodal

  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coordinador de la División de Agronomía

  
Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"

División de Agronomía  
Coordinación

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Octubre 2008

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico principalmente a Dios que nunca me dejo sola, por ser mi mejor confidente y que siempre me dio señales de fe y esperanza, gracias Dios que me permitiste concluir con salud y goce una de mis metas más anheladas.

### **A mis padres**

Con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mi carrera profesional siendo para mí la mejor herencia.

### **A mi madre; María Nieves Espinoza Ceballos**

Que es el ser más maravilloso del mundo gracias por el apoyo moral, por tu cariño y comprensión que desde pequeña me has brindado, por guiar mi camino y estar siempre junto a mí en los momentos más difíciles.

### **A mi padre; Vicente Morales Díaz**

Porque desde pequeña ha sido para mí un hombre grande y maravilloso que siempre he admirado.

Gracias por guiar mi vida, esto ha hecho de mi lo que soy.

Con amor, respeto y admiración.

### **A mis hermanos**

Claudia Alejandra

Monica Carolina

Iris del Carmen

Helmer Vicente

Gracias por su apoyo, por su confianza y por ser mis mejores amigos que desinteresadamente fueron motivo de mi superación, los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTO**

A la M.C Alejandra Torres Tapia por enseñarme que la preparación, el empeño y la confianza son pieza clave para alcanzar lo propuesto, por su amistad y confianza por ello con todo el respeto que me merece. Gracias.

Al Dr. Víctor M. Zamora Villa por su valiosa cooperación en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal por su cooperación en la revisión de este trabajo.

A la bióloga Sofía Comparan Sánchez que siempre me brindo su confianza y por apoyarme en todo momento.

Al Ing. Manuel Burciaga Vera por brindarme su amistad y apoyo en todo momento.

A todas aquellas personas que siempre llegaron a tener una palabra de aliento en momentos difíciles.

A la UAAAN porque de ella llegue a recibir muchas satisfacciones y entre ellas, la realización de mi persona como profesionista.

## INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURA.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Fertilización.....	4
Fertilización química.....	5
Efectos de la fertilización química.....	5
Fertilización orgánica microbiana.....	5
Efectos de la fertilización orgánica microbiana.....	6
Bacteria del genero <i>Azospirillum</i> .....	6
Clasificación taxonómica y características de la bacteria.....	7
Efectos positivos a la inoculación con <i>Azospirillum</i> .....	8
Calidad de semillas.....	9
Germinación.....	9
Vigor de la semilla.....	11
Envejecimiento acelerado (EA).....	12
Longitud media de plúmula (LMP).....	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
Descripción del área experimental.....	14
Material genético.....	14
Aislamiento de la bacteria.....	15
Identificación de la bacteria.....	16
Inoculación de <i>Azospirillum sp.</i> .....	16
Tratamientos.....	16
parámetros a evaluar.....	17
Capacidad de germinación (CG).....	17
Plántulas normales (PN).....	17
Plántulas anormales (PA).....	17
Semillas sin germinar (SSG).....	18
Vigor (envejecimiento acelerado).....	18
Longitud media de plúmula (LMP).....	18
Peso seco (PS).....	18
Diseño experimental.....	19
Análisis estadístico.....	19
Comparación de medias.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Capacidad de germinación.....	20
Plántulas normales (PN).....	20
Plántulas anormales (PA).....	21
Semillas sin germinar (SSG).....	22
Longitud media de plúmula (LMP).....	23
Peso seco (PS).....	24

Envejecimiento acelerado.....	25
Longitud media de plúmula después del envejecimiento acelerado.....	28
Peso seco después del envejecimiento acelerado.....	28
CONCLUSIONES.....	30
LITERATURA CITADA.....	31

## ÌNDICE DE CUADROS

3.1	Material genético.....	15
4.1	Análisis de varianza y prueba de medias para las variables evaluadas en semillas de cinco genotipos de trigo en la capacidad de germinación.....	20
4.2	Cuadros medios del análisis de varianza y comparación de medias para las variables evaluadas en semillas de cinco genotipos de trigo almacenadas tratadas y sin tratar.....	26

## ÌNDICE DE FIGURAS

4.1	Respuesta del efecto de los tratamientos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo en la capacidad de germinación.....	22
4.2	Comportamiento de la longitud de plúmula de semillas de genotipos en los cinco materiales de trigo.....	24
4.3	Comportamiento del peso seco en semillas nuevas y almacenadas con y sin tratamiento químico.....	25
4.4	Comportamiento del efecto de los tratamientos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo almacenada.....	27

## INTRODUCCIÓN

La industria semillera ha crecido considerablemente a nivel mundial, convirtiéndose en una alternativa de mantener, proteger y cuidar la viabilidad del germoplasma mexicano utilizando tecnología en los diferentes procesos, entre ellos el uso de fertilizantes en el manejo agronómico para su reproducción y aplicación de productos a base de hormonas vegetales conocidas como fitohormonas.

Existen una gran diversidad de fertilizantes clasificados en inorgánicos y orgánicos su diferencia denota que los primeros provienen de reacciones químicas principalmente de yacimientos mineros, no son renovables y se convierten en un contaminante tóxico al medio ambiente, mientras los fertilizantes orgánicos son de origen natural, biodegradables y pueden funcionar como fitohormonas, un ejemplo de ello los generados por microorganismos.

En los últimos años se ha mostrado un creciente interés en la aplicación de fertilizantes orgánicos de origen microbiano incorporados como tratamientos a la semilla. Sus actividades biológicas y microbiológicas en los suelos desempeñan un papel de gran importancia en cultivos de alto rendimiento mediante su inoculación. Estas bacterias son aisladas de cultivos como cereales, pastos forrajeros y recientemente de cactáceas, presentan efectos favorables en la producción desde la germinación y en el desarrollo de las plantas en la velocidad de crecimiento de raíces, longitud y densidad (Okon and Labandera-González, 1994).

Un ejemplo de ello es la bacteria del género *Azospirillum sp.* organismo gram negativo que habita en la rizósfera del suelo, estimula la formación de raíces, fija nitrógeno (N) de vida libre, es capaz de incrementar



la velocidad de germinación en cereales (Boddey y Dobereiner, 1988), favorece la emergencia hasta 50 % en pastos (Esqueda et al., 2004), promueve la producción de auxinas e incrementa la tasa de crecimiento aérea provocando una mayor absorción de agua y nutrientes. En estudios recientes se presentaron efectos favorables a la aplicación de *Azospirillum* al inicio del proceso de germinación en algunos cultivos (Fallik et al., 1998).

El trigo es uno de los cultivos importantes en el desarrollo económico, el más cultivado por ser fuente de alimento y como forraje destinado a la alimentación animal. En su sistema de producción de semillas existen algunos procesos importantes a considerar para su comercialización, el tratamiento químico que ayuda a la protección de posibles patógenos y el almacenamiento quien marca la conservación de la calidad fisiológica expresado en porcentaje de germinación. (SNICS, 2006). Con base a lo anterior se planteo el siguiente objetivo e hipótesis.

**Palabras claves:** *Azospirillum sp*, captan, fertilización, trigo harinero.

## **Objetivo**

- Evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum sp* en la calidad fisiológica de semillas con y sin tratamiento químico de cinco genotipos de trigo harinero.

## **Hipótesis**

- El tratamiento químico no limita el efecto de la inoculación en la calidad de la semilla.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Fertilización

En México, la práctica de fertilización más común en trigo es la aplicación de nitrógeno en el momento de la siembra, con la posibilidad de agregar otra dosis al final de macollaje. En etapa temprana se refleja con mejores rendimientos y en etapas tardías en mejorar la cantidad y calidad de las proteínas en el grano (Sarandón and Caldiz 1990; Sarandón and Gianibelli, 1990).

