

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



**APLICACIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS Y AZOSPIRILLUM SP. EN HUIZACHE
(*Acacia farnesiana*)**

Por:

MARCO ANTONIO ESCALANTE DIAZ

TESIS

Presentada como Requisito para Obtener el Título de:

INGENIERO FORESTAL

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO FORESTAL

APLICACIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS Y *AZOSPIRILLUM* SP EN HUIZACHE
(*Acacia farnesiana*)

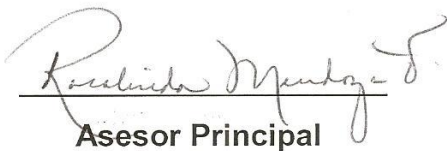
Por:

MARCO ANTONIO ESCALANTE DIAZ.

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

APROBADA


Asesor Principal

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal


Coordinador de la División
Agronomía
Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo
Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Junio de 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO FORESTAL

APLICACIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS Y *AZOSPIRILLUM* SP. EN HUIZACHE.,
(*Acacia farnesiana*)

Por:

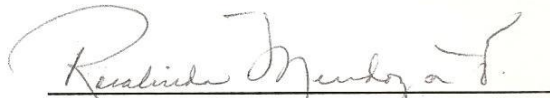
MARCO ANTONIO ESCALANTE DIAZ

TESIS PROFESIONAL

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

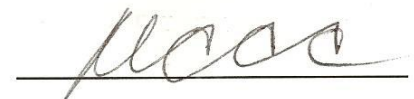
APROBADA



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor principal



Dr. Alejandro Zárate Lupercio
Asesor



Dr. Miguel Ángel Capó Arteaga
Asesor

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2011

AGRADECIMIENTOS.

A **DIOS** por haberme dado el regalo de la vida y la capacidad de terminar una profesión para salir adelante en la vida y por haberme cuidado siempre y por dame la fuerza de lograr mis objetivos profesionales con mucha bondad y amor

A mi **ALMA MATER** por brindarme su abrigo en este tiempo y haberme formados académicamente y personalmente.

A **Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal**, por haberme brindado su apoyo, conocimiento y sobre todo tiempo para poder llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al **Dr. Alejandro Zarate Lupercio**, por su orientación en el desarrollo de esta investigación, por su tiempo y dedicatoria.

Al **Dr. Miguel Ángel Capo Arteaga**, Por su valiosa colaboración en la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Rubén López Cervantes**, por su colaboración en este trabajo por su tiempo y dedicación.

Al **Ing. Sergio Brajam Sabag**, por el apoyo en las instalaciones de invernadero para la realización de este trabajo.

A la **Lic. Minerva Zermeños Camarillo, TLQ. Blanca Elena Rodríguez Pérez y TLQ. Blanca patricia Herrera Gaytán**, por su valiosa colaboración en los análisis de laboratorio que se llevaron a cabo, tratando de que estos se realizaran con la mayor precisión posible.

DEDICATORIA

A mis padres:

Sra. Magdalena Díaz Ventura.

Sr. Antonio Escalante Rodríguez.

Con mi más sincero cariño, respeto y amor por haberme cuidado y dado la vida y por ser la fuente de inspiración para salir adelante, por haber cumplido con sus responsabilidades como padres para la culminación de mis estudios y por todo su amor demostrado en todos momentos. GRACIAS.

A mis hermanos.

Yaena Yuleni Escalante Díaz.

Fredi Alejandro Escalante Díaz.

Jacqueline Marisol Escalante Díaz.

Por todo el apoyo brindado y su cariño, por ser mis grandes amigos de confianza, me siento orgulloso de tener hermanos como ustedes donde solo se conoce el amor, hemos triunfado una vez más porque esto es fruto de nuestros esfuerzos unidos.

A mis compañeros de la generación CXL, por compartir momentos alegres con ellos y brindarme su apoyo durante 5 años que nos ha cobijado la Universidad. María de Jesús, Marisol, Laura Elena, Vera Lucia, Alejandra, María de los Ángeles y Karen. Mis compañeros Juan Carlos, Fredi, Fidel, Lukie, Lalo, Leovi, Zenón, Artemio, Jairo, Jesús, Manuel, Moy, Gerardo, Pichardo y Eriber.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo.....	2
2.1. Hipótesis.....	3
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Huizache (<i>Acacia farnesiana</i>).....	4
2.1.1. Aprovechamiento forestal de <i>Acacia farnesiana</i>	5
2.1.2. Uso forrajero.....	5
2.1.3. En la medicina tradicional.....	5
2.1.4. Otros usos.....	6
2.2. Sustancias húmicas.....	6
2.2.1. Propiedades de las sustancias húmicas.....	8
2.2.2. Efectos de las sustancias húmicas.....	8
2.2.3. Efecto en el suelos.....	9
2.3. <i>Azospirillum sp</i>	14
2.3.1. Interacción con la planta.....	15
2.3.2. Mecanismo de estimulación del crecimiento de la planta.....	17
2.3.3. Fijación de nitrógeno por <i>Azospirillum sp</i>	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Descripción del área experimental.....	19
3.2. Labores culturales.....	20
3.2.1. Deshierbe.....	20

3.2.2. Riego.....	20
3.3. Selección de las plantas.....	20
3.4. Análisis preliminar del suelo.....	20
3.5. Variables agronómicas.....	21
3.5.1. Altura y diámetro.....	21
3.5.2. Incremento en altura y diámetro.....	21
3.6. Preparación de biofertilizante.....	22
3.6.1. Medio de propagación.....	22
3.6.2. Concentración.....	22
3.6.3. Preparación de ácidos húmicos.....	22
3.6.4. Aplicación de la bacteria <i>Azospirillum sp</i> y el fertilizante (Ácidos Húmicos.....	23
3.7. Preparación de la muestra para el análisis radicular.....	23
3.8. Diseño experimental.....	23
3.9. Análisis estadístico.....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Análisis de suelos.....	25
4.2. Análisis de macro y micro elementos.....	26
4.3. Análisis de varianza.....	26
4.3.1. Diámetro (DN).....	26
4.3.2. Altura (HT).....	27
4.4. Análisis del sistema radicular.....	28
4.5. Análisis del área radicular.....	30
V. CONCLUSIONES.....	31
VI. RECOMENDACIONES.....	32
VII. LITERATURA CITADA.....	33

APÉNDICE.....	42
---------------	----

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Aplicación de tratamientos de fertilización e inoculación con <i>Azospirillum sp</i> en <i>Acacia farnesiana</i> bajos invernadero forestal, UAAAN, enero del 2011.....	24
Cuadro 2. Análisis físico y químico de suelo al inicio del experimento en invernadero forestal de la UAAAN, Marzo, 2011.....	25
Cuadro 3. Análisis de micro y macro elementos del suelo, al inicio del experimento en el invernadero forestal de la UAAAN, Marzo, 2011.....	26
Cuadro 4. Análisis de varianza para diámetro de Huizache, inoculas con tres concentraciones de <i>Azospirillum sp</i> y Ácidos húmicos, establecidas bajo invernadero, UAAAN, Mayo, 2011.....	26
Cuadro 5. Prueba de comparación de medias en diámetro con el método de Tukey, con tres concentraciones de <i>Azospirillum sp.</i> y Ácidos Húmicos. UAAAN, Mayo, 2011.....	27.
Cuadro 6. Análisis de varianza para altura de Huizache, inoculadas com três concentraciones de <i>Azospirillum sp</i> y Ácidos Húmicos establecidas bajo invernadero. UAAAN, Mayo, 2011...	27
Cuadro 7. Comparación de medias en altura con el método de Tukey, respecto a la inoculación con tres concentraciones de <i>Azospirillum sp.</i> Y la aplicación de Ácidos Húmicos. UAAAN, Mayo, 2011.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen binaria de longitud de la raíz de <i>Acacia farnesiana</i> del tratamiento 5-R2.....	29
Figura 2. Imagen binaria de diámetro de la raíz de <i>Acacia farnesiana</i> del tratamiento 3-R1.....	29
Figura 3. Imagen binaria de largo y cuello de raíz en <i>Acacia farnesiana</i> , para el T10-R5. (Testigo).....	29
Figura 4. Imagen binaria de del área radicular del T3-R1.....	30
Figura 5. Imagen binaria del área radicular de testigo-R5.....	30

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el efecto de Ácidos Húmicos y *Azospirillum sp* en base a las variables de altura (HT) y diámetros (DN), como también el componente radicular de las planta de *Acacia farneciana*, Las cuales se establecieron en invernadero de forestal de la UAAAN, se seleccionaron 500 plantas, con las características homogéneas en cuanto al diámetro y altura, que estuvieran libre de plagas y enfermedades; el diseño que se utilizo fue el completamente al azar con 10 tratamientos incluyendo el testigo, en el que cada tratamiento cuenta con 5 repeticiones y 10 plantas por cada una de estas. Se aplicaron ácidos húmicos experimental (AH) a una concentración al 1%, 2% y 3% MI^{-1} de agua destilada y una concentración de *Azospirillum sp* de 10^8 , 10^9 y 10^{10} con sus respectivas combinaciones, aplicando agua al testigo. La aplicación de los tratamientos consistió en agregar 20 ml de AH y *Azospirillum sp*, inoculado a la base del cuello de la raíz. Los resultados obtenidos en el experimento son los siguientes; en el análisis de varianza del diámetro y altura no hubo grado de significancia por los cual se concluye que los tratamientos son iguales, pero en la comparación de medias con el método de Tukey numéricamente nos dice que si hay una diferencia entre tratamientos por que nos arroja los siguientes resultados; que en diámetro el mejor tratamiento fue el 6 que tiene una concentración de AH 1% y *Azospirillum sp* 10^{10} ufc mil^{-1} esto son una comparación con el testigo con una diferencia de 0.444 mm con un porcentaje de 17.71%, el cual no concuerda con lo que dice el autor y en diámetro el tratamiento que Marcos R. Pérez (2010) que encontró que de *Azospirillum sp* con una concentración de 10^7 ufc mil^{-1} fue el mejor y en altura fue el T4 con una concentración de AH al 2% y *Azospirillum sp* a una concentración de 10^8 ufc mil con una diferencia de 1.8 cm con un porcentaje de 33.3% en comparación del testigo. Concluyéndose numéricamente que la concentración más alta hace que de *Azospirillum sp* fue la mejor y en altura la concentración media fue la que desarrollo mejor a la planta.

Palabras claves: *Acacia farnesiana*, *Azospirillum sp*, biofertilizacion (AH), incrementos, sistema radicular.

