

25  
2 E.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INOCULACION DE  
ALGUNAS CEPAS DE Azospirillum spp. EN EL MAIZ EN  
CULTIVO DE TEMPORAL EN PALMAR CHICO,  
ESTADO DE MEXICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N:  
MARTHA ALEJANDRA TAFOLLA FERNANDEZ  
SAUL RAMOS VERA



1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"ZARAGOZA"

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INOCULACION DE  
ALGUNAS CEPAS DE Azospirillum spp. EN EL MAIZ EN  
CULTIVO DE TEMPORAL EN PALMAR CHICO,  
ESTADO DE MEXICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N:  
MARTHA ALEJANDRA TAFOLLA FERNANDEZ  
SAUL RAMOS VERA



1987



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INOCULACION DE  
ALGUNAS CEPAS DE Azoospirillum spp. EN EL MAIZ EN  
CULTIVO DE TEMPORAL EN PALMAR CHICO,  
ESTADO DE MEXICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N:  
MARTHA ALEJANDRA TAFOLLA FERNANDEZ  
SAUL RAMOS VERA



1987

A MIS PADRES: ESTHER Y RAFAEL  
POR SU APOYO CARINO Y SOLIDARIDAD

A MIS HERMANOS:

LIGIA

OLGA ESTHER

BLANCA ROCIO

LILI CONCEPCION

RAFAEL

GUSTAVO DAVID

A LA NENITA:

BLANCA ROCIO

A TODOS ELLOS POR SU GRAN APOYO  
POR SUS ALEGRIAS Y TRISTEZAS -  
POR SU COMPRESION.....¡GRACIAS!

A MI ABUELITA:

MAMA LUPITA

A MI TIO:

SIMON

GRACIAS, POR SUS MARAVILLOSOS  
CONSEJOS, POR SU AMOR A LA --  
VIDA Y AL TRABAJO.

A MI PAREJA:

SAUL

POR TODA SU AYUDA.

A MIS PADRES: JOVITA E ISRAEL

CON GRATITUD.

A MIS HERMANOS: JULIETA, ROSSINA E ISRAEL

CON CARINO.

A MIS ABUELOS: BLANDINA Y ODILON

A MIS TIOS Y TIAS

A MIS PRIMOS.

A TODOS ELLOS, ESPERANDO QUE UNA PALABRA  
REUNA TODO LO QUE SIGNIFICAN PARA MI Y  
LOS QUE LES DEBO EN TODO LO QUE HE LOGRADO:  
GRACIAS.

QUE SEA ESTO UNA PROMESA  
Y ESPERANZA DE PERMANEN-  
CIA DE NUESTRA SIMBIOSIS  
GRACIAS ALE.

S A U L .

A MIS PADRES: ESTHER Y RAFAEL  
POR SU APOYO CARINO Y SOLIDARIDAD

A MIS HERMANOS:

LIGIA

OLGA ESTHER

BLANCA ROCIO

LILI CONCEPCION

RAFAEL

GUSTAVO DAVID

A LA NENITA:

BLANCA ROCIO

A TODOS ELLOS POR SU GRAN APOYO  
POR SUS ALEGRIAS Y TRISTEZAS -  
POR SU COMPRESION.....¡GRACIAS!

A MI ABUELITA:

MAMA LUPITA

A MI TIO:

SIMON

GRACIAS, POR SUS MARAVILLOSOS  
CONSEJOS, POR SU AMOR A LA --  
VIDA Y AL TRABAJO.

A MI PAREJA:

SAUL

POR TODA SU AYUDA.

A MIS PADRES: JOVITA E ISRAEL

CON GRATITUD.

A MIS HERMANOS: JULIETA, ROSSINA E ISRAEL  
CON CARINO.

A MIS ABUELOS: BLANDINA Y ODILON

A MIS TIOS Y TIAS

A MIS PRIMOS.

A TODOS ELLOS, ESPERANDO QUE UNA PALABRA  
REUNA TODO LO QUE SIGNIFICAN PARA MI Y  
LOS QUE LES DEBO EN TODO LO QUE HE LOGRADO:

GRACIAS.

QUE SEA ESTO UNA PROMESA  
Y ESPERANZA DE PERMANEN-  
CIA DE NUESTRA SIMBIOSIS  
GRACIAS ALE.

S A U L .

A LA E.N.E.P.- ZARAGOZA CON LA PROMESA  
DE SENTIRNOS SIEMPRE ORGULLOSOS DE SER

¡ Z A R A G O Z A N O S !

AGRADECEMOS A:

Q.F.B. GERMAN RAMIREZ MEDINA.

QUIEN MAS QUE ASESOR DE ESTE TRABAJO HA SIDO  
UN MAESTRO AL QUE LE DEBEMOS NO SOLO CONOCI-  
MIENTOS ACADEMICOS SINO CONSEJOS Y APOYO --  
VERDADERO.

M. EN C. ROSA MARIA RAMIREZ GAMA.

POR PERMITIRNOS EL ACCESO A UNA DE LAS RAMAS  
MAS FASCINANTES DE LA MICROBIOLOGIA.

ING. AGRNOMO DIONISIO

POR SU APOYO TOTAL EN LA REALIZACION DE ESTE  
TRABAJO.

QUIMICO.

POR SU ENORME COLABORACION PARA EL DESEMPEÑO  
DE ESTE TRABAJO.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA  
U.N.A.M. Y COMPAÑEROS, POR SU VALIOSA AYUDA.

DR. JESUS CABALLERO M.

POR COMPARTIR SUS EXPERIENCIAS CON NOSOTROS.

BIOL. RAMIRO RIOS

POR SU VALIOSA AYUDA Y AMISTAD.

BIOL. CARLOS R. GUTIERREZ GARCIA

POR AYUDARNOS Y ASOLEARSE DEMASIADO.

M. EN C. DORA PATRICIA ANDRADE S.

POR SU APOYO.

PROFRA. PATY MUÑOZ BARRERA

POR SU AYUDA DESINTERESADA Y SOBRETUDO

POR SU AMISTAD.

BIOL. SALVADOR MORELOS OCHOA

POR SUS CONSEJOS Y AMISTAD.

BIOL. RAFAEL ROBLES DE B.

POR SU APOYO, CONSEJOS Y AMISTAD.

A LOS AMIGOS, QUE A PESAR DE TODO  
NUNCA OLVIDARON A LA "PAREJA IDEAL"  
Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE SIN  
SU AYUDA NO HUBIESE SIDO POSIBLE -  
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

¡ G R A C I A S !