La fertilización tiene como objetivo primordial permitir que la planta exprese su máximo potencial productivo para obtener una alta rentabilidad y lograr con esto una alta producción del cultivo, pero el incremento de fertilizantes convencionales durante las últimas décadas dio origen a procesos de transformación en el medio ambiente produciendo alteraciones físico-químicas y biológicas.

Además, cuando una determinada especie es cultivada año tras año en un mismo suelo provoca una reducción de uno o varios nutrientes, y es preciso reponerlos con la aplicación de fertilizantes adecuados que estimulen el crecimiento de las plantas. Se menciona que con la aplicación de fertilizantes químicos complementados con microorganismos da resultados favorables con la facilidad de adquirir mayores nutrientes y mejorar el estado fisiológico del cultivo. El caso más conocido es la interacción entre leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* (Gibson and Nutman, 1960; Pate, 1973) que ayuda a la fijación biológica de nitrógeno (Racca, 2003).

## **Fertilización química**

Los fertilizantes químicos aportan nutrientes esenciales a las plantas, hay tres sustancias principales en su composición: el nitrógeno, el fósforo y el potasio las cuales son las más importantes en el crecimiento vigoroso de las plantas y necesarias por su fácil reducción en el suelo.

Los fertilizantes pueden presentar efectos positivos indirectos en el medio ambiente natural cuando se tiene un uso adecuado de ellos (Massaro, 2004), permitiendo intensificar la agricultura en los terrenos existentes y reduciendo la necesidades de expandirse hacia otras tierras que puedan tener usos naturales o sociales distintos.

## **Efectos de la fertilización química**

Los fertilizantes de origen sintético sólo suplen la parte nutricional de las plantas y no tienen efectos benéficos en la condición física del suelo.

Los fertilizantes son indispensables a las exigencias de altos niveles de productividad por el mercado global y a la carencia natural de nutrientes, sin embargo, su uso provoca impactos negativos en el medio ambiente tales como: degradación de suelos y contaminación de acuíferos; por ello es necesario un uso sustentable de los fertilizantes sin afectar el medio desarrollando nuevas tecnologías y planes de fertilización como la combinación de fertilizantes químicos y orgánicos, Rodríguez *et al.* (1996).

## **Fertilización orgánica microbiana**

La utilización de fertilizantes orgánicos es una práctica que ha despertado sumo interés en los últimos años ya que radica en su relación con numerosas propiedades del suelo permitiendo un mejor desarrollo del cultivo.

Los fertilizantes orgánicos de origen microbiano del suelo son incorporados al cultivo por diversas vías sobre todo por semilla, resultando favorable su acción.

Las bacterias del género *Azospirillum* obtenidos de la rizosfera de las plantas se le atribuyen propiedades de gran interés como son la disposición de nitrógenos así como la penetración de los nutrientes en las plantas, además de no perjudicar al medio ambiente, brindar una oportunidad más para los agricultores y ser un nuevo mecanismo de fertilización (García, 1994).

### **Efectos de la fertilización orgánica microbiana**

Varios microorganismos del suelo comunes en la rizosfera son capaces de producir cantidades de fitohormonas, producción que tiene un pronunciado efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Bellone y Bellone (2001), mencionan que *Azospirillum spp.* es una rizobacteria fijadora del nitrógeno del aire que promueve el crecimiento cuando es inoculada especialmente en gramíneas. Salamone y Nelson (2001) comprobaron efectos benéficos directos sobre el crecimiento vegetal de las rizobacterias productoras de fitohormonas.

### **Bacteria del genero *Azospirillum***

Después del descubrimiento de la asociación simbiótica de la bacteria *Rhizobium*, se encontró el genero *Azospirillum* habitante en los suelos de los cereales y en la superficie de las raíces. Este género proporciona nitrógeno necesario a la planta, reduce el uso de fertilizantes químicos y aumenta el rendimiento de los cereales (Day y Dobereiner, 1976).

## **Clasificación taxonómica y características de la bacteria**

La clasificación del genero *Azospirillum* sp. realizada por Tarrand *et al* (1978), para sustituir el nombre de *Spirillum* describiendo su división en las especies basada en el manual de Bergey's (1984):

<b>Categoría</b>	<b>Clasificación</b>
Reino	Procaryote
División	Gracillicute
Clase	Scotobacteria
Familia	No existe
Genero	Azospirillum
Especie	Spp.

Las bacterias del genero *Azospirillum.*, son gram negativas, promueven el crecimiento vegetal deseable para lograr cultivos de alta productividad, capaz de incrementar la velocidad de germinación en semillas de cereales (Boddey y Dobereiner, 1988), favorecen la emergencia en pastos en 50 % (Esqueda et al., 2004) estimulan la formación de raíces, son fijadores de nitrógeno (N) de vida libre, habitan y se desarrollan en grandes cantidades en la rizósfera del suelo caracterizada por presentar una alta concentración de nutrientes en comparación con otros suelos por la presencia de compuestos liberados en las plantas (Rovira, 1973). El *Azospirillum* promueve la producción de auxinas donde la tasa de crecimiento aérea incrementa y existe una mayor absorción de agua y nutrientes. Se ha documentado la potencialidad de la asociación entre esta bacteria y los cultivos para aumentar la producción y tener efectos favorables en el crecimiento de cultivo como mijo, arroz, y trigo (Okon, 1985; Tien *et al.*, 1979; Bashan *et al.*, 1990).

### **Efectos positivos a la inoculación con *Azospirillum*.**

Los mecanismos que explicarían las respuestas en desarrollo y producción de los cultivos a la inoculación con *Azospirillum sp.* pueden ser directos o indirectos. Directos al favorecer a las plantas mejorando su nivel de nutrición, facilitar la disponibilidad de nutrientes o incrementar la superficie de absorción de las raíces y los indirectos a través de la interacción con otros microorganismos al facilitar desarrollo normal de las plantas (Dobbelaere et al., 2003).

Algunos de estos microorganismos han sido eficientemente aislados y multiplicados, permitiendo la formulación de inoculantes para su aplicación en producción de cultivos (Bashan, 1998). Algunos antecedentes muestran efectos en la fijación libre del nitrógeno atmosférico, la producción y liberación de hormonas promotoras del crecimiento radical (ej. auxinas, giberelinas, citoquininas), y de enzimas tales como las pectinolíticas, distorsionando la funcionalidad de células de las raíces y el aumento en la producción de exudados y promoviendo al crecimiento de otros organismos rizosféricos (Bashan y Levanony, 1990; Okon y Labandera-González, 1994).

Es bien conocido que las bacterias rizosféricas tienen un efecto benéfico para el crecimiento de las plantas (Döbereiner 1992; Baldani *et al.*, 1997; Mantelin and Touraine, 2004). Por ese motivo las rizobacterias han sido ampliamente difundidas como alternativa para reducir el uso de agroquímicos o fertilizantes con la finalidad de disminuir costos y contaminación ambiental (Dobbelaere *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2002; Kozdroj *et al.*, 2004).

## **Calidad de semillas**

La calidad de semilla puede ser vista como un patrón de excelencia que va a determinar el desempeño de la semilla en la siembra o en el almacén (Hampton, 2001).

Las semillas almacenadas por algún tiempo o en malas condiciones físicas presentan bajos índices de vigor, germinación y de sanidad provocados por la presencia de organismos patógenos, por ello resulta esencial la aplicación de tratamiento químico a la semilla para una buena conservación, emergencia y desarrollo de la planta.

