

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Efecto de *Azospirillum sp.* en la Producción de Tres Genotipos de Chile Huacle  
Cultivados con Composta

Por:

**REYNA LILIANA DE LA CRUZ FLORES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Saltillo, Coahuila, México

Febrero 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Efecto de *Azospirillum sp.* en la Producción de Tres Genotipos de Chile Huacle  
Cultivados con Composta

Por:

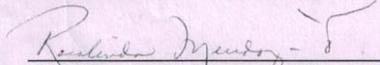
**REYNA LILIANA DE LA CRUZ FLORES**

TESIS

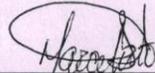
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

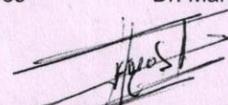
**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal  
Asesor Principal

  
Dr. Valentín Robledo Torres  
Coasesor

  
Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente  
Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía

  
Coordinación  
División de Agronomía  
Saltillo, Coahuila, México

Febrero 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en el presente trabajo, especialmente a la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal en conjunto con el Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente y Dr. Valentín Robledo Torres, por la orientación, supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de la realización de este trabajo.

Agradecimiento a T.A Martina de la Cruz Casillas y a T.L.Q. Laura María Durón Ochoa por sus atenciones prestadas en la realización de este trabajo.

Quisiera hacer reconocimiento de su gratitud a mis compañeros de la Generación CXX quienes siempre me alentaron con sus palabras y su valiosa amistad.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias

## DEDICATORIAS

A mi señor Dios, quien puso en mi fé, fortaleza, salud y esperanza en el transcurso de mi vida.

Con cariño y gratitud principalmente a mis padres Reyno y Norma que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo Papi y Mami por darme la herencia más grande, una carrera para formar mi futuro y por siempre creer en mí, sé que hemos pasado momentos difíciles pero ustedes han estado ahí para brindarme su apoyo incondicional y todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

A mis hermanos Quique, Mary y Ele gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho. Y a mis cuñados Aarón y Adrián y cuñada Beliza por darme siempre

A mis sobrinitas Karlita, Lupita y Pao, las niñas de mis ojos, las amo desde el momento que supe de su llegada pues las quiero como a mis hijas. Gracias por las alegrías que me han brindado.

A mis abuelitos Papá Meli y Mamá Beta que siempre me cuidaron y ayudaron con sus consejos a mi abuelito Salvador y a mi abuelita Paula que aunque están un poco lejos siempre supieron demostrarme su amor y cariño.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis especialmente a la Dra. Rosalinda, al Dr. Marcelino y al Dr. Valentín.

A mi Alma Terra Mater, mi casa de estudios por darme la oportunidad de estudiar y formarme como una profesional.

Al amor de mi vida, que aunque no esté ahora conmigo; solo me queda agradecerle por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento por todos esos momentos felices y por las tristezas que me llevaron a ser una mejor persona, donde quiera que estés amado mío, muchas gracias.

“La diferencia entre una persona exitosa y los demás no es la falta de fuerza ni de conocimiento, sino la falta de voluntad”  
Vince Lombardi

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIAS .....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	III
Índice de cuadros.....	V
Índice de figuras.....	V
Índice de apéndices .....	VI
RESUMEN.....	7
I. INTRODUCCIÓN .....	8
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos.....	9
Hipótesis.....	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
El Género <i>Azospirillum</i> .....	10
Clasificación Taxonómica .....	10
Principales Características del Género <i>Azospirillum</i> .....	10
Ventajas del Uso de <i>Azospirillum sp</i> y Respuesta Agronómica .....	13
Aislamiento.....	15
Identificación .....	16
Distribución.....	16
Ambiente Rizosférico .....	16
Interacción con la Planta .....	18
El Chile Huacle .....	19
Composta .....	19

III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
	Descripción del Área Experimental.....	22
	Materiales.....	22
	Recolección de Raíces de Chile.....	22
	Tratamientos estudiados.....	23
	Medios selectivos de crecimiento.....	23
	Preparación de Medio Nfb.....	24
	Inoculación y Aislamiento.....	25
	Descripción de Colonias y Tinción de gram.....	25
	Modelo estadístico.....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
	Comportamiento de la colonización de <i>Azospirillum</i> en dos porcentajes de composta.....	27
	Concentración microbiológica de <i>Azospirillum</i> , con y sin inoculación.....	28
V.	CONCLUSIONES.....	30
VI.	APÉNDICE.....	37

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b>	Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Azospirillum spp</i>	12
<b>Cuadro 2.</b>	Análisis químico de la composta utilizado como fertilizante orgánico en la producción de tomate en invernadero (Ochoa-Martínez <i>et al.</i> , 2009)	21
<b>Cuadro 3.</b>	Clasificación de los tratamientos utilizados. UAAAN-UL, 2015	23
<b>Cuadro 4.</b>	Composición del medio (Dobereiner y Day, 1976; Dobereiner <i>et al.</i> , 1976)	24
<b>Cuadro 5.</b>	Descripción de colonias desarrolladas en medio Nfb	27

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Características macro y microscópicas para <i>Azospirillum</i> . A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de <i>Azospirillum</i> . B. Tinción Gram y forma celular de <i>Azospirillum</i> . C. Vista macroscópica de la tinción del polímero B-hidroxibutirato. Fuente: Hernández (2003)	11
<b>Figura 2.</b>	Prueba de comparación de medias con composta al 20% y 35%.	28
<b>Figura 3.</b>	Prueba de comparación de medias con y sin inoculación de <i>Azospirillum</i> .	29

## Índice de apéndices

<b>Cuadro 1A.</b>	Análisis de varianza para la concentración de bacterias (UFC ml <sup>-1</sup> ) después de la cosecha de tres genotipos de chile Huacle.	37
<b>Cuadro 2A.</b>	Prueba de comparación de medias con dos concentraciones de Composta en tres genotipos de chile Huacle.	38
<b>Cuadro 3A</b>	Prueba de comparación de medias con y sin inoculación de Bacteria	38
<b>Cuadro 4A.</b>	Concentración de datos utilizados para el ANVA	38