ALEJANDRA        Y        SAUL

# INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	3
III. MARCO TEORICO	
1. NITROGENO	
A. Características e importancia biológica.....	9
B. Ciclo del Nitrógeno.....	11
C. Ciclo de asimilación del Nitrógeno en la Planta .....	14
2. LA FIJACION DEL NITROGENO	
A. Mecanismo de la fijación biológica del Nitrógeno.....	18
3. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS NITROFIJA- DORES EXISTENTES.....	21
4. <u>Azospirillum</u> .....	26
A. Historia.....	26
B. Clasificación taxonómica .....	30
C. Distribución ecológica de <u>Azospirillum</u> .....	32
D. Características de interés agrícola de la bacteria.....	34
E. La rizocenosia asociativa.....	37
5. EL MAIZ	
A. Taxonomía y Descripción.....	40
B. Importancia económica y social del maíz.....	44
6. LOCALIZACION DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	49
III. ANTECEDENTES.....	53
IV. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	58

V. HIPOTESIS.....	60
VI. OBJETIVOS.....	61
VII. METODOLOGIA.	
1. TRABAJO EXPERIMENTAL.....	62
A. Mantenimiento, activación y elaboración del inóculo.....	64
B. Trabajo de Campo.....	69
2. TRABAJO DE GABINETE.....	74
VIII. RESULTADOS Y DISCUSION	
1. PORCENTAJE DE INFECCION.....	75
2. PARAMETROS AGRONOMICOS. MUESTREOS PARCIALES	
A. Determinaciones en la raíz.....	80
B. Número de Hojas.....	82
C. Area foliar.....	82
D. Peso seco del follaje.....	86
E. Diámetro de la corona.....	86
F. Altura.....	91
3. PARAMETROS AGRONOMICOS. MUESTREO TOTAL	
A. Area foliar y peso seco.....	97
B. Altura y Nitrógeno foliar.....	103
IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	110
X. BIBLIOGRAFIA.....	111
APENDICE No. 1 .....	123

INDICE DE TABLAS, DIAGRAMAS, ESQUEMAS, MAPAS Y GRAFICAS

TABLAS

TITULO	NUMERO	PAGINA
PRODUCCION DE LOS PRINCIPALES		
PRODUCTOS AGRICOLAS.....	1	45,46,47,48
CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES		
DE <u>Azospirillum</u> .....	2	28 y 29
CARACTERISTICAS DE LAS LOCALIDADES		
DE ORIGEN DE LAS CEPAS EMPLEADAS.....	3	67 y 68
CARACTERISTICAS AGRONOMICAS DEL		
EXPERIMENTO EN CAMPO.....	4	70
PORCENTAJE DE INFECCION.....	5	76
PESO SECO DEL FOLLAJE.....	6	98
AREA FOLIAR (A. DE VARIANZA).....	7	100
ALTURA (A. DE VARIANZA).....	8	104
NITROGENO FOLIAR.....	9	106

DIAGRAMAS

DISTRIBUCION DEL NITROGENO EN LA BIOSFERA....	1	12
EL CICLO DEL NITROGENO.....	2	13
ASIMILACION DEL NITROGENO Y SU RELACION		
CON EL METABOLISMO CELULAR.....	3	16
PLAN DE TRABAJO.....	4	63
UBICACION DE LAS CEPAS EN EL EXPERIMENTO.....	5	77

ESQUEMAS

MECANISMO DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL		
NITROGENO.....	1	20
PERIODOS DEL CRECIMIENTO DEL MAIZ.....	2	43

## MAPAS

TITULO	NUMERO	PAGINA
LOCALIZACION DE LA ZONA DE ESTUDIO	1	51
LOCALIZACION DEL ORIGEN DE LAS CEPAS ENSAYADAS	2	65
LOCALIZACION DEL SITIO DE MUESTREO	3	71

## GRAFICAS

PESO SECO DE LA RAIZ. PRIMER MUESTREO	1	81
NUMERO DE HOJAS. PRIMER MUESTREO	2	83
"                    SEGUNDO MUESTREO	3	84
AREA FOLIAR. PRIMER MUESTREO	4	85
"                    SEGUNDO MUESTREO	5	87
PESO SECO DEL FOLLAJE. PRIMER MUESTREO	6	88
DIAMETRO DE LA CORONA. PRIMER MUESTREO	7	89
"                    SEGUNDO MUESTREO	8	90
ALTURA. PRIMER MUESTREO	9	92
"                    SEGUNDO MUESTREO	10	93
PESO SECO DEL FOLLAJE. ANALISIS DE DUNCAN	11	99
AREA FOLIAR. ANALISIS DE DUNCAN.	12	101
ALTURA. ORDENACION DE MEDIAS.	13	105
NITROGENO FOLIAR. ORDENACION DE MEDIAS	14	107

CON RESPECTO A Azospirillum  
PODEMOS LLEGAR A UNA SOLA CONCLUSION  
EL BICHO ..... FUNCIONA.  
CABALLERO, M.J.,1987.

## I. RESUMEN.

Entre las alternativas potenciales y aún controvertidas de biofertilización destaca la rizocenosis asociativa diazotrófica Azospirillum-gramíneas. Se estudiaron 46 cepas aisladas de diversos ambientes del estado de México, evaluando su efecto sobre el desarrollo del maíz, así como su grado de infectividad y competitividad. Esto se realizó en Palmar Chico, Mpio. de Amatepec, Edo. de México, en un suelo de tipo regosol eútrico y clima Aw (Koppen). Se empleo 1/2 Ha con un modelo de Lattice simple 7X7 con dos repeticiones. Los tratamientos correspondieron a: 3 testigos; absoluto (A), positivo (P) con 120:60:30 y de referencia (R) con 30:60:30 y 46 inoculados (y 30:60:30). Se utilizó una densidad de --- 50 000 plantas/Ha, maíz maracay (CYMMYT) y el sistema de cultivo común en la región. Se realizaron muestreos en la etapa vegetativa y en la floración y se determinaron parámetros morfo y fisiométricos y contenido de nitrógeno foliar (Microkjedhal).

El efecto de las cepas sobre el área foliar, altura, diámetro de la corona, peso seco de raíz y follaje fué variable y más notorio en la floración, resultando valores de 3 inoculados sin diferencia significativa con P, 33 distribuidos entre P y R y 10 similares a A. El contenido de nitrógeno foliar resultó significativamente mayor a R pero menor a P en la mayoría de los tratamientos. La infectividad en 15 tratamientos y los testigos fué de 55 a 100% observándose competencia entre cepas inoculadas y nativas.

2.

Azospirillum puede actuar de forma integral cuando se asocia al maíz (nitro fijación y producción de sustancias reguladoras del crecimiento). La infección se mantiene si se logra el establecimiento al inicio del cultivo. La procedencia de la cepa no estuvo relacionada con su infectividad. En la -- fertilización deben emplearse cepas seleccionadas y como coadyuvantes de la fertilización química.

## II. INTRODUCCION

Actualmente, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la humanidad es la producción de alimentos, por ello la explotación agrícola es de suma importancia como parte de su economía pues las actividades rurales proporcionan alimentos para los habitantes locales así como numerosos productos de exportación . En naciones poco industrializadas, el desarrollo agrícola es de interés fundamental, ya que dependen principalmente de las labores del campo (8). En México, la agricultura aporta la mayor parte del Producto Interno Bruto del ramo agropecuario, silvícola y pesquero y además cerca del 22% de la población económicamente activa se ocupa en esta actividad, por lo que es evidente su importancia tanto desde el punto de vista económico como social (18,44).