Los tratamientos de semillas son desinfectantes químicos aplicados antes de sembrarlas y evitan una gran cantidad de enfermedades en campo.

Los organismos patógenos se encuentran tanto en la semilla como en el suelo, atacando a la misma y los retoños jóvenes, causan putrefacción en ella y daño al momento de su germinación, el uso apropiado de tratamientos destruiría tales organismos protegiendo y dando lugar a mejores plantas saludables.

Los tratamientos químicos pueden aplicarse en forma de polvo, lechada o líquido y depende del tiempo de acción del producto una vez aplicado a la semilla.

### **Germinación**

El proceso de germinación, es esencialmente la reiniciación del crecimiento del embrión una vez superado el período de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas, la semilla es capaz de someterse a estrés energético y poder dar buena respuesta de germinación, así como tener una buena emergencia en campo (Internacional seed testing / Association, 1996).



Para que la semilla cumpla con su objetivo es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por si misma y, finalmente convertirse en una planta adulta. Todo ello comprende una serie de procesos metabólicos y morfogenéticos cuyo resultado final es la germinación de las semillas.

Varias definiciones de germinación de la semilla han sido propuestas, y es importante entender sus distinciones.

Para el fisiólogo de semillas, la germinación es definida como la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla.

Para el analista de semillas, la germinación es “la emergencia y desarrollo del embrión de la semilla de aquellas estructuras esenciales según el tipo de semillas en cuestión (Association of Official Seed Analysts, 1981).

Otros consideran la germinación como el crecimiento activo por el embrión dando como resultado la rotura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una planta joven. Por lo tanto, todas las definiciones incluyen alguna medida del desarrollo de una plántula, aunque ocurre esto subsiguiente al evento de germinación.

En los laboratorios de semillas es difícil conducir pruebas de germinación con diferentes temperaturas al mismo tiempo, y por esa razón Arse, (1965) publicó un trabajo referido a una mesa con gradientes de temperatura, donde indica que ésta representa una gran utilidad en la investigación, porque además de proveer un amplio rango de temperaturas que pueden ser ajustadas fácilmente, permite reproducir el experimento con exactitud y precisión.

Las pruebas de germinación son utilizadas comúnmente para determinar la viabilidad de la semilla. La prueba de germinación es una valoración y tiene ciertas limitaciones como estimación universal de la calidad de la semilla (Copeland y McDonald. 1985).

La prueba de germinación o porcentaje de plántulas normales se emplean en los programas de certificación de semillas como un indicador de la calidad fisiológica de los lotes, que permite la máxima expresión del potencial de germinación (AOSA, 1983).

La aplicación de *Azospirillum* estimula la germinación y desarrollo vegetal en algunos genotipos debido a que cada especie crea una rizósfera con características únicas que pueden neutralizar las funciones de estas bacterias o inhibir su crecimiento. (Canto-Martín *et al.*, 2004).

### **Vigor de la semilla**

El vigor en semillas tiene muchas definiciones, según Moreno (1996) es la suma total de aquellas propiedades que determina el nivel potencial de actividad y comportamiento de la semilla o partida de semillas durante la germinación y la emergencia de plántulas.

McDonald (1980) define vigor de semilla como aquellas propiedades de la semilla que determinan el potencial para una rápida emergencia uniforme y crecimiento normal de la semilla bajo un amplio rango de condiciones de campo.

Por otro lado la AOSA (2002) señala que el vigor de la semilla incluye procesos y reacciones bioquímicas durante la germinación con reacciones enzimáticas y actividad respiratoria, velocidad y uniformidad de la emergencia y crecimiento de las plántulas en el campo, la habilidad de las plántulas para emerger bajo condiciones de campos desfavorables.

El vigor es una característica fisiológica determinada por el genotipo y modificada por el ambiente, que gobierna la capacidad de una semilla para producir rápidamente una plántula en el suelo y el límite en el cual la semilla tolera una gama de factores ambientales.

Copeland (1976), determinó una serie de conceptos que han surgido para expresar el significado de vigor en términos de semillas plántula y planta desarrollada.

- Rapidez de germinación
- Uniformidad de germinación y desarrollo de la planta bajo condiciones no uniformes.
- Habilidad para emerger a través de la corteza del suelo.
- Germinación y emergencia de plántula en suelo helado, húmedo o infestado por patógenos.
- Desarrollo morfológico normal en plántulas.
- Producción en campo y capacidad de almacenamiento bajo condiciones optimas o adversas.

La influencia del vigor puede persistir a través de la vida de la planta y afectar la producción (Perry, 1972).

### **Envejecimiento acelerado**

Esta prueba fue desarrollada por Delouche (1995) para predecir la capacidad de almacenamiento de la semilla.

El envejecimiento acelerado (EA), es un método que consiste en exponer las semillas por cortos períodos de tiempo a dos variables ambientales: alta humedad y alta temperatura, las cuales causan un rápido deterioro de la semilla. Los lotes de semillas de alto vigor resistirán estas condiciones de estrés extremas y la tasa de deterioro es baja en comparación con aquellos lotes de bajo vigor (AOSA, 1983).

Las condiciones ambientales a las cuales estarán expuestas las semillas dependen de la especie, según las reglas de la AOSA. Estas condiciones se asumen como similares a las que ocurren durante el envejecimiento natural de las semillas.

### **Longitud media de plúmula**

La tasa de crecimiento se considera como una prueba de vigor al tener implícito dos términos que forman parte de la definición de vigor en semillas, estos son la rapidez y uniformidad de germinación (AOSA, 1983).

La uniformidad de crecimiento puede medirse a través de la variabilidad que presente un lote semillas. Un lote con un alto porcentaje de semillas muertas se considera de baja calidad, en cambio un lote con un alto porcentaje de semillas viables no quiere decir que sea de buena calidad ya que si posee una alta variabilidad habría un rango amplio de tiempo desde el comienzo al término de la germinación, originándose, plántulas de tamaños variables (Perry, 1982).

La longitud media de plúmula obtenida al final de un periodo y comparado con el testigo de alto vigor, permite calificar el vigor de diferentes lotes, Torres *et al* (2006) mencionan que en Chile piquen no afecta la inoculación de *Azospirillum sp.* en este parámetro, siendo las longitudes muy similares al testigo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del área experimental

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas (CCDTS), Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

### Material genético

Fueron utilizados cinco materiales de trigo, cuatro comerciales y una línea experimental del Programa de Cereales de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” producidos en el ciclo otoño-invierno 2006 e identificados en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Identificación de los cinco materiales de trigo (*triticum aestivum*) evaluados con la inoculación de *Azospirillum spp.*

Identificación del genotipo	Genotipo
G1	Mochis
G2	Pavón
G3	Bacanora
G4	AN-388
G5	Gálvez

## Aislamiento de la bacteria

Las plántulas fueron lavada con agua corriente para eliminar restos de tierra, después se les cortó el tallo dejando únicamente las raíces secundarias, éstas fueron colocadas en cajas petri estériles y se lavaron con alcohol al 95% por un minuto, pasado éste tiempo se retiro el alcohol para ser lavadas con agua estéril (3 veces), se retiro el agua y las raíces secundarias identificadas se colocaron en tubos de ensaye de 18 x 150 mm que contienen 10ml de solución salina (NaCl 0.085%) previamente esterilizado, se dejaron macerar por 24 horas a temperatura de 25°C.