I. INTRODUCCION.

Las zonas áridas y semiáridas son unidades geográficas y ecológicas donde predominan condiciones de sequedad extrema y cobertura vegetal reducida o casi ausente. Dichos factores repercuten en todos los procesos y en el comportamiento de las diferentes especies, adaptadas a vivir en tales condiciones. Estas regiones presentan periodos secos muy prolongados, lluvias irregulares con promedios bastante bajos, temperaturas anuales de 11 a 12°C, y muy fluctuantes entre el día y la noche. Las zonas áridas y semiáridas del país son de gran importancia para la conservación de la diversidad biológica y el mantenimiento de los procesos ecológicos que allí se presentan.

Las plantas de las zonas áridas y semiáridas tienen adaptaciones especiales relacionadas con el acceso al agua del suelo, que se realiza mediante el desarrollo de raíces horizontales hasta de 30 metros y raíces verticales de 15 metros de profundidad facilitando el acceso de agua.

La *Acacia farnesiana*, comúnmente conocida como Espinillo blanco, es así nombrada debido a las numerosas espinas distribuidas a lo largo de sus ramas, es conocido también como Huisache o Huizache o Vinorama. Se cultiva como ornamental y por su leña, porque con él se pueden hacer artesanías muebles, además de la producción de carbón. Es cultivada o fomentada como forrajera y para el control de erosión del suelo, sobre todo en suelos degradados. Es medicinal y se usa para curtir. Es la fuente de un aceite usado perfumería.

Para promover el desarrollo y las condiciones de suelos se están utilizando los ácidos húmicos derivados del mineral Leonardita, una forma oxidada de lignito, y son los constituyentes principales de materia orgánica vegetal en un estado avanzado de descomposición. La humificación es, por lo tanto, un proceso evolutivo por el cual la materia orgánica se va transformando, primero en Humus joven, para pasar a Humus estable hasta llegar a la definitiva mineralización formando el ácido húmico. Los ácidos húmicos tienen dos componentes principales: ácido húmico y fúlvico, en diferentes

proporciones según su origen y método de extracción. La mezcla de estos ácidos se les conoce generalmente como ácido húmico, por su connotación universal con el "Humus" concepto con el que se describía la mayor fertilidad y mejor condición. Los ácidos húmicos influyen en la fertilidad del suelo por su efecto en el aumento de su capacidad de retener agua, contribuyen significativamente a la estabilidad y fertilidad del suelo resultando en crecimiento excepcional de la planta y en el incremento en la absorción de nutrientes.

Otros fertilizantes orgánicos que tienen resultados promisorios por que proporcionan en las plantas nitrógeno, hormonas de crecimiento vegetal, sideróforos y sustancias bactericinas, son las bacterias del género *Azospirillum* las cuáles habitan a menudo en la rizósfera de una amplia variedad de plantas así como en diversas regiones climáticas del mundo, aún cuando son más frecuentes en regiones tropicales, también se les encuentra en regiones, templadas, frías y desérticas.

1.1 OBJETIVOS:

Determinar cuál de las tres concentración de ácidos húmicos y de *Azospirillum sp.* Incrementa el crecimiento radicular, tallo y altura en *Acacia farnesiana* (Huizache), bajo condiciones de invernadero ubicado en la UAAAN.

1.2 HIPOTESIS

-HO: La aplicación de ácidos húmicos e inoculación con *Azospirillum sp.* Producirá diferencias en el crecimiento radicular, tallo y altura por la fijación de nitrógeno y la inducción en la síntesis de hormonas del crecimiento en *acacia farnesiana*. Los ácidos húmicos airean los suelos pesados y mejoran su estructura. De esta manera el agua, los elementos nutritivos y las raíces pueden penetrar más fácilmente en el suelo, en condiciones de invernadero (UAAAN)

-HA: La estimación en crecimiento radicular, tallo y altura de *Acacia farnesiana*, no muestra diferencia en cada uno de las concentraciones de ácidos húmicos y *Azospirillum sp.*

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Huizache (*Acacia farnesiana*)

Árbol o arbusto usualmente pequeño, de 2 a 4 metros de altura, a menudo con varios troncos y acampanados hacia arriba, opconical en forma completa, con una alta densidad de ramas y corona; estipulas en forma de espina; hojas de 3 a 8 cm de longitud, con una pequeña glándula en el peciolo; pinnas de 2 a 6 pares; numerosos foliolos verdes claros, lineales oblongos de 3 a 5 mm de longitud; flores color amarillo vivo en forma de globo de casi 1 cm de grosor, muy fragantes; vainas de 3 a 8 cm de longitud, las valvas coriáceas, con semillas en dos compartimientos (Correll y Johnston, 1970).

El mezquite, (*Acacia farnesiana*), según (Bukart, 1976), se clasifica taxonómicamente como:

Reino: Vegetal

Phillum: Spermathophita

Subphilum: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subfamilia: Mimosoideae

Género: *Acacia*

Especie: *farnesiana*.

2.1.1 Aprovechamiento forestal de *Acacia farnesiana*

Goor y Barney (1968) y Niembro R. (1986) hacen referencia a que la madera del huizache se utiliza para leña y carbón. Así mismo para la obtención de portes para cercados, mangos para herramientas e implementos agrícolas. Por otro lado los mismos autores señalan que en algunos lugares se cultiva como plantas de ornato por la belleza de sus flores amarillas y se recomienda para controlar la erosión y mejorar la fertilidad del suelo.

2.1.2 Uso forrajero

Barrientos R. y López D. (1993) en un estudio realizado para determinar las características y el potencial del huizache como fuente de forraje y taninos en el estado de Jalisco reportó que el valor químico proximal de fruto resultó satisfactorio, sobretodo en la semilla, ya que el contenido proteico es de 23.0% y el de fibra de 22.8%. Lo anterior indica que el huizache puede ser considerado como un forraje de buen valor nutritivo, ya que los rumiantes son capaces de aprovechar los alimentos fibrosos, por poseer enzimas y bacterias que degradan la celulosa y hemicelulosa, aun y que deben eliminarse los taninos en fruto, tanto en cascara como en semilla para mejorar la digestibilidad de los distintos nutrientes (proteína cruda, fibra cruda y la fibra emergente neutra y ácida).

2.1.3 En la medicina tradicional.

Garcia B. (1974) hace referencia al empleo de las raíces en decocción, con gran resultado en la medicina popular y en forma de lavados rectales; mientras que, para cortar el tifo y la tifoidea, recomienda el conocimiento de éstas, y tomar dos o tres tazas al día por vía oral.

Por otro lado el mismo autor indica que las hojas en decocción se emplean en las afecciones de la vejiga; mientras que los frutos machacados dan un jugo astringente que se prescribe para la diarrea y otra irritación de la mucosa.

Por su parte Niembro R. (1986) menciona que la infusión que se obtiene del cocimiento de sus flores se utiliza en medicina casera como remedio en

caso de dispepsia, disentería, inflamación de la piel y de la membrana mucosa, mientras que la corteza se utiliza como astringente.

2.1.4 Otros usos

La raíz y la corteza contiene taninos y se utiliza en curtiduría para fabricar tintas; mientras que el jugo de las vainas inmaduras se utiliza en algunos lugares para pegar porcelana. Sus flores contiene pigmentos y esencias aromáticas y en algunos lugares se utilizan para teñir telas de seda y papel tapiz, así como fabricar perfumes (Goor y Barney, 1968; Garcia B., 1974 y Niembro R. 1986).

Con respecto al porciento de taninos que debe existir en una especie para que sea rentable su extracción debe de ser del 6 al 10%; por lo que el 13% presente en la cáscara de ésta hace que sea un recurso importante en la industria de la curtiduría (Barrientos R. y López D., 1993)

2.2 Sustancias húmicas

Chen *et al.* (1990), Varanini *et al.* (1995) y Piccolo *et al.* (1992), a lo largo de sus investigaciones han recogido la influencia de las sustancias húmicas en el crecimiento de las plantas, en la nutrición mineral, en la productividad y el metabolismo, considerando los efectos positivos sobre la germinación de semillas, la iniciación y el desarrollo radicular, el desarrollo de los brotes, el contenido de nutrientes en numerosos cultivos y la síntesis de ácidos nucleicos o la respiración.

En el suelo, estos compuestos mejoran la estructura de los sustratos, incrementan la capacidad de intercambio del suelo y movilizan micronutrientes (Olmos *et al.*, 1998). Además, las sustancias húmicas se usan para descontaminar suelos, tanto de agentes orgánicos como de metales pesados (Rebhun *et al.*, 1996).

Stevenson (1994) define la materia orgánica del suelo como la totalidad de las sustancias orgánicas presentes en el suelo, incluyendo los restos de tejidos

vegetales y animales inalterados, sus productos de descomposición parcial, la biomasa del suelo, la fracción orgánica soluble en agua y el humus.

De Saussure (1804) fue el primero en utilizar la palabra “humus” (que en latín significa suelo) para describir el material orgánico de color oscuro presente en el suelo. Este autor observó que el humus era más rico en C y más pobre en H y O que el material vegetal de origen. En la actualidad, el término “humus” todavía no se emplea de manera específica y concreta. Mientras que para algunos autores este término significa lo mismo que materia orgánica del suelo, incluyendo sustancias húmicas, materiales orgánicos identificables de elevado peso molecular, como polisacáridos y proteínas, y sustancias simples como azúcares, aminoácidos y otras moléculas, pero excluyendo los tejidos de plantas y animales no descompuestos, los productos de descomposición parcial y la biomasa del suelo (Stevenson, 1994, MacCarthy *et al.*, 1990). Otros autores utilizan el término humus para referirse sólo a las sustancias húmicas (MacCarthy *et al.*, 1990). La materia orgánica del suelo o humus incluye un amplio espectro de constituyentes orgánicos, muchos de los cuales proceden de tejidos biológicos. Podemos distinguir dos grandes grupos, las sustancias no húmicas y las húmicas

Las sustancias húmicas las define Aiken *et al.* (1985) como una categoría de sustancias de color amarillo a negro, de elevado peso molecular y propiedades refractarias. Las sustancias húmicas son omnipresentes, y se encuentran en todos los suelos, sedimentos y aguas.

El origen de las sustancias húmicas ha mostrado ser un factor determinante de los atributos moleculares como acidez y tamaño (Senesi *et al.*, 1989). Las sustancias húmicas de origen acuático son más pequeñas que las aisladas del suelo. Un caso especial son las sustancias húmicas de leonardita que presentan una estructura más condensada (Thorn *et al.*, 1989).

Dentro de estas sustancias heterogéneas, de naturaleza coloidal que hemos llamado sustancias húmicas, encontramos dos grupos de compuestos conocidos como ácidos húmicos y ácidos fúlvicos que podríamos definir como:

Los primeros como el Material orgánico de color oscuro que puede ser extraído del suelo por álcalis y otros reactivos y que es insoluble en ácido diluido (Stevenson, 1994) y los segundos como la Fracción de la materia orgánica del suelo que es soluble en álcali y ácido (Stevenson, 1994).