A pesar de que nuestro país tiene una de las floras más ricas del mundo, debido a la variedad de condiciones ambientales que presenta, solo algunos productos agrícolas son la base de esta actividad económica, de la alimentación y además sirven de forma sustancial a la exportación que genera divisas (80,90).

La República Mexicana cuenta con una superficie potencialmente agrícola de 30 millones de Ha, de las cuales para 1986 se utilizaron 20.8 millones (17)', sin embargo, el país se ha visto obligado a importar en el último decenio volúmenes cada vez mayores de alimentos, principalmente granos y leche (90).

México ha perdido su capacidad para autoalimentarse y -- por lo menos durante los próximos 10 años seguirá siendo un -- lucrativo mercado para los agricultores estadounidenses ( 1,- 90). Entre los productos en que se ha perdido la autosufi--- ciencia se encuentra el maíz, consumido por la mayor parte de la población de la República Mexicana y que ocupa el primer -- lugar en importancia y profusión entre las plantas cultivadas (18,44,80).

El cultivo del maíz producido en México no alcanza a cubrir los requerimientos de la población, por lo que es uno de los más comercializados con otros países (1). La mayor parte de los productores nacionales de este grano lo cultivan en -- condiciones de temporal, para subsistencia y en ocasiones no alcanzan a cubrir sus necesidades de autoconsumo, debido a -- los bajos rendimientos, ya que los insumos necesarios para la aplicación de tecnología agrícola moderna no están a su alcan-- ce por su alto costo. Por lo tanto, aquellos estudios que -- incluyan estrategias tendientes a incrementar la producción -- maicera y de gramíneas en general, en las condiciones actua-- les del campo mexicano son necesarias como herramientas para contribuir a disminuir nuestra dependencia alimentaria y au-- mentar la disponibilidad de éstos granos básicos.

Uno de los principales insumos necesarios para aumentar la producción de un cultivo es la adición de fertilizantes -- químicos que constituyen uno de los mayores gastos para el -- campesino, puesto que el costo de éstos esta siempre en aumen-- to (20), así entre la cosecha primavera-verano anterior y la

de 1987 se espera un incremento del 164 a 272% en el precio de los fertilizantes (50). La cantidad de fertilizante químico adicionada al cultivo puede ser disminuida, aumentando o manteniendo constante el rendimiento mediante la utilización de biofertilizantes, esto es, microorganismos capaces de proporcionar parte de los requerimientos nutricionales de la planta (94), lo que es económica y ecológicamente más adecuado (11).

Las gramíneas en general y específicamente el maíz, requieren de un manejo adecuado en cuanto a la fertilidad del suelo, ya que necesitan de una buena cantidad de nitrógeno para alcanzar su máximo rendimiento (30). Esto se debe a que el mayor limitante del crecimiento vegetal es la cantidad disponible de nitrógeno asimilable, tanto en ecosistemas naturales como en cultivos (22,27,82) y agregado en forma adecuada en la práctica agrícola resulta un fertilizante esencial.

Si bien en la atmósfera se tiene el 78% en volumen de nitrógeno, éste no puede ser utilizado por las plantas, debido a que no está en forma asimilable como iones nitrato o amonio (10). Para ello es necesaria su conversión química a partir del dinitrógeno, esto es la fijación, que puede ser realizada física, química (industrial) y biológicamente (76). La fijación física de nitrógeno dada por meteoros atmosféricos, constituye el menor aporte de nitrógeno fijado en la biosfera (22).

La fijación química es realizada mediante el proceso Haber-Bosch muy costoso energética y económicamente, repre-

sentando el mayor influjo de nitrógeno en la agricultura moderna de no leguminosas (22,27,75).

Por su parte, la fijación biológica es efectuada por algas verdeazules y algunas bacterias y actinomicetos considerándose la fuente más importante de nitrógeno fijado (22,51).

Entre los microorganismos asociados simbióticamente con vegetales se encuentra la relación de leguminosas con bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium, que es el sistema más desarrollado para la fijación del nitrógeno en forma biológica y que ha sido la alternativa más explotada desde el punto de vista agrícola (82,75), sin embargo no es la única.

Otro tipo de simbiosis es la llamada rizocenosis asociativa entre las bacterias del género Azospirillum y diversas herbáceas (10,28).

Esta asociación reviste particular interés debido a que comprende gramíneas de importancia económica como el maíz, - por lo que a partir de su descubrimiento en 1974 se iniciaron líneas de investigación tendientes a favorecer el establecimiento de tal asociación como una práctica agrícola (2,29). Los resultados en tales investigaciones en la asociación con maíz indican que Azospirillum incrementa el rendimiento y -- otros parámetros agronómicos, y que es posible su uso como biofertilizante y mejorador del suelo (6,20,39,41,65).

Sin embargo, este sistema no es utilizado como práctica agrícola común debido a que aspectos básicos de la asociación aún se desconocen (13,41) y por lo tanto esta alternativa no se aplica en la actualidad (31,67). Los ensayos de la utili-

zación de tal sistema han llegado hasta el nivel de parcelas comerciales con resultados satisfactorios (60,66), aunque no todos los intentos han mostrado lo mismo, lo que ocasionó que la asociación no fuera tomada como alternativa viable (75,92) Tales resultados contradictorios con esta asociación se han presentado tanto nivel invernadero como de campo (60,71), la razón de ello es difícil de dilucidar pero se atribuye al menos en parte, a que no se han considerado ciertos factores como son la afinidad cepa-genotipo de la planta (28,71), que contribuyen a la capacidad de infección de la bacteria. Por lo anterior se ha sugerido encaminar las investigaciones hacia la determinación de los aspectos de afinidad y capacidad de infección, antes que el establecimiento de pruebas de viabilidad de la asociación a nivel agrícola (41,67,71).

Uno de los pasos iniciales en el aprovechamiento de la asociación Azospirillum-gramíneas será por una parte, el estudio de los factores que determinan la afinidad planta-bacteria y además la influencia de factores ambientales en el establecimiento de la rizocenosis considerando áreas o regiones -- particulares. (15,71).

Así, mediante los ensayos en diferentes cepas y genotipos de plantas y condiciones ambientales diferentes se podrán obtener aquellas cepas infectivas, competitivas y efectivas que puedan establecerse en una zona dada, lo que posibilita el estudio de la determinación de que factores tienen mayor influencia y además el avance en el establecimiento de Azospirillum - como alternativa útil en el agro.

Por lo anterior, en el presente estudio se determinaron las cepas más sobresalientes y su efecto en el cultivo de --- maíz en una zona agrícola de temporal a fin de poder inferir la utilidad de Azospirillum y algunos aspectos de la afinidad planta-bacteria para establecer las bases de estudios posteriores en una región que necesita alternativas de mejoramiento en la explotación agrícola .