Posteriormente se preparó el medio selectivo NFb Dobereiner y Day (1975), cuya composición es la siguiente:

### Medio NFb

COMPOSICIÓN	g/LT
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.02
NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.02
FeCl <sub>3</sub>	Trazas
Malato de Sodio	5.0
Agar	20.0
Azul de Bromotimol	0.5 (Alcohol)

Las sales se disolvieron en 500ml de agua destilada se añadió azul de bromotimol (5 gotas) ajustando el pH a 6.8 con hidróxido de sodio (0.1N) y posteriormente el medio se colocó en una parrilla de calentamiento y agitación mecánica para mezclar todos los componentes, después se precedió a esterilizar en olla de presión a 15 lb por 15 minutos; ya

esterilizado el medio se repartió en cajas petri previamente esterilizadas, y se esperó a que solidificara para ser utilizado.

### **Identificación del genero *Azospirillum*.**

Los tubos que contenían la solución salina y las raicillas se agitaron manualmente y se tomó una pequeña cantidad con el asa de platino y se sembró por estrías en las cajas petri que contenían el medio NFb, dichas cajas se incubaron a 28°C por 72 horas.

Trascurrido el tiempo las colonias que se desarrollaron en el medio NFb fueron seleccionadas por la pigmentación que presentan (amarilla, anaranjada y crema), una colonia por cada caja petri que contenía agar nutritivo, después se incubaron a 28°C por 72 horas, para aislar la bacteria del genero *Azospirillum*.

### **Inoculación de *Azospirillum sp.***

Se utilizaron cepas de *Azospirillum sp.* ( $10^6$  bacterias mL<sup>-1</sup>), aislada de raíces de trigo de Buenavista Coahuila y reproducidas en NFb y agar rojo congo a 28° C. por 72 horas. Se determinó la concentración por el método de dilución en placa y se diluyó a  $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>, de la emulsión preparada se tomaron 10 ml y se mezclaron con 250 grs. de semillas en cada tratamiento.

### **Tratamientos**

Para el planteamiento de tratamientos se tomaron 250 gramos de semilla de cada material considerando cuatro tratamientos: 1) Semillas inoculadas con  $10^6$  bacterias mL<sup>-1</sup> de *Azospirillum spp.*, 2) Semillas tratadas con tratamiento químico (captan) a una dosis recomendada de 1 g/ L por Kg más la inoculación con *Azospirillum spp* al  $10^6$  bacterias mL<sup>-1</sup>., 3) Semillas sin tratamiento químico (captan) y sin aplicación de *Azospirillum spp.* consideradas como el testigo y 4) Semillas con tratamiento químico (captan) sin inoculación.

## **Parámetros evaluados**

### **Capacidad de germinación (CG)**

Esta prueba fue desarrollada por la ISTA (1999), con algunas modificaciones, sembrando 25 semillas por tratamiento de cada material con cuatro repeticiones cada una sobre papel anchor humedecido con agua, colocando otra hoja de papel anchor húmedo encima de las semillas sembradas, enrollando en forma de tacos, identificados de acuerdo a la muestra y el número de repetición con lápiz tinta. Colocando los tacos dentro de una bolsa plástica transparente para evitar la pérdida de humedad, finalmente llevadas a una cámara de germinación Seedburo Equipment a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. Después de seis días se evaluaron las plántulas normales, anormales y semillas sin germinar o muertas, conforme a la AOSA (1992).

### **Plántulas normales (PN).**

Se consideraron como aquellas que manifestaron un mejor desarrollo de sus estructuras esenciales; radícula e hipocotilo, tomando como criterio un mínimo de 2 centímetros para considerar como plántula normal a los seis días, expresado en porcentaje.

### **Plántulas anormales (PA).**

Las plántulas anormales, fueron aquellas que presentaron deficiencias en su estructura, lo que le impediría su desarrollo normal, presentando características como pobre desarrollo de la raíz y plúmula débil. El resultado fue expresado en porcentaje.



### **Semillas sin germinar (SSG).**

Las semillas que no presentaron una emergencia o cambios en su estructura, como la presencia de la testa rota, fueron consideradas como semillas sin germinar. El resultado fue expresado en porcentaje.

### **Vigor (Envejecimiento acelerado)**

Se utilizó el método de la AOSA (1992), que consta de un vaso de precipitado conteniendo 100 mL de agua para llevar a condiciones de  $\pm 95\%$  en humedad relativa, introduciendo un soporte con malla plástica sosteniendo 100 semillas de cada material y tratamiento. Para evitar cualquier pérdida de humedad dentro del frasco, se tapó con un plástico y colocando una liga. Los vasos se colocaron dentro de una cámara VWR Scientific por un tiempo de exposición de 5 días a 39 °C. Al finalizar el periodo de envejecimiento se sacaron las semillas y se realizó una prueba de germinación tal como se describió anteriormente con cuatro repeticiones de 25 semillas.

### **Longitud media de plúmula (LMP)**

Para determinar esta variable, se utilizaron las plántulas normales de la prueba de germinación y las resultantes del envejecimiento acelerado, con el fin de evaluar el vigor, se midió la longitud de la plúmula de cada plántula con ayuda de una regla métrica y registrando el promedio de cada repetición, por material y tratamiento expresándola en centímetros.

### **Peso seco**

De las plántulas normales evaluadas anteriormente se descartó el resto de semilla, dejando la plúmula o vástago y la raíz; las cuales se colocaron en bolsas de papel estraza e introducidas en una cámara durante 24 horas a 65°C. Pasado el tiempo se sacaron y enfriaron en un desecador de vidrio con sílica gel por 15 minutos y pesando las bolsas con plántulas en una

balanza analítica de 0.0001 de precisión de acuerdo a las reglas de la AOSA (1992). Los resultados se registraron en miligramos por plántulas normales en base a 100 semillas multiplicando por cuatro.

### **Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

### **Análisis Estadístico**

Los análisis de varianza para los tratamientos se realizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 6.0 (1989), con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + E_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Valor observado.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$S_i$  = Efecto del  $i$ ésimo tratamiento

$E_{ij}$  = Error experimental.

### **Comparación de Medias**

Se utilizó la prueba de rango estudentizado de Tukey (HSD), la cual se calcula mediante:

$$HSD = AES S_x$$

Donde: AES depende del nivel  $\alpha$ , los grados de libertad del error y el número de tratamientos del experimento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Capacidad de germinación

#### Plántulas normales

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para esta variable mostraron que no hubo diferencias entre los genotipos ni en la interacción genotipo x tratamiento (Cuadro 4.1), pero si una alta significancia entre tratamientos ( $p < 0.01$ ). la prueba de medias mostró que el tratamiento 2 obtuvo el mayor promedio en el porcentaje de germinación con 95%, seguido por el T4 y T1 dentro del mismo grupo de significancia. El testigo (T3) obtuvo el menor porcentaje con 80.4%

Cuadro 4.1 cuadrados medios del análisis de varianza, cuadrados medios y prueba de medias para las variables evaluadas en los genotipos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo en la capacidad de germinación.