2.2.1 Propiedades de las sustancias húmicas

Según Calace *et al.* (2000), las estructuras de los ácidos húmicos son más complejas que las de los ácidos fúlvicos, la naturaleza anfifílica de los ácidos húmicos es mayor que la de los ácidos fúlvicos (Yates III *et al.*, 1999). Los ácidos húmicos tienen una menor relación H/C que los ácidos fúlvicos (De Paolis *et al.*, 1997).

Según Stevenson (1994), la acidez total de los ácidos fúlvicos (900-1400 cmol/Kg) prácticamente duplica a la de los ácidos húmicos (500-870 cmol/kg). Esta mayor acidez de los ácidos fúlvicos se debe a que estas sustancias tienen un contenido mayor en grupos carboxílicos (-COOH) e hidroxílicos (-OH), presumiblemente fenólicos, que los ácidos húmicos.

2.2.2 Efectos de las sustancias húmicas

Los efectos, de la aplicación al suelo, de las sustancias húmicas sobre las cosechas han sido explicados por diferentes teorías (Benedetti *et al.*, 1990; Cacco *et al.*, 1984). La más aceptada por la comunidad científica es la hipótesis que asigna a las sustancias húmicas unos “efectos directos” sobre la planta, teniendo un comportamiento hormonal, y unos “efectos indirectos” actuando sobre el metabolismo de los microorganismos del suelo y la dinámica de los nutrientes, las sustancias húmicas son capaces de alterar la absorción de micronutrientes por las raíces (Visser, 1985) y modifican las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo del nitrógeno.

Autores como Ferreti *et al.* (1991), Malcolm *et al.* (1979) y Visser (1985) parecen demostrar que las sustancias húmicas son capaces de inducir cambios estructurales en el ADN, también pueden ser muy eficaces, como ya hemos dicho, para disminuir la contaminación del suelo producida por metales pesados o compuestos orgánicos como los herbicidas (Lubal *et al.*, 1998, Loffredo *et al.*, 1997). Los distintos efectos que las sustancias húmicas producen en las propiedades del suelo o en el desarrollo vegetal van a estar gobernados por la concentración en la que se encuentren, su naturaleza (García, 1990), el peso molecular de las fracciones húmicas y su contenido en grupos funcionales (Piccolo *et al.*, 1992), así como de la especie vegetal, su edad y estado nutricional (Albuzio *et al.*, 1986)

2.2.3 Efectos en el suelo

La materia orgánica, concretamente las sustancias húmicas pueden incidir indirectamente en la nutrición vegetal por distintos mecanismos:

- Suministrando nutrientes a las raíces.

Las sustancias húmicas pueden servir de fuente de N, P y S (Akinremi *et al.*, 2000), que liberan a través de la mineralización que la materia orgánica sufre en el suelo. Esta fuente de elementos también se debe a la posibilidad de complejar metales que tienen las sustancias húmicas, (Tan *et al.*, 1979, Sánchez-Andreu *et al.*, 2000). Sin embargo, este comportamiento va a estar determinado, en gran medida por el cultivo y las condiciones que lo rodean. Duplessis *et al.* (1983) observaron que la aplicación de leonardita incrementaba la producción y los niveles de N, P, K para maíz cultivado en un suelo franco-arenoso, mientras que no afectó a la producción, ni a los niveles cuando era aplicado en maíz cultivado en suelo arcilloso. La diferencia en la respuesta fue atribuida al alto contenido de arcilla y/o materia orgánica del suelo. Akinremi *et al.* (2000) concluyeron que la adición de leonardita provocaba mejoras en los niveles foliares de N, P, K de los cultivos de nabos, trigo y judías. Además, en el cultivo de nabos se producía un aumento en el nivel de S. Estos resultados

se deben, según los autores, a una combinación de los efectos directos de los ácidos húmicos sobre los procesos fisiológicos de la planta, y un efecto indirecto incrementando la disponibilidad de nutrientes para el vegetal. Adani *et al.* (1998) estudiaron como influía la aplicación de ácidos húmicos comerciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate; entre sus resultados encontraron que cuando se aplicaban ácidos húmicos de turba o leonardita al suelo se obtenían un incremento significativo en el contenido radicular de hierro, mejorando también la nutrición respecto a otros elementos como el N, Ca o P. Los autores llegaron a la conclusión de que el incremento en la concentración de hierro podría deberse a la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por la presencia de los ácidos húmicos. Adani *et al.* (1998) encontraron aumentos de un 41% y un 33% en el contenido de hierro cuando se aplicaban ácidos húmicos de turba en plantas de tomate en dosis de 20 y 50 mg/L, y un 31% y 46% cuando se aplicaban ácidos húmicos de leonardita en las mismas dosis. En las raíces los incrementos máximos fueron del 123% cuando el ácido húmico procedía de turba y del 161% cuando se empleaba el ácido húmico de leonardita. La justificación para explicar la mayor disponibilidad de hierro en las plantas se encontró en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por los ácidos húmicos.

- Mejora de la estructura del suelo.

Los suelos pobremente agregados tienen un tamaño de poro demasiado pequeño para permitir el necesario movimiento del aire y el agua, por el contrario en suelos con agregados estables, aunque sean de textura fina hay un adecuado intercambio de gases con la atmósfera (Stevenson, 1994), creciendo las raíces en un ambiente más idóneo y teniendo la planta un mejor crecimiento. La materia orgánica del suelo (MOS) es un factor estabilizador de la estructura del suelo, ya que ayuda a mantener las partículas minerales unidas frente a las fuerzas desestabilizadoras como el humedecimiento e impacto de las gotas de lluvia (Lado *et al.*, 2004). Se ha encontrado una alta correlación entre el contenido de carbono orgánico del suelo (CO) y la agregación (Hermawan y Bomke, 1997), así como con la estabilidad de los agregados formados (Haynes *et al.*, 1997), debido a la acción enlazante de las sustancias húmicas y otros productos generados por la actividad microbiana (Shepherd *et al.*, 2001). Así, al referirse al estado estructural del suelo, además

de determinar las partículas minerales que dominan en su superficie, es importante cuantificar la cantidad y el tipo de materia orgánica presente. En general, la MOS promueve la estabilidad de los agregados porque reduce el hinchamiento del agregado, disminuye la permeabilidad del agregado, reduce las fuerzas destructivas del fenómeno de estallido y aumenta la fuerza intrínseca de los agregados (Fortun y Fortun, 1989). La efectividad del CO en formar agregados estables está relacionada con su tasa de descomposición, la cual a su vez está influenciada por su protección física y química de la acción microbiana (Bronick y Lal, 2005). El contenido de MOS no siempre tiene correlación, o ésta es baja, con la estabilidad de los agregados. Lo anterior sugiere que la cantidad de MOS por si misma no es directamente responsable del número y estabilidad de los agregados. Por tanto, la estabilidad puede depender más del tipo de MOS y su disposición con respecto a las partículas minerales (Fortun y Fortun, 1989; Holeplass *et al.*, 2004). Los compuestos de la MOS enlazan física y químicamente las partículas primarias en los agregados (Lado *et al.*, 2004). La cantidad y distribución de los agregados estables e inestables en el suelo tienen una asociación estrecha con la dinámica de la MOS y la calidad del suelo. Por ello, los problemas de erosión de un suelo se evalúan estudiando los agregados estables (Márquez *et al.*, 2004). Además, los principales factores que afectan la estabilidad de los agregados están asociados con la distribución del tamaño de partículas y a los niveles de materiales cementantes (Pagliai, 2003; Comerma *et al.*, 1992).

2.2.4 Efectos en la planta

En los últimos años, las investigaciones sobre sustancias húmicas se han centrado sobre todo en sus acciones directas. Se han investigado sus efectos bioestimulantes (Ramos, 2000; Vivas, 2001) considerando la implicación de estos productos en los diferentes procesos fisiológicos-bioquímicos que tienen lugar en la planta.

- Absorción de las sustancias húmicas

Aso *et al.* (1963) y Prat (1963) demostraron la presencia de las sustancias húmicas en los tejidos de las plantas a través de la tinción con diversos materiales de color oscuro. En la actualidad, sin embargo, se prefiere marcar

las sustancias húmicas con un elemento radiactivo como el ^{14}C para ver si penetra en el interior de las plantas. En 1959, Prat *et al.* ya consiguieron demostrar que los ácidos húmicos se acumulaban en las raíces de la remolacha azucarera y el maíz. Sólo una pequeña fracción de radioactividad fue transportada desde las raíces a los tallos. Estos resultados han sido contrastados por otros autores como Führ *et al.*, 1967, Vaughan *et al.*, (1976), con experiencias en girasol (*Helianthus annuus* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.).

- Efecto en el crecimiento radicular

Se considera suficientemente probado que estos compuestos mejoran el crecimiento radicular, ya sea por aplicación foliar o adición al suelo (Sladky, 1959; Fernández 1968, Sánchez-Conde *et al.*, 1972; Sánchez-Andreu *et al.*, 1994). Tanto la elongación como la formación de los primeros pelos radiculares van a estar afectados por los materiales húmicos. Las dosis empleadas de las sustancias húmicas van a ser determinantes para que los efectos sean positivos o negativos. Young *et al.* (1997) encontraron que ácidos húmicos purificados procedentes de diferentes orígenes mejoraban significativamente el crecimiento radicular en semilleros de lechuga, pasando de una longitud radicular media de 13,6 mm para el control a 20,2 mm cuando se aplicaban ácidos húmicos de turba. Estos efectos los autores los justificaban diciendo que los ácidos húmicos pueden tener enlazadas a su estructura poliaminas (putrescina, espermidina, permina) que se encuentran en las paredes celulares y tienen una reconocida función reguladora en las plantas (Galston *et al.*, 1990, Nardi *et al.*, 1994). La aplicación foliar de sustancias húmicas a *Agrostis stolonifera* L. presentó un efecto muy limitado en el enraizado, mientras la incorporación de humato granular hasta a 10 cm de profundidad mejoró sensiblemente el enraizado, seguramente debido a la proximidad a las raíces (Cooper *et al.*, 1998).

- Absorción de macronutrientes

La estimulación del crecimiento vegetal producido por las sustancias húmicas ha sido generalmente relacionado con la mejora en el contenido en macronutrientes. Como en todos los efectos de las sustancias húmicas, su

influencia en la absorción de macronutrientes va a estar determinada por: la especie vegetal tratada; Guminiski *et al.* (1983) encontraron que la adición de 100 mg/kg de sustancias húmicas procedentes de compost provocaba aumentos en la concentración de P y K en plantas de tomate, mientras que en plantas de maíz, similares concentraciones de sustancias húmicas provocaban disminuciones en la concentración de P; el origen del material húmico; Fernández *et al.* (1968) demostraron que los ácidos húmicos de estiércol incrementaban la absorción de N independientemente de las dosis, mientras que los ácidos húmicos de turba sólo mejoraban los niveles de N cuando se usaban concentraciones muy bajas; o las dosis utilizadas; por lo general altas concentraciones de ácidos húmicos y/o fúlvicos son inhibitorias (Rauthan *et al.*, 1981).