### III. MARCO TEORICO

#### 1. NITROGENO

##### A. Características e importancia biológica.

Entre los bioelementos el nitrógeno se encuentra cuantitativamente en cuarto lugar después del Hidrógeno, Oxígeno, y Carbono (51).

La forma más abundante del nitrógeno en la biósfera corresponde a la molécula diatómica ( $N_2$ ) lo que hace que la denominación correcta sea dinitrógeno (75). La energía de disociación de tal molécula es de 225 Kcal debido a su triple enlace (55).

El nitrógeno es capaz de jugar su complicado papel en los procesos biológicos gracias a su cantidad poco común de niveles de oxidación o valencia que le dá la suficiente versatilidad para que en vegetales y animales la mayor parte del nitrógeno se encuentra altamente reducido, amonio o compuestos aminados, es decir valencia (-3), en cambio en el suelo se encuentra con valencia (+5) (22).

El dinitrógeno gaseoso representa el 99.4% de todo el nitrógeno existente en la biosfera (48). Sin embargo esta gran cantidad no puede ser utilizada por plantas y animales, ya que no se encuentra en una forma químicamente disponible como iones nitrato o amonio, esta es la llamada "Paradoja del Nitrógeno" (82).

La excepción a lo anterior lo constituye un grupo de -- ciertas algas cianofíceas, algunos actinomicetos y bacterias que son capaces de aprovechar el dinitrógeno por medio de la fijación biológica, esto es transformar a amonio el nitrógeno gaseoso y por lo tanto ponerlo a disponibilidad de las -- plantas (75).

Los nitrificadores constituyen la fuente más importante de nitrógeno asimilable (51). Sin embargo, esta cantidad -- es comparativamente muy pequeña al dinitrogeno existente, lo que hace a este elemento el factor limitante del crecimiento vegetal en biomasa en ecosistemas naturales y cultivos, y además que la dinámica del nitrógeno en la biosfera este estrechamente relacionada al ciclo del carbono (51). Así, la cantidad de dinitrógeno transformado biológicamente por los nitrificadores es muy importante para el mantenimiento de los ecosistemas (75).

El elemento nitrógeno es un constituyente esencial de todos los seres vivos, las proteínas y los ácidos nucleicos son sus principales compuestos nitrogenados y su importancia en -- los procesos esenciales de la vida es evidente, puesto que interviene en el material hereditario y además en los componentes estructurales, asimismo otros materiales biológicos contienen algunos átomos de nitrógeno (75).

La masa vegetal contiene por término medio entre un 2 y un 4% de nitrógeno del cual entre el 15 y 19% se encuentra en el material proteínico, su importancia es tal que se dice que el poder de síntesis de las plantas y la producción de mate--

ria orgánica están regulados por el suministro de nitrógeno (51).

### B. El Ciclo del Nitrógeno

La distribución del nitrógeno en la biosfera (Diagrama - No. 1) muestra una gran concentración de este elemento en la atmósfera, sedimentos y corteza. Sin embargo, es en la biota donde se efectúa el intercambio más dinámico y en donde el nitrógeno realiza los cambios químicos más importantes. Por lo tanto se puede decir, que el ciclo del nitrógeno tiene lugar principalmente entre organismos y medio inmediato, esencialmente suelo (51).

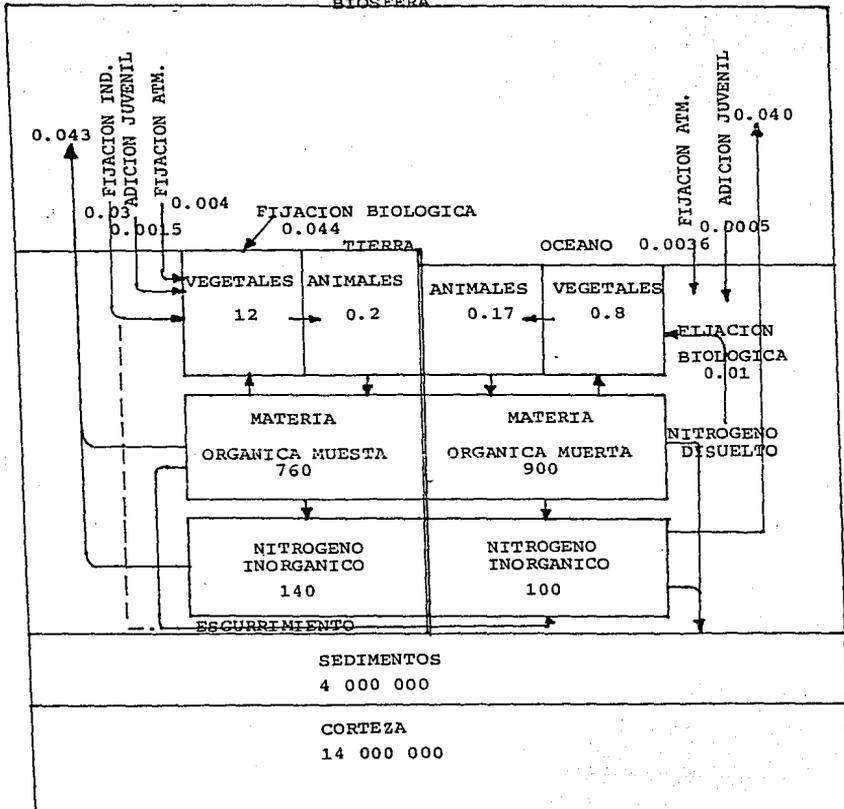
En ningún sitio de los bioelementos los microorganismos tienen un papel tan importante como en el caso del nitrógeno, esto es debido a que la forma asimilable por vegetales es solamente como nitrato y amonio y no como se encuentra en la atmósfera. De esta manera, los organismos edáficos que transforman el nitrógeno atmosférico en amoniaco, los fijadores de nitrógeno y aquellos que convierten el nitrato en dinitrógeno los desnitrificantes, unen al ecosistema con la atmósfera --- (51).

El ciclo del nitrógeno mostrado en una forma simplificada (diagrama No.2) presenta el siguiente comportamiento:

El nitrógeno atmosférico ingresa al ecosistema por medio del proceso llamado fijación, que puede ser física, química o biológica.