F.V.	GL	GER	PA	SSG	LMP	PS
TRATAMIENTO	3	859.93**	825.60**	4.266 <sup>NS</sup>	200.40**	18.29 <sup>NS</sup>
GENOTIPO	4	357.30 <sup>NS</sup>	308.30 <sup>NS</sup>	13.70 <sup>NS</sup>	193.87**	5.62 <sup>NS</sup>
TRA*GEN	12	182.76 <sup>NS</sup>	141.10 <sup>NS</sup>	12.76 <sup>NS</sup>	58.61 <sup>NS</sup>	37.73 <sup>NS</sup>
TRA*REP	12	220.66 <sup>NS</sup>	172.26 <sup>NS</sup>	8.266 <sup>NS</sup>	23.63 <sup>NS</sup>	11.74 <sup>NS</sup>
ERROR	48					
C.V		13.73	141.75	149.75	13.57	32.616
T1		90.60 BA	8.00 BA	1.40 A	32.53 A	12.22 A
T2		95.00 A	3.60 B	1.40 A	34.64 A	12.30 A
T3		80.40 B	17.60 A	2.20 A	27.50 B	13.73 A
T4		93.40 A	4.40 B	2.20 A	33.61 A	11.44 A

PN= plántulas normales, PA= plántulas anormales, SSG= semillas sin germinar, LMP= longitud media de plúmula, PS= peso seco, \*\* =Altamente significativo, \* = Significativo, NS= No significativo, CV= Coeficiente de variación, Prueba de Tukey al 0.001%

Sin embargo, en la Figura 4.1, numéricamente se observa que G4 y G5 obtuvieron mayor porcentaje de PN en T4 y T2 marcando que no hay diferencia si la semilla se encuentra tratada con químico (T4 captan) que si se le aplica la bacteria (T2); en el caso de G1 y G2 en los mismos tratamientos (T4 y T2) el aplicar la bacteria aumenta el número de PN cercano al 98%, sugiriendo que la aplicación de *Azospirillum* ayuda en el proceso de germinación con el aumento del crecimiento para PN como lo mencionaron Okon and Labandera-González (1994), en contraste, G3 al aplicarle la bacteria, el tratamiento químico y su combinación (T1, T2 y T4), obtuvo una mejor respuesta que al no ser tratada (T3), sugiriendo nuevamente que la bacteria favorece la germinación de las semillas (Boddey y Dobereiner, 1988) y el utilizar el captan o tratamientos químico ayuda su protección contra patógenos que afectan la germinación.

### **Plántulas anormales**

En esta variable, no se encontró diferencias entre los genotipos ni en la interacción genotipo x tratamiento (Cuadro 4.1), pero si una alta significancia entre tratamientos ( $p < 0.01$ ), donde el tratamiento 3 (testigo) presentó el mayor porcentaje de plántulas anormales con 17.6%. Con respecto a la comparación de medias (Cuadro 4.1) los tratamientos T1 y T2 resultaron estadísticamente iguales con 17.6 y 8.0%, mientras que T2 y T4 reflejaron porcentajes menores al 5 %.

En la Figura 4.1, se observa que Bacanora (G3) numéricamente presentó mayores anormalidades en T3, indicando que la semilla estuviera deteriorada o fuera recién cosechada y por lo tanto algo de latencia, sin embargo en T2 (inoculo de *Azospirillum sp.* y tratamiento químico) se redujo el porcentaje de anormalidades, dando resultados favorables. En el caso de G4 (AN-388) y G5 (Gálvez) del mismo tratamiento (T3) también disminuyó el número de PA con valores cercanos al 12%. La capacidad germinativa de un lote de semillas de diferentes condiciones es una propiedad que determina el potencial para una rápida emergencia y crecimiento normal (Copeland y McDonald 1985). A diferencia de los genotipos AN-388 y

Gálvez al aplicar la bacteria y el tratamiento químico (T2) obtuvo una mejor respuesta que al no ser tratada (T3), sugiriendo que el inoculo más el captan favorecieron la disminución de PA.

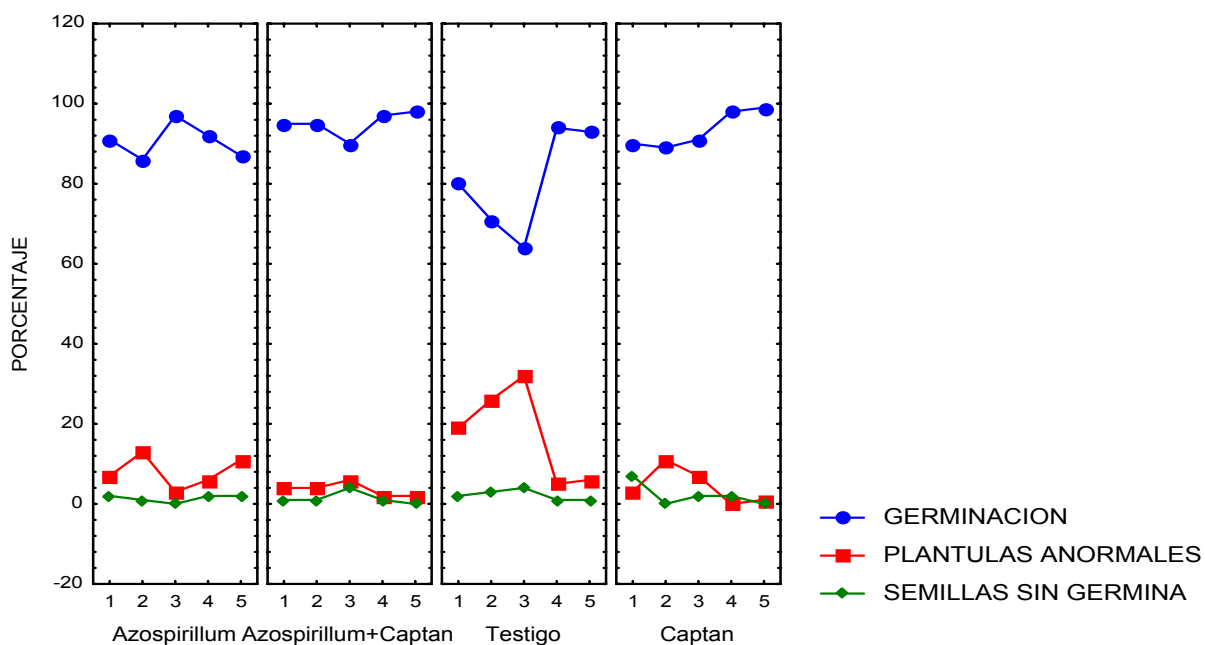


Figura 4.1. Respuesta del efecto de los tratamientos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo en la capacidad de germinación.

### Semillas sin germinar

En esta variable no se detectaron diferencias entre tratamientos y genotipos lo que indica que estadísticamente fueron iguales (Cuadro 4.1). Sin embargo se observó que el genotipo Mochis (G1) presentó el mayor porcentaje de semillas sin germinar en el T4 con un valor de 8%, mostrado en la Figura 4.1, seguido del Bacanora (G3) con 4% en el T2 y T3, mientras que en el T1 presento valores bajos en los genotipos estudiados, sugiriendo que la aplicación de la bacteria pudiera estimular la germinación y desarrollo vegetal en algunos genotipos tal como la han reportado Canto-Martín *et al.* (2004).

## Longitud media de plúmula

En el análisis de varianza se encontró una diferencia altamente significativa entre tratamientos y genotipos (cuadro 4.1). De acuerdo a la comparación de medias con respecto a los tratamientos se encontraron dos grupos estadísticos indicando que los T1, T2, y T4 fueron iguales con una longitud de 32 a 35 cm; mientras que el testigo (T3) resultó con un valor de 27.5 cm. En genotipos, la comparación de medias reportó tres grupos estadísticos, donde AN-388 (G4) y Gálvez (G5) formaron el primer grupo de significancia con los valores más altos de 34 a 37 cm; mientras que Mochis (G1), Pavón (G2) y Bacanora (G3) correspondieron a otro con valores mas bajos con a 31 cm, pero Mochis (G1) y AN-388 (G4) pertenecen a un grupo intermedio (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Prueba de medias para las variables evaluadas en los genotipos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo en la capacidad de germinación.