Dormaar (1975) recogió un incremento en el nivel de N en *Festuca scabrella* como respuesta a la aplicación de sustancias húmicas extraídas de tres tipos de suelos diferentes, mientras P, K, Ca, Mg y Na no eran afectados. Gaur (1964) encontró incrementos en los niveles de N, P y K en plantas de centeno (*Lolium perenne* L.) desarrolladas en arena con la aplicación de ácidos húmicos extraídos de compost. Varshovi (1996) no encontró incremento en el nivel de N de bermuda grass (*Cynodon dactylon* L.) al aplicar humatos comerciales a 0, 268 y 803 kg/ha. Los resultados de Cooper *et al.* (1998) al aplicar sustancias húmicas foliarmente o al suelo sobre *Creeping bentgrass*, no mostraron mejoras en las concentraciones de N, Ca o Mg, mientras que el P aumentaba tanto para la aplicación foliar como al suelo.

Al estudiar la influencia de las sustancias húmicas sobre el nivel de K en las plantas, frecuentemente encontramos que se producen descensos en el contenido de potasio. Adani *et al.* (1998) observaron que cuando se aplicaban ácidos húmicos de turba a plantas de tomate, el nivel de potasio en la planta era de 56,51 y 59,51 mg/g de materia seca cuando las dosis eran de 20 y 50 mg/L, respectivamente, siendo la concentración de K en la planta para el control de 59,51 mg/g de materia seca. Cuando el ácido húmico empleado era de leonardita las concentraciones de K eran de 47,27 y 50,23 mg/g de materia seca para las dosis de 20 y 50 mg/L, respectivamente, teniendo el control un nivel de K de 52,53 mg/g de materia seca. Los autores concluyeron que este

descenso en el contenido de K era consecuencia de un proceso de dilución, como consecuencia de un mayor crecimiento de la planta.

2.3 *Azospirillum* spp.

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand, *et al.*, 1978), siendo éstas las más ampliamente estudiadas. Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense* (Dobereiner, *et al.*, 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold, *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khamas, 1989) y *A. largomobile* (Ben Dekhil, 1997) siendo el nombre de esta especie corregido a *A. largimobile* (Sly, *et al.*, 1999). Pocos años antes ésta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum* (Dobereiner, *et al.*, 1986). Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (Hartmann, *et al.*, 2000).

Pocos años después del redescubrimiento de *Azospirillum* y hasta alrededor de 1993, este género fue el más estudiado entre las bacterias asociadas a plantas. La capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento de las plantas y de aumentar el rendimiento de los cereales promovió numerosos estudios sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria.

Clasificación taxonómica de *Azospirillum* Según el manual de Bergey (1984)

Reino	Procaryote
División	Glacilicute
Clase	Scotobacteria
Familia	No existe
Genero	<i>Azospirillum</i>
Especie	<i>A. lipoferum</i>
	<i>A. brasilense</i>

2.3.1 Interacción con la planta

Probablemente, una vez que las células de *Azospirillum* se han adaptado a las condiciones del ambiente rizosférico y han logrado llegar a la superficie de las raíces, debido a sus características quimio y aerotácticas, se iniciará el establecimiento de la asociación. Diferentes estudios han mostrado que *A. brasilense* tiene la capacidad para adherirse a las raíces de plantas gramíneas como el mijo (*Pennisetum purpureum*) y *Digitaria decumbens* (Umali-Garcia, et al., 1980), trigo (Jain, et al., 1984), maíz (Gafny, et al., 1986), así como a las raíces de plantas de otras familias que incluyen al algodón y tomate (Levanony, et al., 1991), e incluso a superficies inertes como poliestireno y arena (Bashan, et al., 1991, Bashan, et al., 1991, Levanony, et al., 1991). La capacidad de *Azospirillum* para adherirse a las raíces, al menos a las de mijo, es significativamente mayor que la mostrada por otras bacterias de la comunidad rizosférica como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas*, e incluso que *E. coli* (Umali-Garcia, et al., 1980).

El proceso de adherencia de *Azospirillum* a las raíces de las plantas ha sido revisado recientemente (Burdman, et al., 2000). En diversos casos se ha

reportado la aparición de material fibrilar que contribuye al anclaje de *Azospirillum* a las raíces de diversas plantas (Levanony, *et al.*, 1991, Umali-Garcia, *et al.*, 1980), describiéndose como esencial para el anclaje a las partículas de arena (Bashan, *et al.*, 1991). Aún en la actualidad, la naturaleza del material fibrilar no ha sido elucidada (De Troch, *et al.*, 1996, Steenhoudt, *et al.*, 2000), aunque parece ser de origen bacteriano. Recientemente se ha publicado una revisión sobre la capacidad de *Azospirillum* para adherirse a superficies abióticas del suelo (Bashan, 1999).

La inoculación de diversas plantas con *Azospirillum* ha mostrado que los principales sitios de colonización son las áreas de elongación celular y las bases de los pelos radicales (Levanony, *et al.*, 1991, Kapulnik, *et al.*, 1985). Sólo algunas células de *Azospirillum* llegan a adherirse a la cofia o a los pelos radicales (Kapulnik, *et al.*, 1985). Sin embargo, fue observada la presencia de *Azospirillum* dentro del mucigel que se acumula en la cofia (Umali-Garcia, *et al.*, 1980). 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, Michiels, *et al.*, 1991). La segunda fase consiste de un anclaje lento pero firme e irreversible que alcanza su máximo nivel 16 horas después de la inoculación, el cual parece ser dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum* (Michiels, *et al.*, 1991). Los resultados de un estudio reciente sugieren la posibilidad de que una proteína de la membrana externa de *Azospirillum* participe en el proceso de adherencia a las raíces de las plantas (Burdman, *et al.*, 2000). La inoculación de raíces de trigo con una cepa de *Azospirillum* que expresa constitutivamente el gen reportero *gusA* 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 Broek, *et al.*, 1993). En plantas de trigo fue observado que la inoculación de *Azospirillum* induce cambios en la morfología de los pelos radicales, siendo éstos cambios significativamente

mayores que los causados por *Rhizobium leguminosarum* o *Azotobacter chroococcum*, los cuales son mínimos (Jain, *et al.*, 1984, Kapulnik, *et al.*, 1985). Además, fue observado que la inoculación con 10^5 a 10^6 células de *Azospirillum* causa tanto la elongación como el aumento de la superficie total de la raíz, en tanto que la inoculación de 10^8 a 10^9 células causa la inhibición del desarrollo de ésta (Kapulnik, *et al.*, 1985).

Aparentemente, el incremento del tamaño del sistema radical se debe, al menos parcialmente, al aumento de la división celular y al intenso crecimiento de la zona de elongación de las raíces (Levanony, *et al.*, 1988). Es de interés señalar que los sitios que coloniza *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.

2.3.2 Mecanismos de estimulación del crecimiento de las plantas

En numerosos estudios de inoculación con *Azospirillum*, además del mejor crecimiento de las plantas, fueron observados incrementos en el contenido de nitrógeno total de las plantas inoculadas respecto a las testigo (Baldani, *et al.*, 1983, Cohen, *et al.*, 1980, Kapulnik, *et al.*, 1981, Kapulnik, *et al.*, 1985, Murthy, *et al.*, 1988, O'Hara, *et al.*, 1981, Pacovsky, *et al.*, 1985, Schank, *et al.*, 1981, Smith, *et al.*, 1984) y en la incorporación de ^{15}N (Kucey, 1988, Rennie, 1980, Rennie, *et al.*, 1987). No obstante, en la mayoría de estos estudios no fueron observadas diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno o en el contenido de proteína entre plantas inoculadas y no inoculadas, razón que contribuyó a desechar la idea de que la fijación biológica de nitrógeno fuera el mecanismo responsable de los efectos benéficos observados.

Debido a que los efectos de la inoculación con *Azospirillum* sobre el crecimiento de la raíz y la parte aérea de las plantas son similares a los que se presentan cuando las plantas son tratadas con fitohormonas (Reynders, *et al.*, 1979, Tien, *et al.*, 1979) fue sugerido que estas sustancias podrían ser

responsables del mejor crecimiento de las plantas, así como de los incrementos observados en el contenido de minerales y en el rendimiento de los cultivos (Baldani, *et al.*, 1983, Boddey, *et al.*, 1986, Caballero-Mellado, *et al.*, 1992, Kapulnik, *et al.*, 1985, Millet, *et al.*, 1984, Nayak, *et al.*, 1986, O'Hara, *et al.*, 1981, Paredes-Cardona, *et al.*, 1988, Smith, *et al.*, 1984).

2.3.3 Fijación de nitrógeno por *Azospirillum sp.*

Evans (1975) y Brown *et al.*, (1975), indican que la fijación de nitrógeno es un proceso clave para llevar un equilibrio en la vida de este planeta, por esta razón se recobra el nitrógeno que se pierde por la desnitrificación microbiana en el suelo. Existe también la posibilidad de que la fijación del nitrógeno por la nitrogenasa estimula el desarrollo de catalizadores que pueden reducir la demanda energética para el nitrógeno fijado industrialmente.

Alcalde (1981), presentó cinco requerimientos para la fijación de nitrógeno en la bacteria: Un eficiente metabolismo oxidativo

- Un mecanismo de protección contra el oxígeno para evitar la depresión de la actividad nitrogenasa por el oxígeno
- Una buena fijación del nitrógeno, con asimilación de NH_4^+ sin crecimiento de la bacteria
- Una rápida excreción del ion NH_4^+
- Una enzima nitrito reductasa negativa (Nir^-)

2.3.4 Efecto de *Azospirillum sp* en la morfología de las plantas

Las bacterias del género *Azospirillum* constituyen los inoculantes más comúnmente utilizados en trigo. Okon y Labandera-Gonzalez (1994) mencionan que la inoculación con *Azospirillum* estimula el crecimiento de raíces, que aumentarían su longitud, densidad y velocidad de crecimiento. También promueve la producción de auxinas, lo cual incrementa la tasa de crecimiento aérea y radicular. Esto se ve frecuentemente reflejado en una mayor absorción de agua y nutrientes.

Los efectos de la inoculación de las plantas con *Azospirillum*, se producen en los estadios iniciales de crecimiento, en las primeras semanas después de la colonización radicular (Fallik *et al.*, 1994)

Se estima que solo el 50 por ciento del fertilizante aplicado, es usado por la planta y mucho del remanente se pierde por distintos procesos ya conocidos, de ahí la importancia de *Azospirillum* para un uso más eficiente de este, por parte de la planta y un enriquecimiento del suelo gracias a su asociación con las raíces (Okon, *et al.*, 1985) En plantas inoculadas con *Azospirillum* se favorece una mayor exploración del suelo y se incrementa la captación de agua y nutrientes (Fallik, *et al.*, 1994).