## RESUMEN

La presente investigación se realizó durante el periodo Diciembre 2014 – Abril 2015, en el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para evaluar la concentración de *Azospirillum sp.* en raíz de tres genotipos de Chile Huacle aplicando composta al 20 y 35 %. El experimento se realizó aislando cepas de *Azospirillum*, se estudiaron 12 tratamientos y 3 repeticiones teniendo 6 tratamientos con composta al 20% y 6 tratamientos con composta al 35% con y sin aplicación de la bacteria los cuales contenían la bacteria *Azospirillum* en concentración de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Para identificar y cuantificar el género de *Azospirillum* se tomaron muestras de raíz y fueron enviadas de Unidad Laguna tomando 4 muestras de 2 cm de la raíz de cada planta, las cuáles se depositaron en solución salina de NaCl al 0.085% e incubándose por 72 horas a 32 °C, de cada tubo se tomó 1 ml de muestra, enseguida se realizó la siembra en tubos con medio Nfb semilíquido incubándose a 30° C por 48 h. Pasado este tiempo los tubos presentaron el halo característico de la bacteria las cuales fueron sembradas en medio Nfb sólido haciéndose diluciones de  $10^1$  hasta  $10^{10}$  UFC ml<sup>-1</sup>. Estas se incubaron a 30 °C por 24 h. Los datos obtenidos de esta investigación se analizaron en el paquete estadístico SAS 9.0 con un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 3x2x2. Los resultados obtenidos mostraron que la composta al 35% fue mejor con  $2.144 \times 10^{10}$  UFC ml<sup>-1</sup>. Se concluye que el mayor incremento se obtuvo con el 35% de composta y  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Azospirillum sp* sin embargo la bacteria no tuvo preferencia entre los genotipos de chile Huacle.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, Chile Huacle, Composta

## I. INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos como fertilizantes orgánicos, empleados en cultivos ha sido una alternativa para sustituir la fertilización química. Estos aportan los nutrientes en forma asimilable para las plantas, las cuales proporcionan la fuente de carbono para los microorganismos llevando a cabo una asociación entre ambos organismos (Brook, 2000).

*Azospirillum* es considerado como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales agrícolas (Bashan *et al.* 1997).

Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum sp*; se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas.

Desde la prehistoria, el fruto de las plantas de chile ha constituido parte primordial en la alimentación y cultura de los mexicanos (Long 1986). Oaxaca, destaca por el consumo de chile huacle o chilhuacle pues forma parte indispensable en la elaboración del mole negro, una de las especialidades culinarias del estado (Agroproduce, 2005).

Como composta se entiende, el material que se obtiene producto de la acción microbiana controlada, teniendo como materia prima desechos orgánicos. La composta es materia orgánica de diversas fuentes, mineralizada por microorganismos que pueden ser inoculados. (Noriega, Altamirano y Cruz, 2002).

### **Objetivo general**

Determinar la concentración de *Azospirillum sp.* en la raíz de plantas de tres genotipos de chile huacle aplicando composta.

### **Objetivos específicos**

- a) Determinar la concentración de *Azospirillum sp.* en la raíz.
- b) Evaluar la concentración de *Azospirillum sp.* en diferentes porcentajes de composta en tres genotipos de chile huacle.

### **Hipótesis**

- Por lo menos algún tipo de sustrato en combinación con la bacteria *Azospirillum sp.* tendrá un incremento en la concentración de la raíz.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### El Género *Azospirillum*

El nombre *Azospirillum* proviene del francés Azote, que significa nitrógeno y del grupo Spirillum, pequeña espiral. Su descubrimiento data del año 1925 cuando Beijerinck quien descubrió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum* (Madigan y Parker, 1999).

Actualmente son reconocidas siete especies aunque las más comunes son *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense*. (Ecker *et al.*, 2001). Esta bacteria puede ser de vida libre o asociada con las raíces de los cereales, pastos y plántulas tuberosas. *Azospirillum sp* ha sido el objetivo de numerosos estudios por su capacidad de fijar nitrógeno asociado 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

Taxonómicamente según la novena edición del manual Bergey's de bacteriología sistémica (Holt *et al.*, 1994) *Azospirillum* pertenece a:

Dominio: Bacteria, División: Proteobacteria, Clase: Alphaproteobacterias, Orden: Rhodospirillales, Familia: Rhodospirillaceae, Género: *Azospirillum*, Especies: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. zaeae*, *A. canadense* y *A. rugosum*.

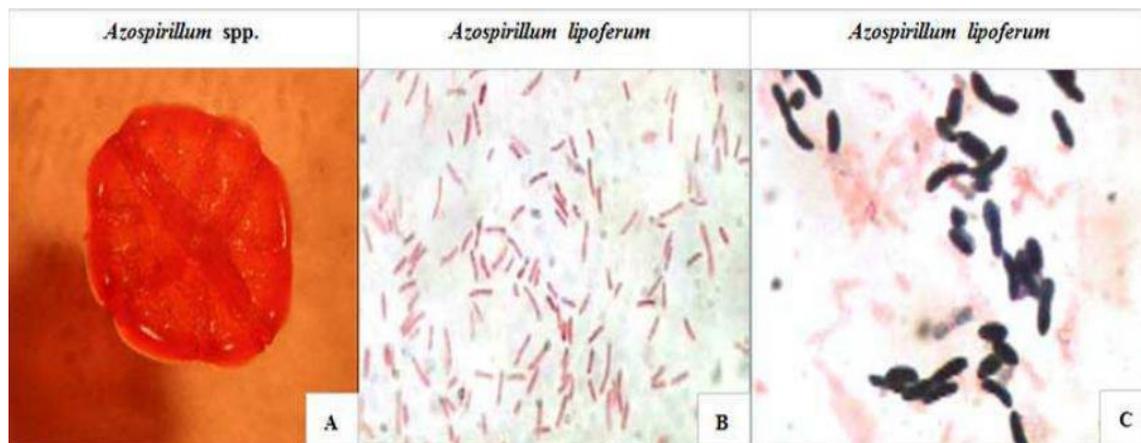
### Principales Características del Género *Azospirillum*