Genotipos	GERPN	PA	SSG	LMP	PS
Mochis	89.0 A	8.2 A	3.0 A	30.5 BC	12.7 A
Pavón	85.2 A	13.5 A	1.2 A	28.1 C	12.3 A
Bacanora	85.5 A	13.5 A	2.5 A	30.3 C	12.7 A
AN-388	95.2 A	3.2 A	1.5 A	34.7 BA	11.4 A
Galvéz	94.2 A	5.0 A	0.7 A	36.5 A	12.8 A

GERPN=Plántulas normales, PA=Plántulas anormales, SSG= Semillas sin germinar, LMP= Longitud media de plumula, PS= peso seco, Prueba de Tukey al 0.001%

En la Figura 4.2, se observa que Gálvez (G5) numéricamente obtuvo mayor longitud media de plúmula en los tratamientos T2, T3 y T4 indicando que hubo diferencias cuando la semilla fue únicamente inoculada con *Azospirillum* (T1). El Bacanora (G3) con tratamientos T1 y T2 resulto favorable al aplicar la bacteria ya que aumentó su LMP, dando valores cercanos a los 9 cm, sugiriendo que la aplicación de *Azospirillum* influye significativamente en el crecimiento de la parte aérea de la planta en algunos genotipos, éstos resultados tienden a parecerse a lo obtenido por Canto-Martín *et al.*, (2004) en el cultivo de Chile (*Capsicum chinense* Jacquin),

quienes reportaron que la inoculación con *Azospirillum* ejerció un efecto positivo sobre la longitud media de plúmula y el peso seco de la parte aérea de la planta.

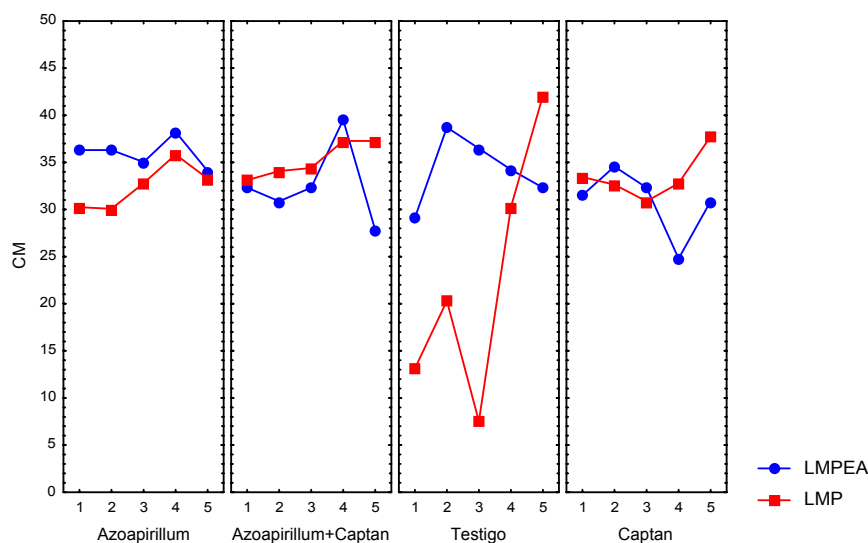


Figura 4.2. Comportamiento de la longitud de plúmula de semillas de genotipos en los cinco materiales de trigo.

### Peso seco

En esta variable no hubo diferencias entre genotipos y tratamientos, lo que indica que estadísticamente fueron iguales (cuadro 4.1).

Sin embargo en la Figura 4.3 se apreció que Bacanora (G3) presentó mayor peso seco en el T3 con 21 mg/plántula, resultando el genotipo con mayor vigor a pesar de que tuvo un menor porcentaje de germinación, lo cual indica que las pocas plántulas normales obtenidas presentaron un alto peso influyendo a tener alto vigor en la semilla.

En la aplicación de tratamiento químico (T4) en el mismo genotipo (G3) resultó con un menor peso de 6 mg/plántula, indicando que posiblemente la semilla es afectada o susceptible al tratamiento químico que se utiliza comúnmente en la industria semillera provocando un deterioro en su vigor.

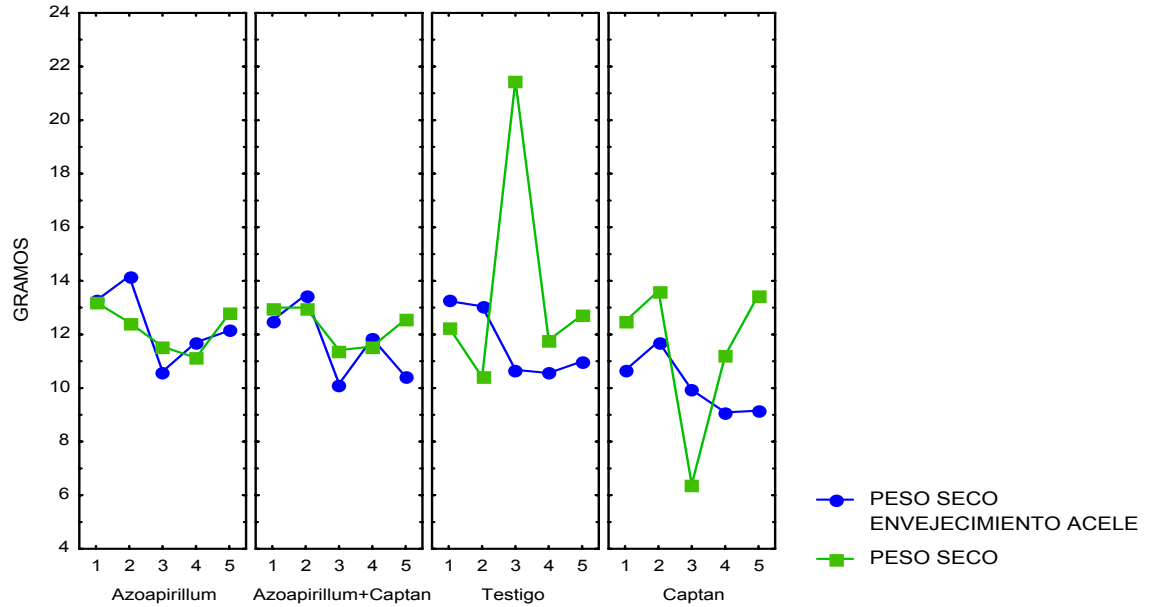


Figura 4.3. Comportamiento del peso seco en semillas nuevas y almacenadas con y sin tratamiento químico.

### Envejecimiento acelerado

El ANVA para el porcentaje de germinación después del envejecimiento acelerado (EAPN), no presentó resultados significativos entre genotipos, pero sí una diferencia altamente significativa entre tratamientos al ( $p < 0.01$ ), tal como aparece en el Cuadro 4.3.

En la comparación de medias del mismo cuadro, los tratamientos T1 y T2 resultaron estadísticamente iguales con porcentajes de 93 a 95%, mientras que T4 resultó con un valor de 87%.



Cuadro 4.3 Cuadrados medios en el análisis de varianza y comparación de medias para las variables evaluadas en los genotipos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo.