III.- MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área experimental

El siguiente trabajo se llevó a cabo en el invernadero del departamento de Forestal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Durante el ciclo primavera-verano del 2011; cuyas coordenadas geográficas son; 25° 21' 11" latitud **norte** y 101° 01' 38" longitud oeste del meridiano de Greenwich, con una altitud de 1,743 msnm (Martinez 1994).

El invernadero estaba controlado a una temperatura de 27°C durante el día y de 22°C por la noche en la época de verano, con una humedad relativa de 65 a 70%. El invernadero cuenta con las siguientes funciones, control de temperatura y humedad relativa, control de sombra artificial, riego y ventilación automática; en las cuales en este invernadero de alta tecnología se producen plántulas en charolas germinativas de Angiospermas y Gimnospermas.

3.2 Labores culturales

3.2.1 deshierbe

Se realizaron deshierbes a las plantas seleccionadas manualmente cuatro veces, el cual uno fue al inicio del experimento y los otros tres fueron a cada mes antes de aplicar los tratamientos, con esta actividad se mantuvieron a las plantas libres de malezas, para que no pudieran afectar al crecimiento y desarrollo de estas.

3.2.2 Riego

Se aplicaron riegos a las plantas 3 veces a la semana, hasta capacidad de campo.

3.3 Selección de las plantas

Para realizar el experimento se tuvieron que seleccionar las plantas, de las cuales se trato de que estas tuvieran una altura homogénea, se seleccionaron 500 plantas, distribuidas en 50 unidades experimentales con 10 plantas por unidad. Se establecieron 9 tratamientos de los cuales estos tenían 5 repeticiones con un total de 50 plantas por tratamiento con un total de 450 plantas por los 9 tratamientos y de las cuales 5 unidades experimentales fueron como testigo con una densidad de 50 plantas.

3.4 Análisis preliminar de suelo

Para el análisis preliminar del suelo se tomaron tres plantas que fueran representativas del experimento, y se analizó el suelo en el laboratorio del departamento de Ciencias del Suelo de la UAAAN.

Las muestras fueron tamizadas por una maya No. 2 mm para determinar características físicas y químicas de suelo; La materia orgánica (M.O) se cuantificó con el método Walkley y Black ; nitrógeno (N) total se analizó mediante el método de MicroKjeldahl; la **textura** (t) con el Hidrómetro de Boyoucaus, el Fósforo (**P**) método de Olsen por colorimetría con la

extracción de bicarbonato de sodio, la **conductividad eléctrica** (C.E.) conductimétero manual , el potencial hidrógeno(**pH**) se leyó con el potenciómetro en una suspensión de suelo- agua; mientras que la de minerales (Ca, Mg, Fe, K, Zn, Pb) se realizó mediante el método de digestión húmeda por absorción atómica.

3.5 Variables agronómicas

3.5.1 Altura y Diámetro

Se inició la medición preliminar de las plantas al establecer las parcelas experimentales, midiendo altura (Ht) que se realizo una cinta métrica (cm) desde la base del tallo hasta la parte mas alta de la planta, y el diámetro (Dn) se realizo con el vernier digital expresado en (mm); ambas variables se evaluaron a los 30, 60 y 90 días.

La primera evaluación de Dn y Ht se realizo el 12 de febrero del año en curso y a si sucesivamente el 12 de cada mes, hasta la última medición que fue el día 12 de mayo del 2011.

3.5.2 incrementos en altura y diámetro

Para realizar el cálculo de los incrementos en DN y HL se tomaron en cuenta la medición inicial y la final, en el cual se realizó una base de datos en el programa estadístico Excel de cada variable a medir, del cual se hizo la diferencia del la primera medición y la medición final, de las cuales se tuvieron que calcular las media por parcelas de los incrementos ya calculados, dándonos el incremento total del experimento. Mediante la siguiente formula.

$$IT= MF-MI$$

IT= Incremento total.

MF= Medición final

MI= Medición inicial

3.6 Preparación de biofertilizante

3.6.1 Medio de propagación

La cepa de *Azospirillum* sp fue aislada de raíces de trigo en Buenavista, Coahuila se reprodujo en medio NFb a 30 °C en la incubadora en medio líquido (Rodríguez – Cáceres, 1985) y se cuantificaron las ufc ml⁻¹ por el método de dilución en placa.

3.6.2 Concentración

La cepa de *Azospirillum* se obtuvo a una concentración de 10¹⁰UFC mL⁻¹, a partir de la cual se realizaron diluciones de 10⁹ y 10⁸ UFC mL⁻¹. Se realizaron tres aplicaciones cada 30 días iniciando el 15 de febrero del 2011, así hasta el 15 de abril del 2011.

3.6.3 Preparación de ácidos húmicos

Se preparó la dilución de ácidos húmicos al 1,2 y 3 %, ml⁻¹ de agua destilada, para ser aplicada en el experimento junto con la bacteria, logrando optimizar la eficiencia del producto en las plantas.

Las concentraciones que se aplicaron fueron 1% (10⁸, 10⁹, 10¹⁰), 2% (10⁸, 10⁹, 10¹⁰), y 3% (10⁸, 10⁹, 10¹⁰), para cada uno de los tratamientos experimentales. La aplicación de este producto se realizó el día 14 de febrero del 2011, así mismo los días 14 de cada mes fue aplicado hasta culminar el 14 de abril del mismo año.

3.6.4 Aplicación de la bacteria *Azospirillum sp* y el fertilizante (ácidos húmicos)

Se realizó la aplicación de *Azospirillum sp* y las concentraciones de Ácidos húmicos a las 45 unidades experimentales, con un total de 450 plantas fertilizadas e inoculadas con la bacteria.

Para la aplicación de las bacterias y Ácidos húmicos se utilizó un vaso precipitado, el cual se aplicó 20 ml por planta, y esta se aplicó al cuello del tallo de la planta, para que la planta pueda fijar el nitrógeno y los nutrientes que la planta requiere por medio de la raíz.

3.7 Preparación de la muestra para el análisis radicular.

Se seleccionaron las plantas en base a los datos de altura y diámetro, siendo estas las más representativas de los tratamientos y de las repeticiones.

Se tuvieron que sacar las plantas de las bolsas de polietileno para poder descubrir totalmente la raíz, las cuales se tuvieron que lavar y preparar un día antes del análisis, en el departamento de ciencias del suelo de la UAAAN.

Para el análisis se tomó la fotografía de la raíz de cada tratamiento, en un cuarto oscuro, para que el flash de la cámara pudiera captar la imagen de la raíz, para que pudiera reflejar bien la imagen de la raíz, las fotos de la raíz fueron analizadas con el programa imag Proc

3.8 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue el completamente al azar, con 10 tratamientos y 5 repeticiones cada uno; las unidades experimentales (repeticiones) tuvieron un total de 10 plantas cada una a sí mismo se le aplicaron las dosis y concentración de *Azospirillum sp* y Ácidos Húmicos como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Aplicación de tratamientos de fertilización e inoculación con *Azospirillum sp* en *Acacia farneciana* bajos invernadero forestal, UAAAN, enero del 2011.

T	DC.	PARCELA				
		R1	R2	R3	R4	R5
T1	1% - 10 ⁸	42	8	13	28	44
T2	1% - 10 ⁹	20	40	29	38	24
T3	1% - 10 ¹⁰	46	41	49	23	36
T4	2% - 10 ⁸	19	43	10	14	6
T5	2% - 10 ⁹	37	11	7	26	3
T6	2% - 10 ¹⁰	27	4	21	1	31
T7	3% - 10 ⁸	35	48	39	15	18
T8	3% - 10 ⁹	9	22	17	12	2
T9	3% - 10 ¹⁰	45	47	34	32	50
T10	TESTIGO	16	30	5	33	25

T= Tratamiento; DC= Dosis de concentración de Ácidos Húmicos y *Azospirillum sp*; R1, R2...R5=Repeticiones (parcelas) que recibieron tratamiento.

3.9 Análisis estadístico

La captura de los datos se realizó en el programa Microsoft Office Excel, donde se realizaron los cálculos de los incrementos por tratamiento y repetición y el análisis de varianza (ANVA) en el programa estadístico SAS (Static Analysis System) y utilizando el método de Tukey para la comparación de medias.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente

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

i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 (tratamientos)

j=1, 2, 3, 4, 5 (repeticiones)

En donde:

Y_{ij} = Valor observado en las diferentes variables

μ = Efecto de la Media poblacional

T_i = Efecto verdadero del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental en la e-ésima repetición.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de suelo

Se analizaron 3 muestras de suelo para determinar los nutrientes disponibles en el suelo y a qué tipo de suelo pertenece; el análisis del suelos se efectuó con la ayuda de las tablas de equivalencias, que es una guía para interpretar los niveles de nutrimentos que posee el suelos analizado. En el cual el análisis de **N** y **P** resultaron totalmente ricos según los datos arrojados, la **Materia Orgánica** fue extremadamente rica, con el **PH** que fue neutro y la textura que fue calcificada como Migajón.

Cuadro 2. Análisis físico de suelo al inicio del experimento en invernadero forestal de la UAAAN, Marzo, 2011.

Muestras	N (%)	P (ppm)	M.O (%)	CE (μscm^{-1})	pH	TEXTURA
M1*	3.97	89.97	3.89	98	6.6	Migajón
M2*	4.12	89.2	4,71	137	6.8	Migajón
M3*	4.78	81.34	3.7	135	6.9	Migajón

Los niveles de Zn, Fe, Cu y Mn son adecuados y al pH del suelo se encuentran disponibles de acuerdo al Cuadro 3.

4.2 Análisis de macro y micro elementos

Cuadro 3. Análisis de micro y macro elementos del suelo, al inicio del experimento en el invernadero forestal de la UAAAN, Marzo, 2011.

	Zn $\mu\mu$	Pb	Ca	Mg	K	Mn	Fe
MUESTRAS							
				ppm	ml		
M1	0.4	1.0	2000	25	13	2.2	trazas
M2	0.5	1.0	1300	30	21	1.7	trazas
M3	1.5	1.0	1150	25	20	2	trazas

4.3. Análisis de varianza

4.3.1 Diámetro (DN)

Con respecto al diámetro (DN), no se presentó diferencia significativa, de acuerdo al análisis de varianza (ANVA), entre las diferentes concentraciones de ácidos húmicos y *Azospirillum sp* (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza para diámetro de Huizache, inoculas con tres concentraciones de *Azospirillum sp* y Ácidos húmicos, establecidas bajo invernadero, UAAAN, Mayo, 2011.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	9	0.71852800	0.07983644	0.98	0.4676NS
Error	40	3.24400000	0.08110000		
Total	49	3.96252800			
C.V	18.84%				NS= No significativo.