Se describe en la literatura como bacterias gram-negativas, con forma celular de bacilos ligeramente curvados, presentan un diámetro de 1.0  $\mu\text{m}$  x 2.1 a 38  $\mu\text{m}$ . Poseen movilidad en espiral (parecido aun sacacorchos) debido a la presencia de flagelos y contiene cantidades elevadas de poli-B-hidroxibutirato

(PHB), hasta el 50% del peso seco celular (Figura 1) (Okon *et al.* 1976a). Presentan la capacidad de fijar nitrógeno manifestándolo y crecen en formas de un velo blanquecino bajo la superficie del medio semisólido Nfb (Medio libre de Nitrógeno) (Döbereiner *et al.*, 1999).

Son parte del grupo de diazotroficas asociativas que contribuyen al crecimiento de la planta sin la formación de estructuras diferenciadas y no establecen simbiosis, crecen a pH de 6.8 a 7.0 y temperaturas entre 30 y 35°C (Marín *et al.*, 1990).

Las bacterias son organismos fijadores de N<sub>2</sub>, ya que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Velasco, 2001).



**Figura 1.** Características macro y microscópicas para *azospirillum*. A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de *Azospirillum*. B. Tinción Gram y forma celular de *Azospirillum*. C. Vista macroscópica de la tinción del polímero B-hidroxibutirato. Fuente: Hernández (2003).

En resumen las características morfológicas y metabólicas mencionadas se encuentran reportadas en el manual de Bergey's de Bacteriología Sistémica por Krieg y Döbereiner para el género en estudio y descritas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Azospirillum* spp.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADOS ( <i>Azospirillum</i> )
Tinción Gram	Gram (-)
Forma Celular	Bacilos ligeramente curvados o rectos.
Catalasa	+
Oxidasa	+
Ureasa	+
Sulfatos	-
Indol	-
Lactosa	-
Motilidad	+ de forma espiral
Reducción de nitratos	+
Tinción de polímeros B-polihidroxitirano	+
Crecimiento en el medio semisólido NFB	Presencia de un velo espeso de color blanco, entre 0.5 y 1.5 cm bajo la superficie y cambio de color del medio de verde a azul.
Morfología de colonias en agar AM-RC	Las colonias poseen forma circular ovoide con paredes gruesas similares a quistes; superficie: rugosa y brillante; de bordes ondulados; consistencia: cremoso; y adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante rojo Congo.
Fuente: Krieg y Dóbereiner (1984), Manual Bergey's de Bacteriología Sistémica.	

## Ventajas del Uso de *Azospirillum sp* y Respuesta Agronómica

- Son una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de los cultivos en agro ecosistemas sustentables (Wu *et al.*, 2005).
- Los efectos benéficos del *Azospirillum* en el rendimiento y la reducción de la fertilización química, incluyendo la fertilización nitrogenada es importante para la agricultura y significativo en el cuidado del ambiente (Fisher *et al.*, 2007).
- Producen reguladores de crecimiento como auxinas, ácido Indolacético (AIA), citocininas, y proteínas como poli amina, fijan nitrógeno, incrementan el crecimiento radicular, además son capaces de acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas (Villegas *et al.*, 2010).
- Participan en la formación de los microorganismos rizosfericos ricos en metabolitos microbianos principalmente del tipo aminoácido y polisacáridos (Caesar *et al.*, 2007).
- Favorecen la tasa de germinación (Bashan y Bashan, 2005).
- Al permanecer vivas durante años y reproducirse en el suelo, contribuyen en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Rivera *et al.*, 2010). Además participan en diversos procesos del ecosistema, que incluyen el reciclaje, solubilización, descomposición y mineralización de compuestos orgánicos y la translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan a la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo

planta (Bare *et al.*, 2005). Disuelven y mineralizan los fosfatos, producen sideroforos y antibióticos (Vassey, 2003).

- Se ha comprobado que fertilizando los cultivos con estas bacterias y con nitrógeno químico en un porcentaje del 20 al 50% del utilizado normalmente se consigue un aumento de producción sobre las cosechas obtenidas únicamente con fertilizante químico al 100%. Forma una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, por lo que esta crece más sana y fortalecida (Ruso *et al.*, 2008; Cassan *et al.*, 2009 b), debido a la capacidad de producirse en grandes cantidades bajo condiciones de alta humedad relativa, desplazan a los patógenos por la competencia generada o por la fortaleza fisiológica que adquiere la planta (Bashan y Bashan, 2002).
  
- Produce enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos (Bashan y Bashan, 2005).
  
- Se ha demostrado que las bacterias resisten mejor en condiciones de sequía y los climas áridos ya que forman alginatos en las raíces de las plantas (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010).
  
- Aumentan la tolerancia a factores que originan estrés (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010) puesto que las plantas responden a los mecanismos de estrés a nivel celular y molecular, limitando el crecimiento y rendimiento (Pereyra *et al.*, 2006).

- El efecto favorable de *Azospirillum*, produce un mayor desarrollo del sistema radical, traducido en mayor superficie de absorción de agua y nutrientes así como un mayor desarrollo de la parte aérea de la planta (Liriano *et al.*, 2005), teniendo potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés hortícola (Días *et al.*, 2001).
- Promoción de la división celular en el meristemo radicular.

Existen dos problemas a resolver:

- Una población abundante compite por nutrientes con las plantas, un ejemplo de esto 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 con otros microorganismos y las propiedades físicas y químicas del suelo pueden afectar el potencial de *Azospirillum*, al ser inoculado en la planta hospedera (Arzanesh *et al.*, 2010).