F.V	GL	EAPN	EAPA	EASSG	EALMP	EAPS
TRATAMIENTO	3	263.13**	109.00**	63.20*	51.83**	18.47**
GENOTIPO	4	90.50 <sup>NS</sup>	25.30 <sup>NS</sup>	24.80 <sup>NS</sup>	24.40 <sup>NS</sup>	23.74 <sup>NS</sup>
TRA*GEN	12	21.96 <sup>NS</sup>	45.83 <sup>NS</sup>	14.53 <sup>NS</sup>	22.17 <sup>NS</sup>	1.255 <sup>NS</sup>
TRA*REP	12	42.46 <sup>NS</sup>	20.73 <sup>NS</sup>	19.86 <sup>NS</sup>	12.68 <sup>NS</sup>	1.687 <sup>NS</sup>
ERROR	48					
C.V		7.052	92.2415	97.662	9.639	8.049
T1		93.6 BA	4.80 BA	2.2 B	36.22 A	12.37 A
T2		94.60 A	2.00 B	3.4 BA	33.36 B	11.68 A
T3		88.4 BC	7.20 A	4.4 BA	33.64 BA	11.70 A
T4		87.00 C	6.60 A	6.4 A	22.47 B	10.11 B

EAPN= Envejecimiento Acelerado plántulas normales, EAPA= Envejecimiento acelerado plántulas anormales, EASSG= Envejecimiento acelerado semillas sin germinar, EALMP=envejecimiento acelerado longitud media de plúmula, EAPS= envejecimiento acelerado peso seco, \*\* =Altamente significativo,\*= Significativo, NS= No significativo, CV= Coeficiente de variación, Prueba de Tukey al 0.001%

Numéricamente, los genotipos Pavón (G2), Bacanora (G3) y AN-388 (G4) obtuvieron el mayor porcentaje de EAPN en los tratamientos T1 y T2 mostrados en la Figura 4.4, resaltando que AN-388 obtuvo resultados similares cuando la semilla esta tratada con químico y se le aplicara la bacteria que sin tratamiento y se inoculara la bacteria. En el caso de Pavón aumentó el número de EAPN cuando se inoculó la bacteria *Azospirillum sp.* si la semilla esta tratada con captan, dando valores cercanos al 97%, estos resultados sugieren que Pavón (G2) es de alto vigor cuando se aplica la bacteria a semilla tratada y almacenada talvez por ser un genotipo resistente a alta humedad y temperatura, capaz de someterse a estrés energético y mostrar buena respuesta de germinación, así como tener una buena emergencia en campo (ISTA, 1996).

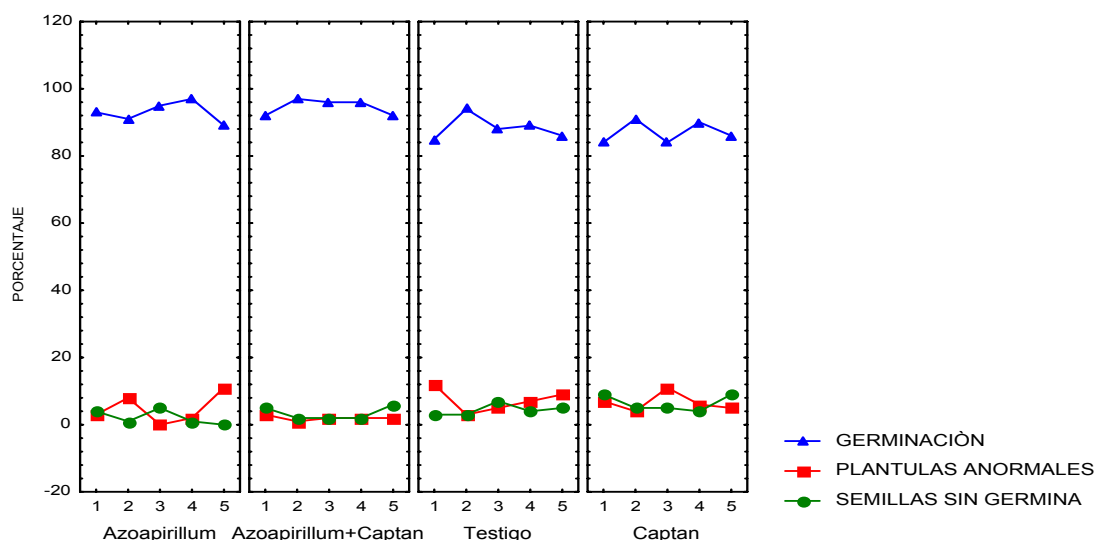


Figura 4.4 Comportamiento del efecto de los tratamientos estudiados en cinco materiales de semilla de trigo almacenada.

En lo que respecta a las plántulas anormales (PA) resultantes después del envejecimiento, no hubo diferencia significativa entre los genotipos, pero sí una diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 4.2), de acuerdo a la comparación de medias se observa que T1, T3 y T4 estadísticamente fueron iguales con valores de 4 a 7%, pero el testigo (T3) resultó el más afectado con mayor número de PA (7.2%). En general a todos los genotipos les fue desfavorable por las condiciones de la prueba, ya que aumentó su grado de deterioro, reflejado en el número de plántulas anormales (Roberts, 1986 y Spears, 1995), así como por lo descrito por Besnier (1989) quien menciona que el envejecimiento puede producir daño, lo que se traduce en un aumento en la aparición de malformaciones en las plántulas. Sin embargo T1 y T2 pertenecen al mismo grupo estadístico al presentar los menores porcentajes de PA con 2.0 a 4%, sugiriendo que la presencia de la bacteria en semilla almacenada tratada y sin tratar, tiene un efecto benéfico para la germinación y disminución de plántulas anormales (Döbereiner 1992; Baldani *et al.*, 1997; Mantelin & Touraine, 2004).

Semillas sin germinar mostró solamente diferencia significativa entre tratamientos (Cuadro 4.3). El T4 resultó con el mayor número de semillas sin germinar con valor de 6.4%, seguido de los tratamientos T2 y T3 con 3 a

5%, mientras que el T1 obtuvo un porcentaje menor de semillas muertas con 2.2%, de acuerdo a estos resultados podemos decir que la aplicación de la bacteria con semilla tratada y sin tratar en el almacén ayudó a incrementar el número de semillas germinadas favoreciendo la disminución de semillas sin germinar (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000), como fue en caso de T1 y T2 en comparación de T3 y T4 quienes fueron los de más alto porcentaje de SSG.

### **Longitud media de plúmula después del envejecimiento acelerado**

Los resultados del análisis de varianza mostraron que no hubo diferencias entre genotipos Cuadro 4.3, sin embargo existieron diferencias significativas entre tratamientos, donde T1 mostró mayor LMP con 36.22 cm y siendo T1 y T3 estadísticamente iguales con una LMP de 33 a 36 cm mientras T2 y T4 con 22 y 33 cm.

En la Figura 4.4 se observa que los genotipos tuvieron diferencias numéricas, como AN-388 (G4) quien obtuvo mayor longitud media de plúmula en los tratamientos T1 y T2, sugiriendo que la aplicación de *Azospirillum* en este genotipo le ayudó a tener un crecimiento en las plantas (Döbereiner 1992; Baldani *et al.*, 1997; Mantelin & Touraine, 2004); comportamiento contrario al que mostró Pavón (G2), quien obtuvo mayor LMP en los T3 y T4 con valores aproximados a 35 cm, lo cual nos indica que los resultados obtenidos señalaron que la respuesta a la inoculación puede variar en función del grado de fertilidad y la disponibilidad de agua de los suelos, observando la importancia que puede adquirir *Azospirillum* en el cultivo (Rodríguez *et al.* 1996).

### **Peso seco después del envejecimiento acelerado**

En lo que respecta al peso seco se encontró una diferencia altamente significativa entre tratamientos y genotipos (Cuadro 4.3) con un CV de 8.0%; En la comparación de medias, los tratamientos T1, T2, y T3 resultaron ser

estadísticamente iguales con 11 a 12 mg/plántula de PS a diferencia de T4, quien resulto con un bajo peso seco de 10.11 mg/plántula.