El nitrógeno fijado pasa a la materia orgánica y humus - del suelo de donde gran parte de los organismos edáficos lo -

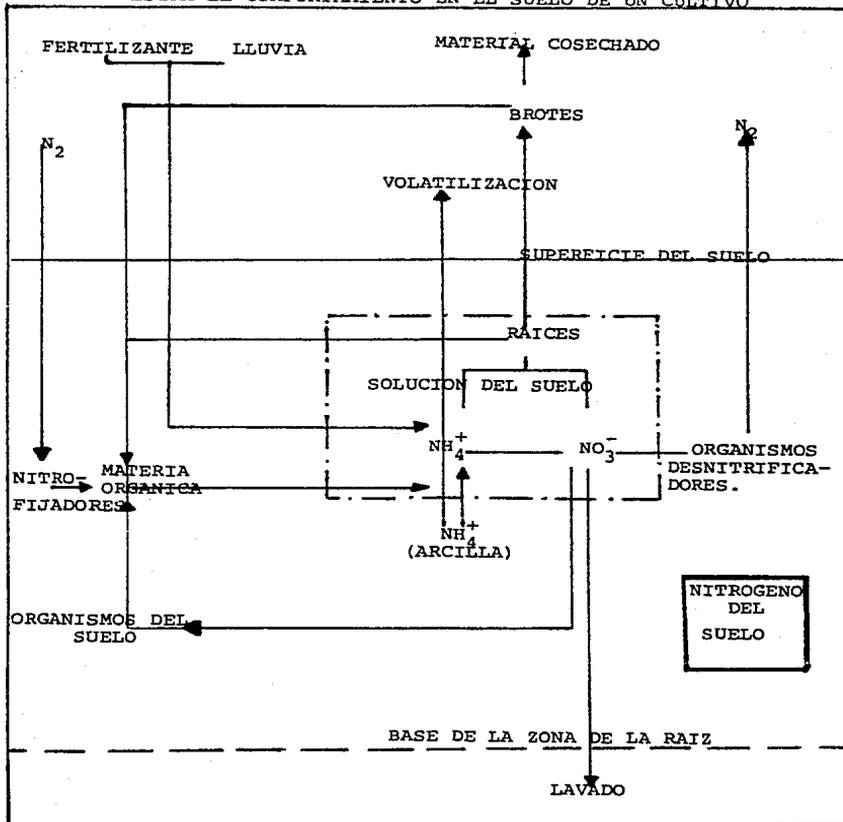
DIAGRAMA No. 1  
DISTRIBUCION DEL NITROGENO EN LA  
BIOSFERA



CIFRAS EN MILES DE MILLONES DE TONELADAS.

DIAGRAMA No. 2  
EL CICLO DEL NITROGENO

SE MUESTRA EL COMPORTAMIENTO EN EL SUELO DE UN CULTIVO



asimilan y además, aquel que entra en la solución del suelo asociada a las raíces es absorbida por las plantas. El amoniaco procede tanto de la fijación como de la autólisis de la materia orgánica, a este último proceso se le denomina amonificación (75). Todas las plantas y muchas bacterias reducen los nitratos a amoniaco por medio de los nitritos, luego el amoniaco es incorporado a los biopolímeros nitrógenados, este proceso se llama reducción asimiladora de los nitratos y es el principal proceso de incorporación de nitrógeno a la planta (75) y de aquí por su consumo a los animales representado en el diagrama por la cosecha.

Parte del amoniaco permanece libre o bien se une a las partículas del suelo como las arcillas y posteriormente es volatilizado a la atmósfera. También participa en el proceso de nitrificación en donde ciertas bacterias lo oxidan para formar nitritos y nitratos (75).

Por último, el paso de unión entre el ecosistema y la atmósfera, la desnitrificación, que es realizada por ciertas bacterias consiste en la reducción del nitrato a dinitrógeno.

#### C. Ciclo de asimilación del nitrógeno en las plantas.

Larcher (51) propone el siguiente ciclo de asimilación de nitrógeno en vegetales:

Las plantas verdes toman de la solución del suelo al nitrógeno inorgánico en forma del ión nitrato o amonio de los cuales el primero es la fuente más importante. La captación

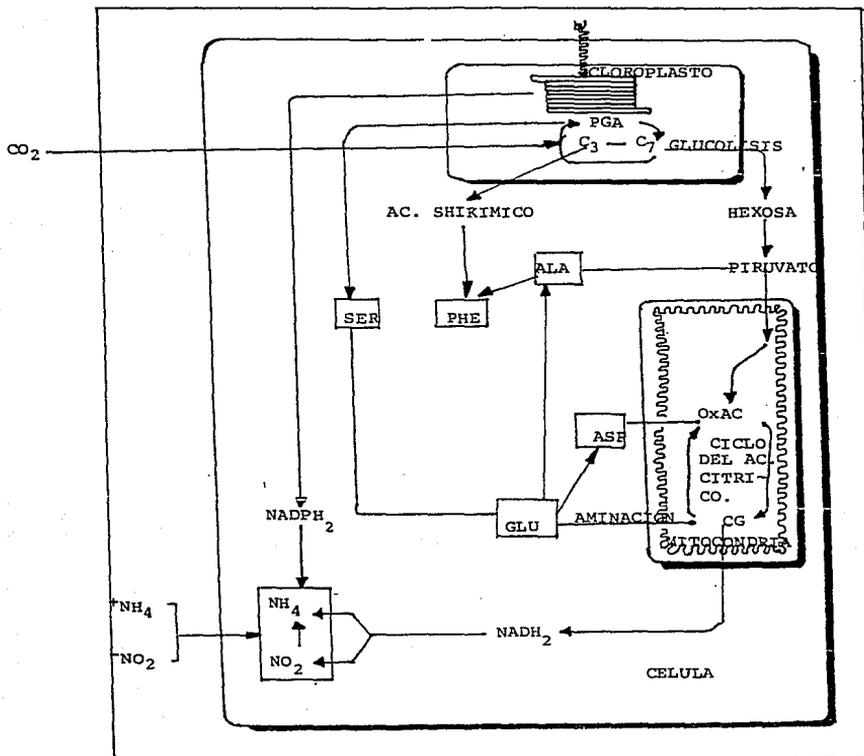
de dicho nitrógeno depende de cierta energía y por lo tanto de la respiración.

Este nitrógeno absorbido se incorpora como grupo amino a moléculas orgánicas originándose así los aminoácidos (diagrama No. 3).

En ésta asimilación la primera reacción es la reducción de nitrato a nitrito, la cual es catalizada por una serie de enzimas principalmente la nitrato reductasa) y cofactores y finalmente por la acción de la nitrito reductasa el nitrito se transforma a amonio. En ésta reducción asimiladora de nitritos se utiliza  $\text{NADH}_2$  proveniente de la respiración y en las células con cloroplastos se utiliza  $\text{NADPH}_2$ , proveniente de las fotoreacciones de la fotosíntesis .

El proceso asimilativo es realmente una aminación reductiva de los  $\alpha$ cetoácidos (principalmente del ácido  $\alpha$ -cetoglutárico en las plantas superiores, que es un producto intermediario del ciclo del ácido cítrico). Al aminarse el ácido, pasa a ácido glutámico, que puede ceder el grupo amonio a -- otros cetoácidos que aparecen en la glucólisis y en el ciclo del ácido cítrico (transaminación). A partir de éstos amino ácidos primarios se derivan los restantes cuyo esqueleto carbonado se origina de los productos intermediarios del metabolismo vegetal, incluyendo el de carbohidratos, el ciclo de - Calvin y el ciclo oxidativo de la pentosa fosfato, formados de esta manera los aminoácidos se efectúan los procesos para dar origen a las proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos de nitrógeno.