### **Aislamiento**

Para llevar a cabo el aislamiento de las bacterias del género *Azospirillum*, se utiliza suelo rizosférico o de la superficie 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). El cultivo puro se logra en diferentes medios de laboratorio, al que se le añade colorante rojo Congo (Rodríguez, 1982). En este medio de cultivo *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, toman un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos.

## Identificación

*Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias, con forma de vibroide, pleomorfismo y movilidad en espiral (Döbereiner, 1992). Presentan granulos intercelulares de poli -  $\beta$  - hidroxibutirato, posee un flagelo polar y pertenece al grupo de bacterias Gram negativas y Gram variables (Tarrand *et al.*, 1978). Al ser vistas en el microscopio presentan forma de bacilos ligeramente curvados, con 1  $\mu\text{m}$  de diámetro celular, móviles, además son microaerófilicas y crecen en pH de 6.8 a 7.8 (Madigan, *et al.*, 1999).

## Distribución

*Azospirillum* presenta una amplia distribución geográfica, a pesar de ser más abundante en regiones tropicales, también se encuentra en regiones desérticas, frías y templadas (Dobereiner *et al.*, 1976). También la presencia de *Azospirillum* depende en gran medida del pH del suelo, por ejemplo, las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en suelos con pH cercanos a la neutralidad, aun cuando el pH se encuentra por debajo de 5 se encuentran en forma esporádica, pero en pH menor de 4.5 no se logra encontrar presencia (Döbereiner *et al.*, 1976. Döbereiner, 1978. New *et al.*, 1989). En suelos, *Azospirillum brasilense* es beneficiada en su sobrevivencia por factores abióticos como porcentaje de arcilla, materia orgánica, capacidad de retención de agua y contenido de nitrógeno (Bashan *et al.*, 1995), pero la alta concentración de carbonatos de calcio afecta negativamente su sobrevivencia.

## Ambiente Rizosférico

La adaptación de *Azospirillum* al futuro ambiente rizosférico probablemente se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. Aun cuando las especies de *Azospirillum* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, principalmente diversos

ácidos orgánicos tales como málico, succínico y algunos aminoácidos. (Hartmann *et al*, 1988).

Es posible que en el ambiente rizosférico las especies de *Azospirillum* puedan ser antagonizadas. Alrededor de 400 actinomicetos aislados de la rizosfera del centeno fueron reportadas como antagonistas de *Azospirillum spp.* y *Azospirillum lipoferum*. (Kulinska y Kroczyńska, 1990). Esta actividad antagonista correlaciona con alta sensibilidad de *Azospirillum brasilense* a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y cloranfenicol producidos por actinomicetos del suelo en comparación a la elevada resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos producidos por hongos. (López, 1989).

Diversas condiciones tales como el envejecimiento celular y la presencia de metales pesados provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien su morfología y tomen la forma de “quistes” (conocidos como formas C), conduciendo a la agregación celular y formando grumos visibles de gran tamaño. (Bashan, y Holguin, 1997). La agregación y la formación de quistes mejoran la sobrevivencia de *Azospirillum*, situación en la que la acumulación de poli-  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) parece desempeñar una función importante al servir como almacén de carbono y energía. (Okon *et al*, 1976).

Además, diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PHB, destacándose la mayor resistencia a la desecación (Lamm y Neyra, 1981), a la luz ultravioleta y al choque osmótico. (Tal y Okon, 1985). Se ha sugerido que la formación de quistes pudiera desempeñar una función importante en la sobrevivencia de *Azospirillum* en el ambiente rizosférico, por ejemplo, cuando los nutrientes son limitados, previo a la asociación con las raíces de la planta. (Okon e Itzigsohn, 1992).

## Interacción con la Planta

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede provocar cambios significativos en varios parámetros de su crecimiento los cuales puede afectar o no el rendimiento del cultivo. Esta bacteria benéfica, general y no específica es notoria por sus efectos sobre plantas comerciales (Dosreis *et al.*, 2000), pastos y plantas de cereales cultivadas como trigo (Hassan *et al.*, 1998), además de producir asociaciones con varias plantas suculentas desérticas (Carrillo *et al.*, 2000)

En gran número de artículos científicos se describen los efectos que provoca la bacterización con diferentes cepas de *Azospirillum*, medido en el aumento de peso seco total, contenido de nitrógeno de hojas, granos y brotes, floración y aparición temprana de la espiga y granos en estas, peso y tamaño del grano, altura de la planta y tamaño de la hoja, índice de área foliar y tasa de germinación (Velazco, 2001, Woodard, *et al.*, 2000).

La asociación de *Azospirillum* con las raíces de las plantas se desarrolla en dos etapas completamente independientes, (Michiels *et al.*, 1991). La primera consiste en una adsorción 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). La segunda fase consiste en un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, el cual parece ser independiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum*. (Michiels *et al.*, 1991).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha demostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales. (Levanony y Bashan, 1991). La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa el gen reportado *gus* A mostró que en los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y

las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz. (Vande *et al*, 1993).

Es de interés señalar que los sitios de colonización *Azospirillum lipoferum* son diferentes, dependiendo de la variedad de la planta, al menos en el caso del arroz. (Murthy *et al.*, 1987). La capacidad de *Azospirillum* para colonizar las raíces de las plantas es variable dependiendo de la cepa (Caballero, 2003).

### **El Chile Huacle**

El chile huacle es un cultivo endémico del estado de Oaxaca, de importancia cultural al formar parte esencial del mole negro, debido a que alcanza precios muy elevados y la reducción gradual de la superficie cultivada en la región Cañada, es un cultivo que podría ser utilizado bajo condiciones de invernadero (Langlé, 2011).

La importancia del chile huacle radica en que es un condimento indispensable para la elaboración de mole negro, una de las especialidades culinarias del estado de Oaxaca y por tanto forma parte de la riqueza cultural del estado (Agroproduce, 2005).

La principal problemática radica en que este tipo de chile es endémico por lo tanto muy poco conocido y no apto para distintos tipos de suelo, para lo cual se desarrolló el siguiente experimento buscando que con la inoculación y aislamiento de cepas de *Azospirillum sp.* más composta en diferentes porcentajes tenga un buen desarrollo en la planta.