En la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 5), numéricamente el tratamiento (T6) que tiene una concentración de Ácidos Húmicos al 2% y una concentración de *Azospirillum sp*. 10^{10} UFC ml⁻¹, en comparación con el testigo hubo un incremento en diámetro de 0.444 mm que en porcentaje es de 17.71%. Estos resultados no concuerdan con lo obtenido en esta investigación ya que Pérez (2010) encontró que la aplicación de *Azospirillum sp* con una concentración de 10^7 ufc ml⁻¹ más una concentración de Ácidos Húmicos de 0.6% obtuvo como mayor diámetro 16.74 mm que en relación con el testigo que fue de 8.14 mm, hubo una diferencia de 8.14 mm

La prueba de comparación de medias para altura de planta con el método de Tukey, no mostró significancia, sin embargo el T4 que tiene una concentración de Ácidos Húmicos al 2% y de *Azospirillum* sp 10^8 UFC ml⁻¹, produce una diferencia de incremento comparada con el testigo de 1.8 cm con un porcentaje de 33.3%, estos resultados concuerdan con lo obtenido en esta investigación ya que Medina *et al.*, (1997) en su trabajo de investigación al evaluar la respuesta del cultivo de tomate a la aplicación de biopreparados en concentración de 10^7 ufc ml⁻¹ para *Azospirillum brasiliense* y *A. lipoferum* y 10^8 para *A. chroococcum* que es una especie diferente, reportaron diferencias significativas entre tratamientos para la altura de tomate. Sin embargo, Kapulnik *et al.*, 1985 encontraron que la inoculación de 10^8 y 10^9 ufc ml⁻¹ causan la inhibición del desarrollo de la planta de trigo.

Cuadro 7. Comparación de medias en altura con el método de Tukey, respecto a la inoculación con *Azospirillum* sp. y la aplicación de Ácidos Húmicos. UAAAN, Mayo, 2011.

DC	MD	T
Al 2 % con 10^8	5.698 A	T4
Al 3 % con 10^9	5.214 A	T8
Al 2 % con 10^{10}	4.954 A	T6
Al 3 % con 10^{10}	4.814 A	T9
Al 1 % con 10^8	4.720 A	T1
Al 2 % con 10^9	4.078 A	T5
Testigo	3.824 A	T10
Al 1% con 10^{10}	3.792 A	T3
Al 3 % con 10^8	3.314 A	T7
Al 1% con 10^9	3.084 A	T2

DC= Dosis de concentración de la bacteria y el biofertilizante
 MD= Medias en diámetro; T= Tratamiento, A= nos demuestra que los tratamiento son iguales (Tukey, 0.05).

4.4 Análisis del sistema radicular

Se realizó el análisis de raíz para la comparación de longitud y diámetro expresado en milímetro. El tratamiento 3 (ácidos únicos 1% y 10^{10} UFC ml⁻¹ *Azospirillum* sp) fue el que obtuvo una mayor longitud de 319 mm y la que obtuvo mayor diámetro fue el tratamiento 5 (ácidos húmicos al 2 % y

Azospirillum a 10^9 UFC ml⁻¹) que fue de 8.1 mm, esto en comparación con el testigo que presentó una longitud de 268 mm y un diámetro de 6.82 mm. Pero esto no concuerda con el autor Kapulnik *et al.*, 1985 quién observó que la inoculación con 10^5 y 10^6 ufc mil⁻¹ de *Azospirillum sp* causan tanto la elongación como el aumento de la longitud de la raíz en la planta de trigo. Lo anteriormente señalado coincide con los reportes de Okon y Labandera-González (1994) quienes mencionan que la inoculación con *Azospirillum sp* estimula el crecimiento de la raíz, que aumenta su longitud, densidad y velocidad de crecimiento.

En las siguientes imágenes podemos observar las diferencias entre los tratamientos y el testigo.

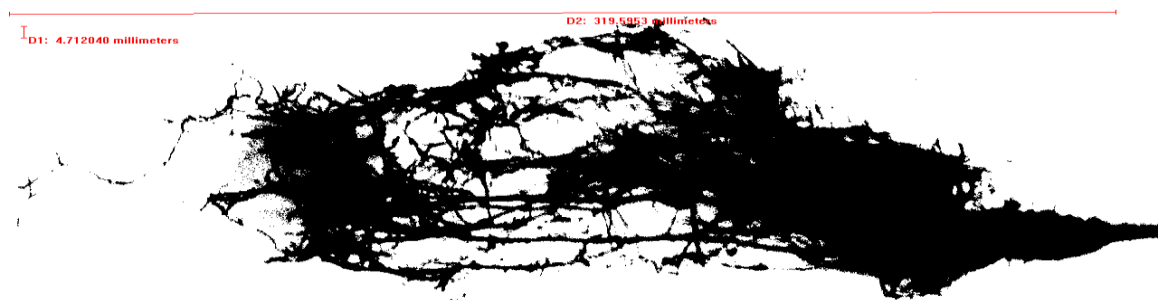


Figura 1. Imagen binaria de longitud de la raíz de *Acacia farnesiana* del tratamiento 5-R2.

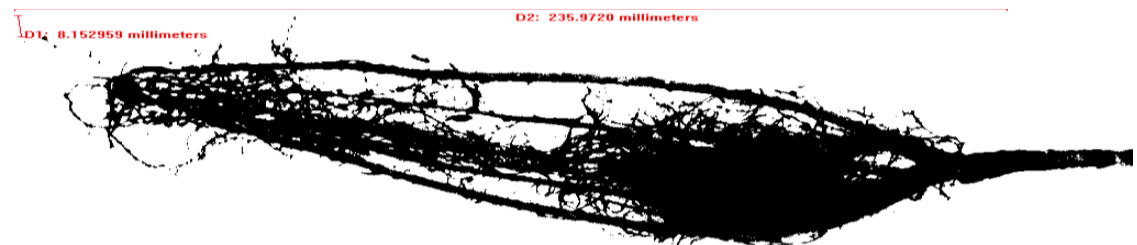


Figura 2. Imagen binaria de diámetro de la raíz de *Acacia farnesiana* del tratamiento 3-R1.

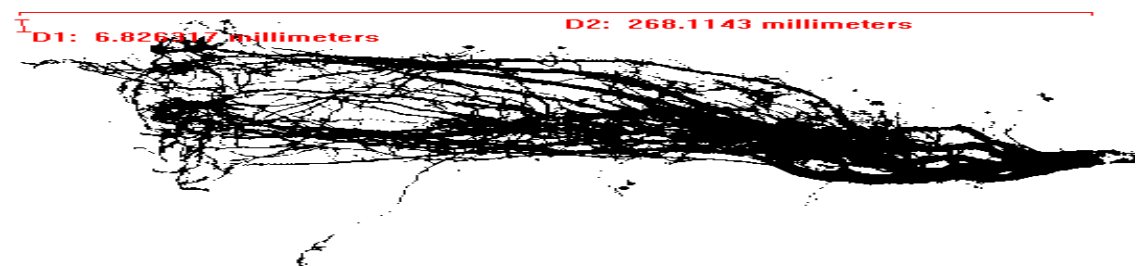


Figura 3. Imagen binaria de largo y cuello de raíz en *Acacia farnesiana*, para el T10-R5. (Testigo)

4.5 Análisis da área radicular.

En las siguientes imágenes podemos observar los incrementos del área de la raíz en milímetros cuadrados, en los tratamientos el que más se desató fue el T3 (ácidos húmicos al 1% y 10^{10} *Azospirillum sp*) con un área radicular de 12,108.50 mm² comparándolo con el testigo al cual no se le aplicó dosis de biofertilizante y *Azospirillum sp*. Que tuvo un área radicular de 7,514.48589 mm², el cual es una diferencia muy significativa numéricamente es de 4,594.01321 con un porcentaje de 37.94%.



Figura 4. Imagen binaria de del área radicular del T3-R1.

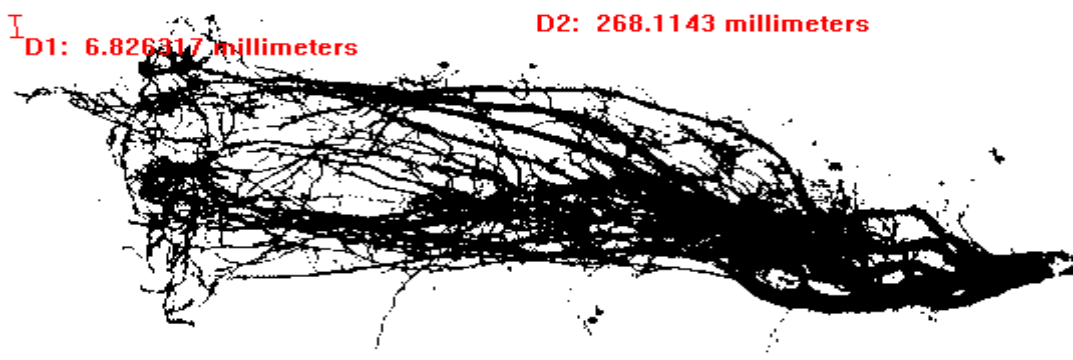


Figura 5. Imagen binaria del área radicular de testigo-R5

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos del análisis de varianza no presento grado de significancia en cuanto al diámetro y altura. Lo cual nos indica que las diferentes concentraciones de Ácidos Húmicos y *Azospirillum sp* son totalmente iguales y que no en desarrollo de las plantas. La causa de esto puede ser que el suelo en donde se desarrollaba la planta tenía todos los nutrientes disponibles y un porcentaje muy alto de nitrógeno.

El mayor incremento en diámetro de planta lo obtuvo la concentración 2% de ácidos húmicos y 10^{10} de *Azospirillum sp*, mientras que longitud de raíz lo causaron los Ácidos Húmicos al 1% y 10^{10} ufc mil⁻¹ de *Azospirillum sp*.

La mayor altura se obtuvo con Ácidos Húmicos al 2% y *Azospirillum sp* de 10^8 ufc mil⁻¹.

La concentración de Ácidos Húmicos al 2% y *Azospirillum sp* de 10^9 ufc mil⁻¹ influyeron en el mayor crecimiento del diámetro radicular.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se debe de hacer el experimento con las mismas concentraciones y dosis de ácidos húmicos y *Azospirillum sp* con la diferencia de que el suelo a utilizar sea de las condiciones en donde se desarrolla el huizache.

- Que estén en condiciones de estrés hídrico y nutritivo.

Se deben de incluir nuevas variables a medir como peso seco y peso fresco, del área foliar y raíz. Porque en el estudio se presento un incremento visual y vigorosidad de la planta, como también en la raíz.