DIAGRAMA No. 3  
ASIMILACION DEL NITROGENO EN LA PLANTA Y SU  
RELACION CON EL METABOLISMO CELULAR.



La eliminación del nitrógeno en las plantas superiores se realiza tomando compuestos de nitrógeno inorgánico del medio que las rodea. A veces, los productos de asimilación - del nitrógeno se catabolizan hasta el estado inorgánico. El nitrógeno se excreta en su mayor parte en forma de compuestos nitrogenados, además en la caída de hojas y frutos se pierde nitrógeno en mayor cantidad ya que el follaje lo contiene en el protoplasma y en el citoplasma y las semillas lo almacenan en forma de proteínas como reserva.

## 2.LA FIJACION DEL NITROGENO.

Dentro de la dinámica del ciclo del nitrógeno, los procariontes juegan el papel más importante, de éstos, los nitrificadores son los más relevantes puesto que participan en el proceso que constituye la fuente de nitrógeno viable para los demás organismos vivos, ya que proveen de 100 a 200 Kg/ Ha de nitrógeno (82), lo que equivale al 59% del nitrógeno - fijado anualmente en la Tierra (22). Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno, no es la única, existen además la fijación de alta energía o física y la fijación química - o industrial.

La llamada fijación del nitrógeno de alta energía, es - la producida por los relámpagos, radiaciones cósmicas y caída de meteoritos que proveen a la Tierra 8.9 Kg de Nitrógeno por hectárea (82), lo que si bien es una cantidad significativa de alrededor de 4000 millones de toneladas métricas del

total existente, es el proceso de fijación de menor aporte - (22). Esta fijación da como resultado la formación de nitratos en la atmósfera, los cuales son arrastrados por la lluvia y adicionados a la Tierra (82).

La fijación química aporta el 33% del total producido - 30 millones de toneladas. El método por el que se producen los fertilizantes químicos corresponden al proceso Haber -- Bosch en el cual el nitrógeno y el Hidrógeno atmosférico se pasan por un catalizador, generalmente de níquel, a una temperatura de 500°C y varios cientos de atmósferas de presión (22). Los fertilizantes químicos son muy costosos ya que la manufactura de una tonelada de fertilizante nitrogenado requiere la energía equivalente a la producción de 7 barriles de petróleo (27). Por lo que la fijación biológica que es otra de las fuentes de obtención de nitrógeno, constituye el método alternativo y más económico en la producción de productos básicos (10).

#### A. Mecanismo de la fijación biológica de nitrógeno

Aunque no dilucidado completamente, el mecanismo de fijación de nitrógeno en las bacterias ha sido descrito en muchas de sus fases importantes con base a resultados experimentales, sin embargo, no se puede asegurar que los pasos propuestos sean exactamente los que ocurren (11,75).

La fijación biológica del nitrógeno se realiza gracias a una serie de procesos acoplados al metabolismo del microor-

ganismo en donde una enzima cataliza tal sistema, la nitrogenasa, esta enzima peculiar requiere para su acción de ciertas condiciones como son: Escasez de Oxígeno, por el que es destruída, iones magnesio para su activación y la necesidad de - ATP y ADP (11,75). La enzima consta de dos proteínas que con tienen hierro y molibdeno y según la especie varía en sus características más específicas (75).

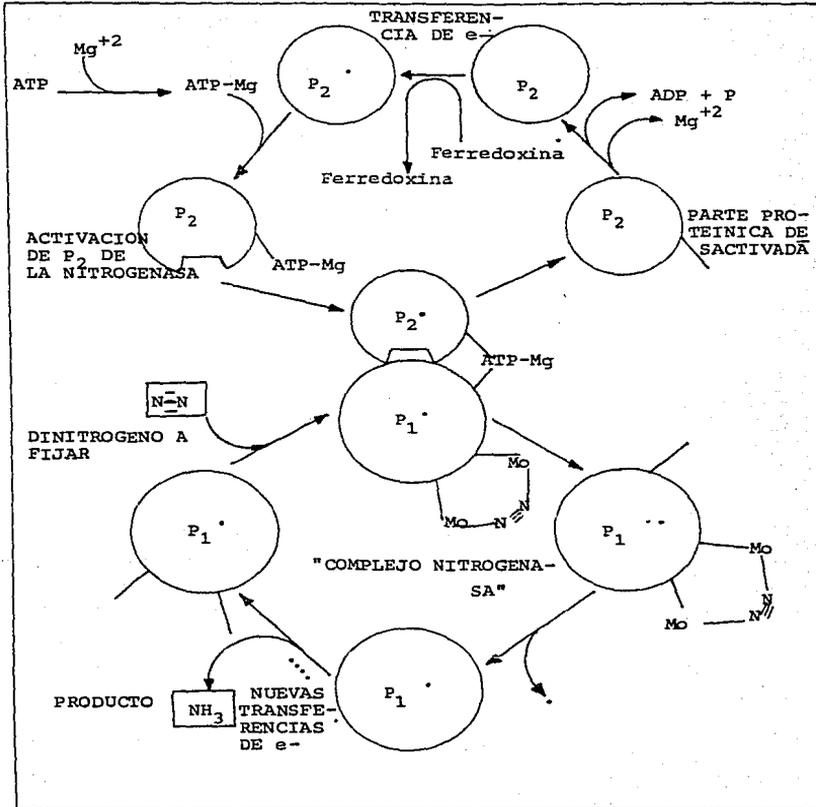
El mecanismo de la fijación biológica (esquema No. 1) -- puede ser propuesto como sigue(75):

La activación de la forma reducida de la parte de la enzima más pequeña, se realiza con átomos de hierro (p2) con -- gasto de ATP y con la reacción con iones Magnesio, así activa da esta proteína se une a la otra parte de la enzima, la más grande que contiene Hierro y Molibdeno (p1) la cual con un electrón de más ha atrapado a un sustrato reducible como el -  $N_2$  en el átomo de Molibdeno, probablemente, unidas las dos -- proteínas se forma el complejo "nitrogenasa" favorecido por la presencia de ATP y Mg, en donde se dan sucesivas transferencias de electrones de p2 a p1, después se separa la unidad -- más pequeña continuando la transferencia de electrones hasta dar un producto como el  $NH_3$  el cual ya no puede ser retenido en la proteína y es liberado. El electrón adicional en cada repetición de éste proceso es donado a la unidad p2 por un -- donador de electrones que puede ser la ferredoxina o la flavodoxina (75).