### **Composta**

La composta es un abono que aumenta la porosidad del suelo y su capacidad de retención de agua (Valtueña, 2002). Composta es un fertilizante natural y acondicionador del suelo que airea del terreno, mejora su capacidad para retener agua y nutrientes, ayuda a prevenir la erosión e impide que se desperdicien los nutrientes en los vertederos. El oxígeno, la humedad, el

nitrógeno y una temperatura no excesivamente alta son elementos necesarios para la creación de la composta, las bacterias del suelo interactúan con los desperdicios degradables, produciendo un excelente fertilizante (Del Valle, 2006).

Como composta se entiende, el material que se obtiene producto de la acción microbiana controlada, teniendo como materia prima desechos orgánicos. La composta es materia orgánica de diversas fuentes, mineralizada por microorganismos que pueden ser inoculados. (Noriega, Altamirano y Cruz, 2002).

La composta es un material resultante de la descomposición inducida y controlada de los residuos orgánicos (de origen agroindustrial, pecuario o urbano) por medio de hongos, bacterias, actinomiceto, lombrices, entre otros. Se produce mediante la fermentación de las materias orgánicas contenidas en los residuos sólidos en presencia de aire por acción de la cantidad de bacterias, lo cual ofrece propiedades para la agricultura ya que tiene carácter de abono porque contiene elementos fertilizantes como nitrógeno, fosforo y potasio.

**Cuadro 2.** Análisis químico de la composta utilizados como fertilizante orgánico en la producción de tomate en invernadero (Ochoa-Martínez *et al.*, 2009).

Nutriente	Composta (% peso seco)
N	0.97
P	0.54
K	3.59
Ca	4.97
Mg	0.98
Fe	0.85
Mn	0.041
Zn	0.026
Cu	0.007

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Descripción del Área Experimental

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista Saltillo, Coahuila. México, en el periodo diciembre 2014-abril 2015, se ubica en las coordenadas geográficas 25° 21' 20" latitud N y 101° 02' 07" longitud W, a una altitud de 1763 msnm.

#### Materiales

Cajas Petri PIREX, tubos de ensayo PIREX, micro pipeta SAMPLER SYSTEM 1ml, puntillas para micro pipeta, vasos de precipitado KIMAX, matraz Erlenmeyer PYREX, agitador de vidrio, mechero, cinta selladora, campana de flujo laminar IAV, incubadora, parrilla modelo Thermo scientific mediana, papel aluminio, balanza analítica AND HR-200, reactivos.

#### Recolección de Raíces de Chile

Se obtuvieron raíces de tres genotipos de chile huacle el rojo, amarillo y negro provenientes de UAAAN-UL, para aislar la bacteria *Azospirillum sp.*

Para lograr el aislamiento, las raíces de chile fueron lavadas con agua corriente para eliminar la tierra. Las raíces se colocaron en cajas estériles donde fueron lavadas con etanol al 95% por un minuto y tres veces con agua estéril. Posteriormente se retiró el agua y fueron colocadas en tubos de ensayo de 18 x 150 mm. Con 10 ml de solución de NaCl al 0.085 % y se incubaron por 24 horas a 25 °C.

### Tratamientos estudiados

En el experimento anterior, se inocularon cepas de *Azospirillum*, aisladas por Mendoza (2014) a concentración de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> M1 y M2 proporcionadas por Galeote (2014) distribuidas en 12 tratamientos y 3 repeticiones (Cuadro 3) los cuales contenían la bacteria más la composta a concentración de 20% y 35% evaluando la cantidad de colonias por cada genotipo.

**Cuadro 3.** Clasificación de los tratamientos utilizados. UAAAN-UL, 2015.

Tratamiento	Genotipo	Nivel de compost	<i>Azospirillum</i>
1	Amarillo	Compost 20 %	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
2		Compost 20 %	Sin
3		Compost 35%	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
4		Compost 35%	Sin
5	Rojo	Compost 20%	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
6		Compost 20%	Sin
7		Compost 35%	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
8		Compost 35%	Sin
9	Negro	Compost 20%	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
10		Compost 20%	Sin
11		Compost 35%	Con ( $10^8$ UFC ml <sup>-1</sup> )
12		Compost 35%	Sin

### Medios selectivos de crecimiento

Se utilizó el siguiente medio para la selección de cultivos puros, a partir de muestras rizosféricas de plantas de Chile huacle con tres genotipos.

- Medio de cultivo Nfb carente de nitrógeno, que permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que puede fijar biológicamente  $N_2$ . Además tiene ácido málico, principal fuente de carbono para las bacterias del género *Azospirillum*.

**Cuadro 4.** Composición del medio (Dobereiner y Day, 1976; Dobereiner et al., 1976).

Compuesto	Cantidad g/L
$KH_2PO_4$	0.04
$K_2HPO_4$	0.6
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCl_2$	0.02
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.02
$FeCl_3$	Trazas
Ácido málico	5.0
Agar	1 g
Azul de bromotimol	0.05

### Preparación de Medio Nfb

En la preparación de medio de cultivo Nfb semilíquido, se pesaron las sales antes mencionadas; en seguida se mezclaron en un matraz erlenmeyer con ayuda de un agitador de vidrio aplicando calor para que se diluya.

Posteriormente se coloca en cada tubo de ensayo 10 ml de medio trasladándose a la autoclave modelo Chromalox por 20 minutos a una

temperatura de 120 °C. Para el medio sólido se pesan las mismas cantidades a excepción del agar con 20 g de igual manera se esteriliza por el mismo tiempo, temperatura. Una vez esterilizado todo el material, el medio de cultivo se vierte en las cajas Petri para su solidificación, al terminar se sellaron las cajas con cinta plástica para evitar contaminaciones para su posterior siembra con la bacteria.