En la comparación de medias entre los genotipos, Mochis (G1) y Pavón (G2) pertenecieron al primer grupo con los valores mas altos de 12 a 13 mg/plántula, mientras Bacanora (G3), AN-388 (G4) y Gálvez (G5) a los más bajos con un peso de 10 mg/plántula.

Sin embargo en la Figura 4.3, numéricamente se observa que Pavón (G2) obtuvo mayor PS en los tratamientos T1 y T2 sugiriendo una respuesta similar a la reportada por Canto-Martín *et al.*, (2004) pero en Chile (*Capsicum chinense* Jacquin). Al parecer la aplicación de la bacteria promovió la acumulación de peso seco debido a su actividad ayudando a la absorción de nutrientes y por ello la acumulación de biomasa (Alami *et al.*, 2000).

## CONCLUSION

Con los resultados obtenidos en este trabajo se llegó a la conclusión siguiente:

- La inoculación de *Azospirillum sp.* en las semillas de la mayoría de los genotipos estudiados con y sin tratamiento químico favoreció su calidad fisiológica.
- La inoculación de *Azospirillum sp.* después del almacenamiento ayudo a los genotipos Mochis, Pavón y AN-388 a presentar un alto porcentaje de germinación lo que nos indica que la presencia de la bacteria resulta para reforzar la producción de trigo.

## LITERATURA CITADA

- Alami, Y., W. Achouak, C. Marol and T. Heurin, 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide producing *Rhizobium* Sp., strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3393-3398.
- Association of Official Seed Analysts (AOSA) 1981. Rules for testing seeds. *Journal of Seed Technology* 6:1-126.
- Association of Official Seed Analysts (AOSA) 1983. Seed vigour testing handbook. Contribution No. 32 to the handbook on seed testing. 88p.
- Association of Official Seed Analysts (AOSA) 1992. Seedling evaluation handbook. Contribution No. 35. *The Handbook of official Seed. United States of America.* 76-80 p.
- Association of Official Seed Analysts. 2002. Seed Vigor Testing Rules for testing seeds. 166p.
- Baldani, JI; L Caruso; V Baldani; SR Goi & J Döbereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29:911-922.
- Bashan, Y., and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591-608.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44:168-174.
- Bellone C H; Carrizo de Bellone S. 2001. *Azospirillum brasilense* induce la producción de jasmonatos en raíces de caña de azúcar. III Reunión Nacional Científico Técnica de biología del Suelo- Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Salta, facultad de Ciencias Naturales.. Actas y CD ROM.
- Bergey's, Manual. 1984. *Bacteriología sistemática*, de. v 1, secc.2. pp.527-529. U.S.A.
- Boddey, R. M., and Döbereiner, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. *Plant soil.* 108:53-65.
- Bustamante, G. L. 1982. Semillas: control y evaluación de su calidad. Memorias del curso de actualización sobre tecnología de semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y Asociación Mexicana de semilleros, A.C. México. p. 99-106.

- 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 C, S. Medina-Peralta y D. Morales-Avelino. 2004. Efecto De La Inoculación Con *Azospirillum sp.* En Plantas De Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4: 21 – 27.
- Copeland, L. O. 1976. Principles of Seed Science and Technology. FST. Ed Burges. Mineapolis, Minnesota.
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald, 1985. Principles of Seed Science and Technology. Ed Burges Publishing Company. Mineapolis, Minnesota. U.S.A. p.122, 146, 157,169.
- Day, J.M., and Dobereiner, J. 1976. Physiological aspects of nitrogen fixation by *Azospirillum* from *Digitaria* roots soil Biol. Biochem 8:45-50. U.S.A.
- Dobbelaere, S; A Croonenborghs; A Thys; D Ptacek; Y Okon and J Vanderleyden. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fert. Soils* 36: 284-297.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 107-149.
- Döbereiner, J. 1992. History and new perspectives of diazotrophs in association with non legumenous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.
- Esqueda, C.M.H., Carrillo, L.R., Royo, H.M.M. y Jiménez, J. C.2004. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Tec. Pec.mex.* 42:459-475.
- Fallik, E., S. Sarig and Y. Okon. 1988. Morphology and physiology of plant root associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum-Plant Associations* (Y. Okón, Ed), pp 77-86. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- GARCIA, Álvaro Ocampo. Ácidos húmicos y materia orgánica. En: *Agronomía*. Manizales: Caldas. Vol. 5, No. 2-3 (1994).
- García de Salamone I E y Nelson L. 2001. Efectos benéficos directos sobre el crecimiento vegetal de rizobacterias (PGPR) productoras de citoquininas. III Reunión Nacional Científico Técnica de biología del

- Suelo- Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Salta, facultad de Ciencias Naturales.. Actas y CD ROM.
- Gibson. A. and P. Nutman. 1960. Ann. Bot. London, 24: 420-433.
- Hampton J. G.2001New Zealan Seed Technology Institute. Lincoln University Canterbury-New Zealan.
- International Seed Testing Association. (ISTA) 1996. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Seed Sci. Technol.13 (2):299-232.
- McDonald, M. B. 1980. Assessment of seed quality. HortScience 15: 784- 788.
- Mantelin, S & B Touraine. 2004. Plants growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27-34.
- Massaro, R.A. 2004. Tecnología para la aplicación de fungicidas foliares en soja con equipos terrestres. INTA EEA Oliveros, Para Mejorar la Producción 27 Soja, ciclo 2003/04. 8 pág.
- Moreno. M. E. 1996 Análisis físico y biológico de semillas. Tercera edición. UNAM. México. D.F .pp.112-113, 119, 122, 237.
- Okon Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture, 1985. Trends Biotechnol. 3:223-228
- Okon Y. and C. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. Vol 26 (12):1591-1601.
- Pate, J.S. 1973. Soil Biol. and Bioch. 5: 109-119.
- Perry, D.A. 1972. Seed vigour and field establishment. Horticultural Abstract 42(1-4):334-342.
- Perry, D. A. 1977. A vigor test for seeds of barley (*Hordeum vulgare*) based on measurement of plumule growth. Seed Science and Technology. p.709-719.
- Racca, R. 2003. Fijación biológica de nitrógeno. En: II Simposio de Fertilidad y Fertilización en Siembra Directa. XI Congreso Nacional de AAPRESID. Tomo 2. pp 197-208.
- Rovira, A. D. (1973). Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of micro-organisms in the rhizosphere. Pestic. Sci., 4: 361-366.



- Rodríguez Cáceres, E. A.; González Anta, G.; López, J. R.; Di Ciocco, C. A.; y Pacheco Basurco, J. C. and Parada, J. L. (1996). Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. *Arid Soil Res. Rehab.*, 10: 13-20.
- Roy, RN; RV Misra and A Montanez. 2002. Decreasing reliance on mineral nitrogen- Yet more food. *Ambio* 31:177-183.
- Torres Tapia M.A.; Mendoza Villarreal R.; y Zamora Villa V.M.(2006) Efecto de inoculación de *Azospirillum sp* en la germinación y vigor de semillas de chile piquín, UAAAN, México.
- Sarandón, S. J.; Caldiz, D. O. Effects of varying nitrogen supply at different growth stages on nitrogen uptake and nitrogen partitioning efficiency in two wheat cultivars. *Fertilizer Research*, Dordrecht, v. 22, p. 21-27, 1990.
- Sarandón S.; Gianibelli M. 1990. Effect of foliar spraying of urea during or after anthesis on dry matter and nitrogen accumulation in the grain of two wheat cultivars. *Fert. Res.* 31: 79-84
- Kozdroj, J; JT Trevor and JD Van Elsas. 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol.Biochem* 36:1775-1784.
- 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 lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.
- Tien, T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37:1016-1024.