LITERATURA CITADA

- Adani, F., Genevini, P., Zaccheo, P., zocchi, G.** 1998. The effect of comercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* 21(3):561-575.
- Aiken, G. R., Mcknight, D. M., Wershaw, R. L., Maccarthy, P.** 1985. An introduction to humic substances in soill, sediment, and water.pp. 1-9. *In* Humic substances in soil, sediment, and water: Geochemistry, isolation and characterization. G. R. Aiken et al. (ed.). Wiley-Interscience, New York
- Akinremi, O. O., Janzen, H. H., Lemke, R. L., Larney, F. J.** 2000. Response of canola, wheat and green beans to leonardite additions. *Can. J. Soil Sci.* 80:437-443.
- Albuzio, A., Ferrari, G., Nardi, S.** 1986. Effects of humic substances on nitrate uptake and asimilación in bar ley peelings. *Can. J. Soil Sci.*, 66: 731-736
- Aso, S., Kasai, I.** 1963. Studies on the physiological effects of humic acid. 1. Uptake of humic acid by crop plants and its physiological effects. *Soil Sci. Plant Nutr.* (Tokyo). 9:85-91.
- Baldani, V. L. D., J. I. Baldani, and J. Döbereiner.** 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29:924-929.
- Bashan, Y.** 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29:246-258. **Bashan, Y., H. Levanony, and R. E. Whitmoyer.** 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd.*J. Gen. Microbiol.* 137:187-196.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R. E. Whitmoyer, and H. Levanony.** 1991. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil* 132:73-83.
- Barrientos R., L. y F. Lopez D.** 1993. Características y potencial del huizache (*Acacia farneciana* (L.) Willd).como fuente de forraje y taninos en el estado de Jalisco, En: memoria del 1 congreso Mexicano sobre recursos forestales. Saltillo, Coahuila, México. P. 2.
- Ben Dekhil, S., M. Cahil, E. Stackebrandt, and L. I. Sly.** 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:72-77.

- Benedetti, A., Alianello, F., Canali, S., Rossi, G., Mdell'abate.** 1994. Effects of fertilization with humic acids on soils and plants metabolism: a multidisciplinary approach. Note II: Nitrogen dynamics and microbial turnover. pp 233-238. *In* Humic substances in the global environment and implications on human health. Senesi, N., Miano, T. M. (Eds.) Elsevier, Amsterdam.
- Benedetti, A., Figliolia, A., Izza, C., Indiati, R., Canali, S.** 1990. Nuove prospettive di concimazione minerale: interazione NPK acidi umici. VIII Convegno SICA. Bari.
- Berguey's Manual.** 1984. Bacteriologia Sistemica. Ed. I, Vol. I, Seccion 2.
- Boddey, R. M., V. L. D. Baldani, J. I. Baldani, and J. Döbereiner.** 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by fieldgrown wheat. *Plant Soil* **95**:109-121.
- Burdman, S., Y. Okon, and E. Jurkevitch.** 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**:91-110.
- Burdman, S., E. Jurkevitch, M. E. Soria-Díaz, A. M. Gil Serrano, and Y. Okon.** 2000. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**:259-264.
- 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.
- Cacco, G., Ddell'Agnola, G.** 1984. Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Canadian J. of Sol Sci.* **64**:225-228.
- Calace, N., Furlani, G., Petronio, B. M., Pietroletti, M.** 2000. Sedimentary humic and fulvic acids: Structure, molecular weight distribution and complexing capacity. *Annali di Chimica*, **90**:25-34.
- Chen, Y., Aviad, T.** 1990. Effects of humic substances on plant growth. pp. 161-186. *In* Humic substances in Soil and Crop Sciences: Selected readings. P. MacCarthy, C. E. Clapp, R. L. Malcolm, P. R. Bloom (Eds.). Proceedings of a symposium by the IHSS, Chicago, Illinois, December 1985.
- Cohen, E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur, and Y. Henis.** 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.* **66**:746-749.
- Cooper, R. J., Chunhua, L., Fisher, D. S.** 1998. Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. *Crop Sci.* **38**:1639-1644.

- 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.
- Correll, D.S. And M.C. Johnston.** 1970. Manual of the Vascular Plants of Texas. Texas Research Foundation 881 pp.
- De Paolis, F., Kukkonen, J.** 1997. Binding of pollutants to humic and fulvic acids: Influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere*, Vol. 34, No. 8, pp. 1693-1704.
- De Saussure, T.** 1804. *Recherches Chimiques sur la Végétation.* Paris.
- De Troch, P., and J. Vanderleyden.** 1996. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microb. Ecol.* **32**:149-169.
- Doormar, J. F.** 1975. Effects of humic substances from Chernozemic Ah horizons on nutrient uptake by *phaseolus vulgaris* and *festuca scabrella*. *Can. J. Soil Sci.* **55**:111-118.
- Dobereiner, G. L., Mackenzie, A. F.** 1983. Effects of leonardite applications on phosphorus availability and corn growth. *Can. J. Soil Sci.* **63**:749-751.
- Falk, E. C., J. L. Johnson, V. L. D. Baldani, J. Döbereiner, and N. R. Krieg.** 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:80-85.
- Fernández, V. H.** 1968. The actino of humic acids of different sources on the development of plants and their effect on increasing concentration of the nutrient solution. *Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia.* **32**:805-850.
- Ferreti, M., GHISI, R., NARDI, S. PASSERA, C.** 1991. Effect of humic substances on photosynthetic sulphate asimilación in maize peelings. *Can. J. Sol Sci.* **71**:239-242.
- Fründ, R., K. Guggenberg, K. Haider, H. Knicker, I. Kögel-Knaber and H.-D. Lüdeman.** 1994. Recent advances in the spectroscopic characterization of soil humic substances and their ecological relevance. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **157**: 175-186.
- Führ, F., Sauerbeck, D.** 1967. The uptake of colloidal organic substances by plant roots as shown by experiments with ¹⁴C-labelled humus compounds. pp. 73-82. *In Report FAO/IAEA Meeting.* Vienna. Pergamon Press. Oxford.
- Gafny, R., Y. Okon, Y. Kapulnik, and M. Fischer.** 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* **18**:69-75.
- Galston, A. W., Sawhney, R. K.** 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**:406-410.

- García, C.** 1990. Estudio del compostaje de residuos orgánicos. Valoración agrícola. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Murcia.
- García B., H.** 1974. Flora medicinal de Colombia. Instituto de Ciencia Natural. Universidad Nacional Bogotá. Colombia. D.E. Colombia. 561 pp.
- Gaur, A. C.** 1964. Influence of humic acid on growth and mineral nutrition in plants. Bull. Assoc. Fr. Etude Soil. 35:207-219.
- Goor, Y.A. and W.C. Barney.** 1968. Forest tree planting In Arid Zones. The Ronald Press Company. New York. P. 278-281.
- Guminski, S., Sulej, J., Glabiszewski, J.** 1983. Influence of sodium humate on the uptake of some ions by tomato peelings. Acta soc. Bot. Pol. 52:149-164.
- Hartmann, A., M. Stoffels, B. Eckert, G. Kirchhof, and M. Schloter.** 2000. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes, p. 727-. *En* E. W. Triplett (ed.), Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- 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., M. Feldman, Y. Okon, and Y. Henis.** 1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. Soil Biol. Biochem. 17:509-515.
- Kapulnik, Y., J. Kigel, Y. Okon, I. Nur, and Y. Henis.** 1981. Effect of *Azospirillum* inoculum on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. Plant Soil 61:65-67.
- Kapulnik, Y., Y. Okon, and Y. Henis.** 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31:881-887.
- Khammas, K. M., E. Ageron, P. A. D. Grimont, and P. Kaiser.** 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140:679-693.
- Kucey, R. M. N.** 1988. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. Can. J. Microbiol. 34:735-739.
- Lesur L.** 2006. Manual de cultivo de chile: una guía paso a paso. - - México: Trillas, 2006.
- Levanony, H., and Y. Bashan.** 1988. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Bot. 67:2213-2216.

- Levanony, H., and Y. Bashan.** 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant Soil* **137**:91-97.
- Loffredo, E., Senesi, N., D’Orazio, V.** 1997. Effects of humic acids and herbicides, and their combinations on the growth of tomato peelings in hydroponics. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **160**:455-461.
- López, C. R.** 2002. Comportamiento de sustancias húmicas de diverso origen en la física de un suelo limo-arcilloso y en la fisiología del tomate. Tesis Doctoral en Sistemas de Producción. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- López, C. R., A. Gallegos del T., E. Peña C., A. Reyes L., R. Castro F. Y J. F. J. Chávez G.** 2006. Sustancias húmicas de origen diverso en algunas propiedades físicas de un suelo franco-arcillo-limoso. *TERRA Latinoamericana*. Julio-Septiembre. Volumen 24, N° 3. Páginas. 303-310.
- Lubal, P., Siroký, D., Fetsch, D., Havel, J.** 1998. The acidobasic and complexation properties of humic acids study of complexation of Czech humic acids with metal ions. *Talanta*. **47**:401-412.
- Maccarthy, P., Clapp, C. E., Malcolm, R. L., Bloom, P. R.** 1990. An introduction to soil humic substances. pp. 161-186 *In* Humic substances in Soil and Crop Sciences: Selected readings. P. MacCarthy, C. E. Clapp, R. L. Malcolm, P. R. Bloom (Eds). Proceedings of a symposium by the IHSS, Chicago, Illinois, December 1985s.
- Magalhães, F. M., J. I. Baldani, S. M. Souto, J. R. Kuykendall, and J. Döbereiner.** 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brasil. Cienc.* **55**:417-430..
- Malcolm, R. E., Vaughan, D.** 1979. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues. *Soil Biol. Biochem.* **11**:65-72.
- Michiels, K. W., C. L. Croes, and J. Vanderleyden.** 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2241-2246.
- Millet, E., and M. Feldman.** 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant Soil* **80**:255-259.
- 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.
- Murthy, M. G., and J. K. Ladha.** 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* **108**:281-285.

- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M. R., Muscolo, A.** 1994. Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biol. Biochem.* 26:1341-1346.
- Nayak, D. N., J. K. Ladha, and I. Watanabe.** 1986. The fate of marker *Azospirillum lipoferum* inoculated into rice and its effect on growth, yield and N₂ fixation of plants studied by acetylene reduction, ¹⁵N₂ feeding and ¹⁵N dilution techniques. *Biol. Fertil. Soils* 2:7-14.
- Niembro R., A.** 1986. Árboles y arbustos Útiles de México: Naturales e Introducidos. Editorial limusa. México. 206pp
- O'Hara, G. W., M. R. Davey, and J. A. Lucas.** 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 27:871-877.
- Ockon, R. G. B., and A. Drozdowicz.** 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. *Rev. Microbiol. (Sao Paulo)* 12:42-47.
- Olmos, S., Esteban, E., Lucena, J. J.** 1998. Micronutrient extraction in calcareous soils treated with humic substances. *J. Plant Nutrition*, 21 (4): 687-697.
- Orlov, D. S.** 1995. Humic substances of the soil and general theory of humification. A. A. Balkema, Publishers, Old Post, Road, Brookfield, VT, USA.
- Pacovsky, R. S., E. A. Paul and G. J. Bethlenfalvay.** 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 85:145-148.
- Paredes-Cardona, E., M. G. Carcaño-Montiel, M. A. Mascarúa- Esparza, and J. Caballero-Mellado.** 1988. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30:351-355.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G.** 1992a. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biol. Biochem.* 24, 373-380.
- Pettit.** 2004. Organic matter, Humate, Humic acid, Fulvic acid and Humin: Their Importance in Soil Fertility and Plant Health. Huma Tech. Inc. Makers of Promax. <http://www.humate.info/>
- Prat, S.** 1963. Permeability of plant tissues to humic acids. *Biol. Plant.* 5:279-283.
- Prat, S., Pospisil, F.** 1959. Humic acids with ¹⁴C. *Biol. Plant.* 1:71-80.
- Ramos, R.** 2000. Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulante. Efectos frente al estrés salino. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.

- Rauthan, B. S., Schnitzer, M.** 1981. Effects of a soil fulvic acid on the grown and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Plant and Sol.* 63:491-495.
- Rebhun, M., De Smedt, F., Rwetabula, J.** 1996. *Wat. Res.* 30. 2027.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, and J. De Ley.** 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.
- Rennie, R. J.** 1980. 15N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Can. J. Bot.* 58:21-24.
- Rennie, R. J., and J. B. Thomas.** 1987. 15N-determined effect on inoculation with N₂ fixing bacteria on nitrogen asimilación in Western Canadian wheats. *Plant Soil* 100:213-223.
- Retta, S. F., Sidari, M., Nardi, S., Cacco, G.** 1994. Effect of the low molecular size (LMS) humic fraction on differentiation processes in leaf explants. pp. 349-354. *In* Humic substances in the global environment and implications on human health. Senesi, N., Miano, T. M. (Eds.) Elsevier, Amsterdam.
- Reynders, L., and K. Vlassak.** 1979. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Bichem.* 11:547-548.
- Rzedowsky, J.** 1978. *Vegetación de México.* Editorial Limusa. México.
- Sánchez-Andreu, J. J.; Juárez, M.; Sánchez, A.** 2000. Incidencia de Sustancias Húmicas y aminoácidos en la calidad del fruto del limón cv Fino. VIII Simposium Nacional, IV Ibérico sobre Nutrición Mineral de las plantas.
- Sánchez-Andreu, J., Jordá, J., Juárez, M.** 1994. Humic substances. Incidence on crop fertility. *Acta Horticulturae.* 357:303-313.
- Sánchez-Conde, M. P., Ortega, C. B., Pérez Brull, M. I.** 1972. Effect of humic acid on sugar beet in hydroponic culture. *Anales de edafología y Agrobiología.* 31:319-331.
- Schank, S. C., K. L. Weier, and I. C. MacRae.** 1981. Plant yield and nitrogen content of a digitgrass in response to *Azospirillum* inoculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:342-345.
- Shepherd, M.** 2001. Life Time Perspective on the Chemistry of Sol Organic Matter. D. L. Sparks (Ed.). *Advances in Agronomy, Academic Press.* 68: 3-58.

- Senesi, N., Miano, T. M., Provenzano, M. R., Brunetti, G.** 1989. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci. Total Environ.* 81/82:143-156.
- Sladky, Z.** 1959. The effect of extracted humus substances on growth to tomato plants. *Biol. Plant.* 1:199-204.
- Smith, R. L., S. C. Schank, J. R. Milam, and A. A. Baltensperger.** 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1331-1336.
- Sly, L., Tanev, Z., Ivanov, K.** 1999. Humus substances as suppressors of biuret phytotoxicity. pp. 373-381. *In Humus et Planta.*
- Steenhoudt, O., and J. Vanderleyden.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.
- Stevenson, F. J.** 1994. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions. J. Wiley and Sons, New York, NY.
- Tan, K. H., Nopamornbodi, V.** 1979. Effect of different levels of humic acids on nutrient content and growth of corn (*Zea may L.*). *Plant and Soil.* 51:283-287.
- 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.
- Thorn, K., Folan, D., Maccarthy, P.** 1989. Characterization of the IHSS standard and reference fulvic and humic acids by solution state carbon-13 and hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectrometry. Water Resources Investigations Rep. 89-4196. US Geological Survey, Denver, Co.
- 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.
- 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.
- 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.
- Varanini, Z., Pinton, R.** 1995. Humic substances and plant nutrition. *mProg. Bot.* 56:97-117.

- Varshovi, A. A.** 1996. Humates and their turfgrass applications. *Golf Course Management* 64(8):53-56.
- Vaughan, D., Malcolm, R. E.** 1979b. Effect of humic acid on invertase synthesis in roots of higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 11:247-272.
- Visser, S. A.** 1985. Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biol. Biochem.* 17:457-462.
- Vivas, M. J.** 2001. Mejora del desarrollo y la producción vegetal por bioestimuladores. Sustancias húmicas comerciales y alcoholes. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
- Yates III, L. M., Von Wandruszka, R.** 1999. Effects of pH and metals on the surface tension of aqueous humic materials. *Soil Science of America Journal.* Vol. 63, No. 6, 1999
- Young, C. C., Chen, L. F.** 1997. Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce peelings. *Plant and Soil.* 198:143-149.

APENDICE.

Apéndice 1. Base de datos de las medias de incrementos de altura y diámetro en *Acacia farnesiana*, en el invernadero forestal de la UAAAN.

F	T	R	DN	Altura
1	1	1	1.23	3.3
1	1	2	1.44	6.44
1	1	3	1.6	3.55
1	1	4	1.21	6.52
1	1	5	1.03	3.79
1	2	1	1.48	4.81
1	2	2	1.32	2.53
1	2	3	1.54	3.7
1	2	4	2.17	1.85
1	2	5	1.2	2.53
1	3	1	1.45	5.62
1	3	2	1.78	3.12
1	3	3	1.93	3.38
1	3	4	1.15	1.94
1	3	5	1.77	4.9
2	4	1	1.33	9.13
2	4	2	1.49	1.72
2	4	3	1.62	7.64
2	4	4	1.73	6.23
2	4	5	1.31	3.77
2	5	1	1.25	3.08
2	5	2	1.43	4.76
2	5	3	1.28	5.68
2	5	4	1.29	1.21
2	5	5	2.23	5.66
2	6	1	1.83	4.85
2	6	2	2.24	7.41
2	6	3	1.52	4.15
2	6	4	1.74	5.26
2	6	5	1.4	3.1
3	7	1	1.46	3.8
3	7	2	1.48	1.81
3	7	3	1.31	2.28
3	7	4	1.65	4.53
3	7	5	2.1	4.15
3	8	1	1.38	5.27
3	8	2	1.5	3.66
3	8	3	1.55	7.28
3	8	4	1.27	4.84

3	8	5	1.82	5.02
3	9	1	1.34	1.7
3	9	2	1.5	5.43
3	9	3	1.37	4.07
3	9	4	1.19	2.4
3	9	5	1.47	10.47
4	10	1	1.59	3.56
4	10	2	1.21	4.38
4	10	3	1.43	3.57
4	10	4	1.76	3.93
4	10	5	1.19	3.68

F= fertilizante a diferentes concentraciones al 1%, 2% y 3%;
T= tratamiento 10^8 , 10^9 y 10^{10} de la bacteria *Azospirillum sp*;
R= repetición DN= media del diámetro de la planta por tratamiento;
Altura= media de la altura por tratamiento

Apéndice 2. Medias de incrementos de diámetro y altura para cada uno de sus tratamientos, con respecto a la biofertilización y *Azospirillum sp*. Aplicadas bajo invernadero forestal de la UAAAN.

INCREMENTOS DE DN Y HT		
T	\bar{Y} DN	\bar{Y} HT
T1	1.302	4.720
T2	1.542	3.084
T3	1.616	3.792
T4	1.496	5.698
T5	1.496	4.078
T6	1.746	4.954
T7	1.600	3.314
T8	1.504	5.214
T9	1.374	4.814
T10	1.436	3.824

T= tratamiento; \bar{Y} DN; media del diámetro;

\bar{Y} HT= media de la altura

Apéndice 3. Plantas seleccionadas para el análisis del sistema radicular en *Acacia farnesiana*, en el invernadero forestal de la UAAAN.

T	R	BL	PLANT
T1	R3	13	8
T2	R1	20	7
T3	R1	46	3
T4	R3	10	6
T5	R2	11	3
T6	R4	1	3
T7	R1	35	5
T8	R5	2	3
T9	R3	34	7
TESTIGO	R5	25	6

Apéndice 4. Análisis de varianza para diámetro, con el programa SAS (Statistical Analysis System).

The SAS System 23:13 Wednesday, June 5, 2011 5

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: DN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.71852800	0.07983644	0.98	0.4676
Error	40	3.24400000	0.08110000		
Corrected Total	49	3.96252800			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DN Mean
0.181331	18.84467	0.284781	1.511200

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	9	0.71852800	0.07983644	0.98	0.4676

Apéndice 5. Comparación de media para diámetro con el método de Tukey.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	0.0811
Critical Value of Studentized Range	4.73453
Minimum Significant Difference	0.603

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	1.7460	5	6
A			
A	1.6160	5	3
A			
A	1.6000	5	7
A			
A	1.5420	5	2
A			
A	1.5040	5	8
A			
A	1.4960	5	5
A			
A	1.4960	5	4
A			
A	1.4360	5	10
A			
A	1.3740	5	9
A			
A	1.3020	5	1

Apéndice 6. Análisis de varianza para altura, con el programa SAS (Statistical Analysis System).

The SAS System 23:13 Wednesday, June 5, 2011 6

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Altura

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	33.0934080	3.6770453	1.00	0.4526
Error	40	146.4465600	3.6611640		
Corrected Total	49	179.5399680			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Altura Mean
0.184323	43.99468	1.913417	4.349200

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	9	33.09340800	3.67704533	1.00	0.4526

Apéndice 7. Comparación de media para altura con el método de Tukey.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	3.661164
Critical Value of Studentized Range	4.73453
Minimum Significant Difference	4.0514

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	T
A	5.698	5	4
A			
A	5.214	5	8
A			
A	4.954	5	6
A			
A	4.814	5	9
A			
A	4.720	5	1
A			
A	4.078	5	5
A			
A	3.824	5	10
A			
A	3.792	5	3
A			
A	3.314	5	7
A			
A	3.084	5	2