### **Inoculación y Aislamiento**

Se inocularon raíces de chile huacle de tres genotipos diferentes siendo el amarillo, rojo y negro con *azospirillum sp.*

Para el aislamiento de cepas de *Azospirillum* se tomaron muestras de 2 cm de raíz por planta colocándose en una solución salina de NaCl al 0.085% e incubaron por 72 h a 32 °C, de cada tubo se tomó un ml de extracto realizándose diluciones seriadas con base de 10 para su posterior siembra en medio Nfb sólido. Estas se incubaron a 32 °C por 24 h.

### **Descripción de Colonias y Tinción de gram**

Después de aisladas las bacterias se desarrollaron en medio Nfb sólido, las cuales se describen en el Cuadro 5.

Para identificar las cepas aisladas se utilizó la siguiente prueba:

- ✓ Prueba de tinción de Gram, este sistema de identificación de bacilos gran negativos específicos para el género *Azospirillum sp.*

**Modelo estadístico**

El proyecto se realizó bajo un diseño de bloques completamente al azar con un arreglo factorial 3x2x2 realizándose una transformación de datos con raíz cuadrada teniendo 12 tratamientos y 3 repeticiones dando un total de 36 unidades experimentales.

Los datos obtenidos, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) con prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ), procesados mediante el paquete estadístico SAS (Statiscal Analysis System) versión 9.0.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se confirmó la presencia de *Azospirillum* en las raíces de chile huacle por medio selectivo Nfb y por prueba bioquímica Tinción Gram.

**Cuadro 5.** Descripción de colonias desarrolladas en medio Nfb

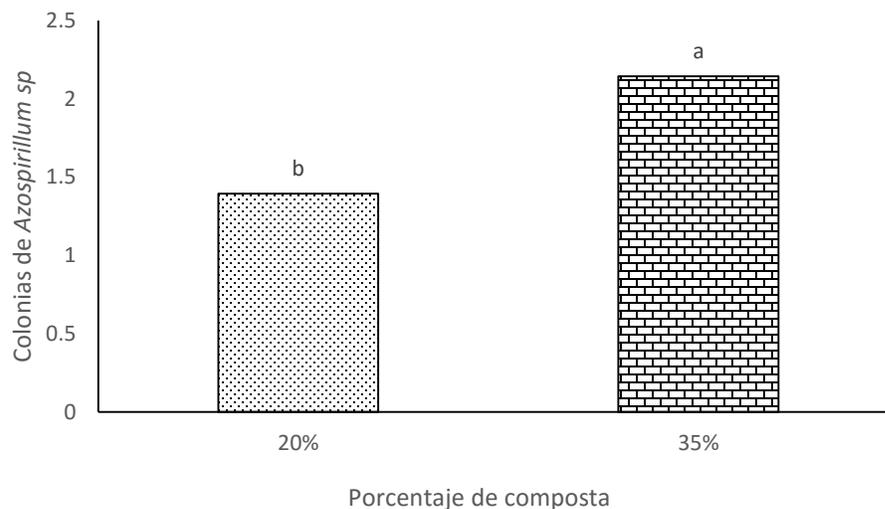
Tratamientos	Color	Forma	Tinción de Gram
T1	Crema	Redonda	(-)
T2	Amarillo	Amorfa	(-)
T3	Amarillo	Amorfa	(-)
T4	Amarillo	Amorfa	(-)
T5	Crema	Amorfa	(-)
T6	Crema	Redonda	(-)
T7	Amarillo	Redonda	(-)
T8	Crema	Amorfa	(-)
T9	Crema	Amorfa	(-)
T10	Crema	Redonda	(-)
T11	Crema	Redonda	(-)
T12	Amarillo	Redonda	(-)

#### **Comportamiento de la colonización de *Azospirillum* en dos porcentajes de composta**

Se realizó el análisis estadístico por medio del análisis de varianza encontrando que la concentración de composta tuvo diferencia significativa al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey al  $p \leq 0.05\%$ , observándose que la composta al 35% tuvo mayor contenido de colonias de *Azospirillum* con un resultado de 2.144 UFC ml<sup>-1</sup> siendo un 34.94% mayor que

la composta al 20% a la cual no se le inoculo la bacteria y no tuvo influencia con el genotipo (Figura 2).

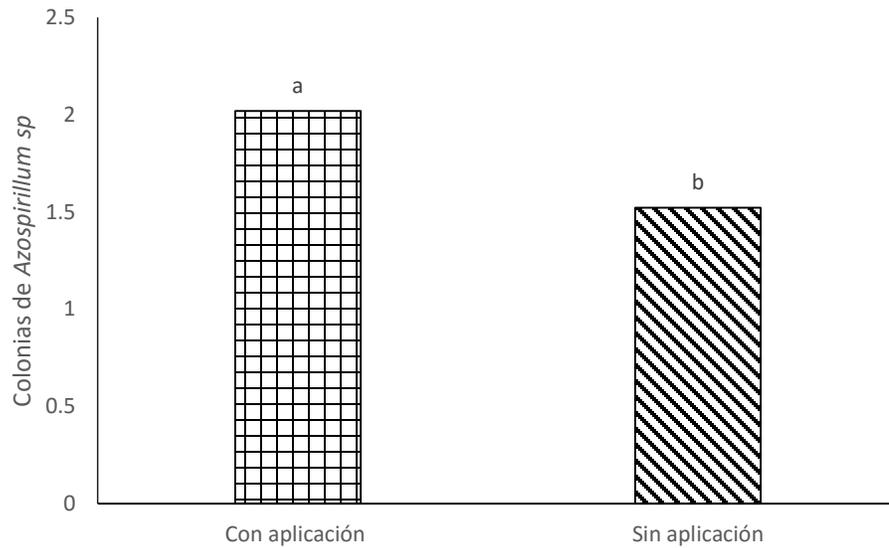
Al respecto Murthy *et al.*, (1987) menciona que los sitios de colonización de *Azospirillum* son diferentes dependiendo de la variedad de la planta, al menos en el caso de arroz. La inoculación con *Azospirillum* a diferentes tiempos no tienen una influencia significativa en el rendimiento aéreo y radicular del sorgo; sin embargo, a diferentes dosis (1 y 3 ml) y concentraciones (de  $10^4$  a  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>) los resultados difieren (Hernández *et al.*, 2000)



**Figura 2.** Prueba de comparación de medias con composta al 20% y 35%.

### **Concentración microbiológica de *Azospirillum*, con y sin inoculación**

Se realizó el análisis de varianza encontrando diferencias significativas al 95%. Al realizar la comparación de medias mediante la prueba Tukey al  $P \leq 0.05$ , indica que la aplicación de *Azospirillum* tuvo mayor concentración (UFC ml<sup>-1</sup>) con un resultado de 2.019 UFC ml<sup>-1</sup> de colonias difiriendo en los genotipos y siendo un 24.67% mejor que sin la aplicación de la bacteria (Figura 3).