Uno de los descubrimientos más relevantes dentro de la -- dilucidación del mecanismo de fijación y su determinación ge-

## ESQUEMA No. 1

MECANISMO DE LA FIJACION BIOLÓGICA  
DE NITRÓGENO, PROPUESTO POR POSTGATE (75).



nética es el hecho de que se ha establecido que la caracte--  
rística y capacidad de fijar nitrógeno biológicamente es con-  
ferida generalmente dentro de las bacterias por un plásmido  
(60).

En las bacterias simbióticas y probablemente en las aso-  
ciativas la fotosíntesis juega un papel muy importante, ya --  
que estos simbióntes utilizan productos carbonados formados -  
durante este proceso (fotosintatos), para llevar a cabo la fi  
jación. Esta función depende del suministro de sustrato apro  
vechable que no sólo es fuente de energía (en forma de ATP) -  
sino que proporciona el poder reductor necesario, además de -  
proveer el esqueleto carbonado adecuado para la incorporación  
del amonio formado. Así la asociación bacteria planta utili-  
za aunque indirectamente la luz como fuente de energía (9).

### 3. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS NITROFIJADORES

La importancia de los microorganismos edáficos dentro de  
los diversos procesos de desarrollo del suelo, y sobre todo  
en la fertilidad y el crecimiento de las plantas fue reconoci  
da hasta recientemente. Actualmente, se tiene conocimiento -  
de una gran cantidad de interacciones entre microorganismos -  
del suelo y las plantas, tales relaciones abarcan tanto fenó-  
menos de patogenicidad como de mutuo beneficio simbiótico.  
Sin embargo, las interacciones no se manifiestan entre un só-  
lo microorganismo y la planta, sino en una multiplicidad de -  
relaciones que abarcan gran diversidad de la fauna edáfica, -

lo que hace difícil el estudio de éstos fenómenos (68).

Las relaciones que se establecen entre las plantas y los microorganismos abarcan una sorprendente y muchas veces inesperada variedad de interacciones. De tales relaciones es evidente el interés e importancia de los microorganismos que benefician a los vegetales, ya sea por sus implicaciones ecológicas como las económicas. Estos organismos benéficos se les conoce como Promotores de la Regulación del Crecimiento de las Plantas (PGPR en sus siglas en inglés) que abarcan varios tipos de procariotes. Los PGPR se pueden clasificar de acuerdo a la forma en que ejercen su actividad a la parte vegetal (68):

- 1.- De efecto directo; abarca la variedad de microorganismos que en mayor o menor grado se asocian a la parte vegetal y le proporcionan o inducen la producción o absorción de sustancias o nutrimentos que benefician el crecimiento de las plantas. Dentro de éstos organismos se pueden mencionar las micorrizas que mejoran la captación de nutrimentos y agua, a las bacterias simbióticas nitro fijadoras como los rizobia y a Azospirillum con sus efectos benéficos que incluyen la nitro fijación y la producción de sustancias reguladoras del crecimiento.
- 2.-Antagonismo; Los microorganismos benefician a la planta en forma indirecta al impedir el crecimiento de fitopatógenos si estos son antagonistas. Si bien, ya se había propuesto la producción de antibióticos en el suelo sólo hasta recientemente se ha logrado probar su existencia in situ.

- 3.- Por Competencia; en éste apartado se clasifican los organismos que ocupan sitios activos en la planta, los cuales corresponden también a los que pueden ocupar los fitopatógenos y de ésta manera impiden su acción deletérea a la planta . También abarcan a microorganismos que colonizan la rizosfera y compiten por nutrimentos con otras especies que son patógenas a la parte vegetal.
- 4.- Enzimas líticas;Comprenden microorganismos que poseen - la capacidad de producir enzimas que afectan la estabilidad de la estructura celular de microorganismos de la rizosfera potencialmente patógena.
- 5.- Competencia por Hierro; Aunque se puede incluir en el apartado de competencia por nutrientes los organismos comprendidos en el presente inciso merecen especial consideración por ser de los aspectos más recientes en investigación. Los microorganismos se distinguen por producir cierto tipo de péptidos denominados sideróforos que quelan el Hierro que está en forma disponible para otros - microorganismos que pueden ser deletéreos, y además probablemente lo ponen a disposición de la planta de alguna forma no determinada aún (68).

Por otra parte en la fijación biológica de nitrógeno están involucrados dos grupos de microorganismos: (a) Microorganismos no simbióticos que viven en forma libre en el suelo y - (b) Microorganismos simbióticos que se encuentran generalmente en las raíces de diversas plantas ( 75 ).

Entre los microorganismos libres fijadores de nitrógeno,

se tienen las bacterias Clostridium pasterianum y Azotobacter chroococcum, algunas bacterias fotoautótrofas y otras capaces de incorporar el nitrógeno molecular como son las bacterias oxidadoras del Hidrógeno, además de algunas cianofíceas de géneros formadores de heterocistos, ejemplos de éstas son: Nostoc, Anabaena, Calothrix y Mastigocladus, algas verdeazules que están provistas de orgánulos totalmente específicos para la fijación (51). De entre este tipo de fijadores de nitrógeno los más efectivos son los que se encuentran en lugares cálidos permanentemente húmedos. Las cianofíceas de arrozales fijan 5 veces más nitrógeno que las bacterias del suelo, que por término medio fijan 10 Kg de  $N_2$ /Ha /Año (51).

Con respecto a los microorganismos simbióticos, la fijación la efectúan bacterias del género Rhizobium y Bradyrhizobium en asociación con plantas leguminosas, antes que éstas bacterias puedan fijar nitrógeno se debe establecer en las células de los tejidos de las raíces de la planta huésped.

Los fijadores simbióticos de nitrógeno son capaces de fijar mucho más nitrógeno atmosférico que los microorganismos libres (51).

Entre los fijadores simbióticos se encuentran también algunos actinomicetos como Frankia que forman nódulos con Alnus, Myrica y otros y Nostoc que entra en simbiosis con líquenes - helechos y algunas plantas (51).

Otro tipo de simbiosis es la llamada rizocenosis asociativa que se establece entre las bacterias del género Azospirillum y una gran diversidad de plantas (10).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno ocurren en gran número en la rizosfera de la raíz de varias herbáceas, se encuentran por ejemplo: Azospirillum, Beijerinckia y Derxia -- (10).

La característica de la rizocenosis es la ausencia de estructuras que evidencian la presencia de la bacteria (42), ya que no existen nódulos, la medición de la colonización y la infección se asume por métodos microbiológicos que incluyen el aislamiento y la observación al microscopio, lo que contribuye a hacer más difícil el estudio de la asociación.