**Figura 3.** Prueba de comparación de medias con aplicación de *Azospirillum sp*.

Por lo que menciona Parra (2002) que el modo de colonización radical por *Azospirillum* puede variar, dependiendo de la cepa bacteriana, las especies de plantas utilizadas, las condiciones ambientales y otros factores no identificados así como el sustrato o composta ya que la interacción entre todas estas variables crea diferentes grados y patrones de colonización radical, diferentes tamaños de poblaciones y diferentes sitios de colonización.

La colonización interna ha sido demostrada solamente en algunas especies de plantas y es única para ciertas interacciones planta-*Azospirillum*, Steenhoudt, (2000).

## V. CONCLUSIONES

1. El mayor incremento de unidades formadoras de colonias (UFC) se obtuvo con 35% de composta y  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Azospirillum sp.*
2. No hubo influencia de la concentración de bacteria con los genotipos de chile Huacle.

## VI. LITERATURA CITADA

- Agroproduce. 2005.** Sistema producto Chile. Núm. 04. Año 01. Fundacion Produce Oaxaca.
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli, and G. Zanetti. 1986.** Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp 6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36:87-90.
- Bare J, M Pozo, R Azcon, A Aguilar, 2005.** Microbial co-operation in the rizosphere. *Journal of experimental Botany* 56 (417): 1761-1778.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997.** *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* 43:103-121.
- Bashan, Y., G. Holguin. 1997.** *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* 43:103-121
- Bashan, Y., H. Levanony, and R. E. Whitmoyer. 1991.** Root Surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.* 137:187-196.
- Bashan, Y., Holguin G., Ferrera-Cerrato R. 1996.** Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios I. *Azospirillum*, *Terra*, 14: (2) 159-194.
- Bastarrachea, F., M. Zamudio, and R. Rivas. 1987.** Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.* 34:24-29.
- Brook. D. T. (2000).** *Biología de los microorganismos*. Ed Mc Graw Hill.. 8a ed.

- Caballero M, J. 2003.** El género *Azospirillum*. Programa de ecología molecular y microbiana, centro de investigación sobre fijación de nitrógeno, UNAM, México ap. 565-a.
- Caesar-TonThat, T.C., A.J. Caesar, J.F. Gaskin, U.M. Sainju y W.J. Busscher. 2007.** Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *Applied Soil Ecology* 36(1): 10-21.
- Cassán F, S Maiale, O Masciarelli, A Vidale,VLuna,O Ruiz. 2009 b.** Cadaverine production by *Azoospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *European Journal of Soil Biology*.45: 12-19.
- Chanway, C.P. 1997.** Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.* 43: 99-112.
- Croes, C. L., S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden, and K. W. Michiels. 1993.** The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139:2261-2269.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Randonbage, and K. Vlassak. 1988.** Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* 110:213-218.
- Delgado, M., Farías, S. (2006).** Composta: convierte los desechos orgánicos en fertilizantes para tus plantas. Extraído el 11 de diciembre de 2006. <http://campus-sostenible.mty.itesm.mx>
- Döbereiner, J. 1992.** The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*,. En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer-Verlag. New York. p. 2236-2253.

- Döbereiner, J. 1978.** Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. Ecol. Bull. (Stockholm) 26:343-352.
- Döbereiner, J., I. E. Marriel, and M. Nery. 1976.** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22:1464-1473.
- Döbereiner, J., Marriel, I.E. and Nery, M. 1976.** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Manual of determinative Bacteriology. Williams y Wilkins. Estados Unidos. p 40-42.
- Escalante M. A. 2011.** Aplicación de ácidos húmicos y *Azospirillum sp.* En huizache. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Hartmann, A., H. Fu, and R. H. Burris. 1988.** Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum spp.* Appl. Environ. Microbiol. 54:87-93
- Hernández, Y., Sarmiento, M. y García O. 1996.** Influence of *Azospirillum* inoculation model on grass performance. Cuban Journal of Agricultural Science. 30: 219-226.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. y Williams, S. 1994.** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 39-56 pp.
- Jain, D. K., and D. G. Patriquin. 1984.** Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. Appl. Environ. Microbiol. 48:1208-1213.
- Kapulnik, Y., Okon, Y. and Henis, Y. 1985.** Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.
- Krieg, N. y Döbereiner, J. (1984).** Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979. En Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology. Volume 1. Editado por Noel Krieg y John Holt. Wilkins. Baltimore, USA. 94-104 pp.

**Lamm, R. B., and Neyra, C. A. 1981.** Characterization and cyst production of Azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. Can. J. Microbiol. 27:1320-1325.

**Langlé A., L. M. 2011.** Respuesta del chile Huacle (*Capsicum* spp.) a diferentes densidades de plantación y podas bajo manejo intensivo en invernadero. Tesis Profesional. CIIDIR OAXACA.

**Long S., J. 1986.** Capsicum y cultura: La historia del Chili. Fondo de cultura económica, S.A. de C.v. México, DF.

**López-Reyes, L., L. Soto-Urzúa, M. A. Mascarúa-Esparza, I. HerreraCamacho, and J. Caballero-Mellado. 1989.** Antibiotic resistance and  $\alpha$ -lactamase activity in *Azospirillum*. Soil Biol. Biochem. 21:651-655.

**Madigan M, J Martinko, Parker J. 1999.** Biología de los microorganismos. Ed Prentice Hall Iberia. 8va edición. Madrid España. P 986.

**Marín, A. Cepeda, V. y Grasto, G. 1999.** Fijación Biológica de Nitrógeno: Bacterias Fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. <http://www.cnpab.embrapa.br>

**Mendoza H. A., Cruz M. A., Jacques-Hernández C. 2004.** Aislamiento, selección, producción y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de *Azospirillum* en el norte de Tamaulipas. Memoria de Simposio de Biofertilización "La Biofertilización como Tecnología Sostenible", Reynosa Tamaulipas México.

**Michiels K, Vanderleyen J, Gol A. V. 1989.** *Azospirillum*-plant root associations: A review. Biol Fertil Soils. 8:356-368.

- Michiels, K. W., C. L. Croes, and J. Vanderleyden. 1991.** Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137:2241-2246.
- Murthy, M. G., and J. K. Ladha. 1987.** Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.). Biol. Fertil. Soils 4:3-7.
- Noriega, A. G. Cruz, H. S. Altamirano, P. A. 2002.** Produccion de abonos Orgánicos y Lombricultura. Universidad Autónoma Chapingo. Fundación produce Chiapas. Colegio de estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Chiapas.
- Okon Y, Labandera C. 1994.** Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol Biochem. 26: 1591-1601..
- Okon, Y., and R. Itzigsohn. 1992.** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. FEMS. Microbiol. Rev. 103:131-140.
- Okon, Y., S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976a.** Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 127:1248-1254.
- Okon, Y., S. L. Albrecht, and R. H. Burris. 1976b.** Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 128:592-597.
- Parra, Yanet (2002).** Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura, La Habana, Cuba, 23(3): 31-41.
- Rodríguez-Cáceres, E. 1982.** Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.

- Tal, S. and Y. Okon. 1985.** Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Microbiol. 31:608-613.
- Umali-García, M., D. H. Hubbell, M. H. Gaskins, and F. B. Dazzo. 1980.** Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39:219-226.
- Valtueña, J. 2002.** Enciclopedia de la Ecología y la Salud. Primera edición. España. Editorial Sanfeliz, S.L., p. 58-60
- Vande Broek, A., J. Michiels, A. Van Gool, and J. Vanderleyden. 1993.** Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH gene during association. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:592-600.
- Velazco, A. 2001.** Utilización de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río. [Tesis de doctorado]. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Instituto de Ecología y Sistemática. Ciudad de La Habana. 101 h.
- Woodard, H. J. y Bly, A. 2000.** Maize growth and yield responses to seedinoculated N<sub>2</sub> - fixing bacteria under dryland production conditions. Journal of Plant Nutrition, vol. 23, no. 1, p. 55-65.

## VI. APÉNDICE

**Cuadro 1A.** Análisis de varianza para la concentración de bacterias UFC ml<sup>-1</sup>)

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F-Valor	Pr > F
Composta	1	5.047	5.047	26.33	<.0001**
Genotipo	2	0.167	0.083	0.44	0.6522
Bacteria	1	2.232	2.232	11.65	0.0025**
Repetición	2	0.221	0.110	0.58	0.568
Composta*Genotipo	2	0.845	0.422	2.20	0.134
Composta*Bacteria	1	0.138	0.138	0.72	0.405
Genotipo*Bacteria	2	0.186	0.093	0.49	0.621
Compos*Geno*Bac	2	0.130	0.065	0.34	0.714
E.E: 0.1917		C.V : 24.73			

\*\* Diferencia Significativa

**Cuadro 2A.** Comparación de medias entre Compostas

<b>PORCENTAJE COMPOSTA</b>	<b>UFC ml<sup>-1</sup></b>
20	1.395 b
35	2.144 a

Agrupamiento de medias para Composta mediante la comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ), medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**Cuadro 3A.** Prueba de comparación de medias con y sin inoculación de Bacteria

<b>Bacteria</b>	<b>UFC ml<sup>-1</sup></b>
Con aplicación	2.019 a
Sin aplicación	1.521 b

Agrupamiento de medias para Bacteria mediante la comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ ), medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

**Cuadro 4A.** Concentración de datos utilizados para el análisis de varianza.

Genotipo	Trat	Compot	Geno	Bact	Rep	Coloni
Composta al 20% c.b	1	1	1	1	1	1.732
	1	1	1	1	2	1.414
	1	1	1	1	3	1.414
Composta al 20% s.b	2	1	1	2	1	1.414
	2	1	1	2	2	1

	2	1	1	2	3	1
Composta al 35% c.b	3	2	1	1	1	2.828
	3	2	1	1	2	2.449
	3	2	1	1	3	2
Composta al 35% s.b	4	2	1	2	1	2
	4	2	1	2	2	2.236
	4	2	1	2	3	1.732
Composta al 20% c.b	5	1	2	1	1	2
	5	1	2	1	2	1
	5	1	2	1	3	1
Composta al 20% s.b	6	1	2	2	1	1
	6	1	2	2	2	1
	6	1	2	2	3	1
Composta al 35% c.b	7	2	2	1	1	2.449
	7	2	2	1	2	2
	7	2	2	1	3	2.828
Composta al 35% s.b	8	2	2	2	1	1.732
	8	2	2	2	2	2.828
	8	2	2	2	3	1.414
Composta al 20% c.b	9	1	3	1	1	2.236
	9	1	3	1	2	1
	9	1	3	1	3	2.449
Composta al 20% s.b	10	1	3	2	1	1
	10	1	3	2	2	1.732
	10	1	3	2	3	1.732
Composta al 35% c.b	11	2	3	1	1	2.449
	11	2	3	1	2	2.449
	11	2	3	1	3	2.645
Composta al 35% s.b	12	2	3	2	1	1.732
	12	2	3	2	2	1.414
	12	2	3	2	3	1.414