Las bacterias asociativas que son también nitro fijadores libres, incluyen los siguientes géneros:

BACTERIA	PLANTA A LA QUE SE ASOCIA
<u>Achromobacter</u>	Arroz.
<u>Enterobacteriaceae</u>	Arroz, sorgo y mijo
<u>Azotobacter</u>	Caña de azúcar, sorgo y mijo
<u>Vibrio</u>	Caña de azúcar.
<u>Clostridium</u>	Caña de azúcar
<u>Klebsiella</u>	Caña de azúcar, sorgo y mijo.
<u>Bacillus</u>	Sorgo, mijo y trigo.
<u>Derxia</u>	Caña de azúcar, sorgo y mijo.
<u>Pseudomonas</u>	Caña de azúcar.
<u>Campilobacter</u>	<u>Spartina</u>
<u>Beijerinckia</u>	Ubicua
<u>Azospirillum</u>	Ubicua.

#### 4. Azospirillum.

Azospirillum spp. es una bacteria en forma de espirilo, que se encuentra en el suelo, viviendo en forma libre y asociada a las raíces de una gran variedad de plantas (10) y se considera que es responsable de la actividad nitrogenásica - de éstas (27). Se infiere que la asociación entre la bacteria y la parte vegetal es una simbiosis benéfica por ser un microorganismo nitro fijador (85) y productor de sustancias - reguladoras del crecimiento vegetal (71,89).

##### A. Historia.

El primer reporte conocido acerca de esta bacteria es el realizado por Beijerinck en 1923, en donde se denominaba Azotobacter spirillum, cambiando el mismo autor el nombre a Spirillum lipoferum en 1925, sin embargo, durante mucho tiempo no se prestó atención a este grupo de bacterias y sólo -- en 1932 Scroder la estudió no pudiendo encontrar pruebas de fijación de nitrógeno (64). El manual de Bergey's de ---- 1957 describió al organismo dentro de los Spirillaceae y se estableció que sí fijaba nitrógeno, pero fué hasta que Becking en 1963, al demostrar incorporación de nitrógeno marcado se tuvo la certeza de la característica nitro fijadora --- (64). Sin embargo, pocos o ningún investigador en el mundo estudiaron la bacteria, al grado de que en la edición del Manual de Bergey's de 1975 Spirillum lipoferum no fué incluida

porque ningún cultivo fué obtenido en este tiempo (88).

En 1974 en Brasil esta bacteria fué redescubierta por - Peña Cabriales y Dobereiner, quienes la encontraron en pas--tos tropicales (29), a partir de este descubrimiento se inició la investigación de la simbiosis, pues sus implicaciones agrícolas eran amplias al estar involucradas gramíneas de im portancia económica en la asociación (14).

En Argentina, Merzani en 1977, la aisló por primera vez y debido a su importancia como bacteria fijadora de nitróge--no su estudio se intensificó (2). Depolli, et al demuestran la incorporación de N<sup>15</sup> en plantas inoculadas con Spirillum lipoferum por este tiempo (25).

En 1978, se hizo una revisión de su taxonomía y se esta--bleció como un nuevo género bajo el nombre de Azospirillum spp. con dos especies: A. lipoferum y A. brasilense (88).

Magalhaes en 1983 propone una nueva especie: A. amazo--nense, aislada de suelos ácidos de Brasil (54).

En 1984 se reporta en el Manual de Bergey's pero sólo - dos especies: A. lipoferum y A. brasilense (49). La tercera especie, A. amazonense no es reconocida en este manual, sin embargo ha sido estudiada muy detalladamente (12). Las ca--racterísticas diferenciales de éstas especies se ilustran en la Tabla No. 2.

En 1984, se propuso una nueva especie A. seropediceae, sin embargo, recientemente fué rechazada como tal bajo estu--dios de homología de DNA, confirmándose como especies dife--rentes A. lipoferum, A. brasilense y A. amazonense (33).

T A B L A      No.      2.

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE AZOSPIRILLUM.

	<u>A. amazonense</u>	<u>A. lipoferum</u>	<u>A. brasilense</u>
Crecimiento en medio agar con papa Colonias típicas.	Blancas, planas con bordes elevados.	Rosas elevadas.	Rosas elevadas.
Crecimiento en medio con pH arriba de 6.8	muy pobre	bueno	bueno.
Tolerancia de Oxígeno para la actividad de la nitrogenasa.	muy baja	baja	baja.
Desasimilación de: NO <sub>3</sub> ——— NO <sub>2</sub>	+a	+	+
NO <sub>2</sub> ——— N <sub>2</sub> O	-	+	+
Ancho de las células (nm, creciendo con N <sub>2</sub> )	0.68 ± 0.08	1.0 a 1.5b	0.9 ± 0.03
Flagelo polar	+	+	+
Flagelos laterales en medio alcalino.	-	+	+
Células pleomórficas en medio alcalino	-	+	-
Requerimiento de <u>bio</u> tina.	-	+	-
Uso de sacarosa	+	-	-
Tiempo de generación para crecimiento dependiente de N <sub>2</sub> a una pO <sub>2</sub> óptima.	10 horas.	5-6 horas	6 horas.
Comp. DNA base ( mol - % G+C )	67-68	69-70	69-70
a. + positivo en más de 90% de las cepas			

+ positivo en menos del 50% de las cepas.

- negativo

- b. Las células de A. lipoferum pueden llegar a ser más largas y anchas en cultivos alcalinos viejos.

(Bodley y Dobereiner, 1984).

A partir de suelos salinos de la región del Punjab en - Pakistán se aislaron cepas asociadas a pasto Kallar que actualmente han sido propuestas como pertenecientes a una nueva especie denominada A. halopraeferens por el grupo de investigación del Instituto de Biofísica de Hannover, R.F.A. y el - de Microbiología y Genética Microbiana de Bélgica (69).

#### B. Clasificación taxonómica.

##### Azospirillum spp:

Abarca el grupo Gram (-) de espirillas fijadores de nitrógeno el cual fué llamado originalmente Spirillum lipoferrum (49,88). A continuación se dan las características taxonómicas, descritas en el Manual de Bergey's (49).

El nombre se Azospirillum deriva del sustantivo francés Azote, nitrógeno y del griego Spira una espiral; Spillum -- una espiral pequeña, por lo que su nombre significa una pequeña espiral de nitrógeno.

Son células vibrioides o curvadas con una o una y media vuelta. Contienen diminutas gotitas de grasa, las cuales -- pueden deformar las células, estas gotitas son gránulos intercelulares de PHB (Polihidroxibutirato).

Su movimiento típico es avance y retroceso de las células con curvatura de la pared celular y rotación radial (2). Son móviles por medio de unos penachos de flagelos polares.

Su diámetro celular es de 1  $\mu$ m.

Cuando crecen en medio sin nitrógeno en tubos presentan una película superficial blanca y densa compuesta de espiri-

los (2).

Las colonias de agar-malato-calcio son circulares, pequeñas y transparentes. El malato es oxidado a carbonato de calcio. Las colonias de peptona-agar presentan un desarrollo más abundante en caldo de peptona-glucosa, las células son activamente móviles con grandes gotitas de grasa. En medio sólido de malato se presentan como colonias de uno a dos milímetros y después de siete días las características son: Convexas, duras o mucosas (2). En medio agar-papa-malato-sacarosa las colonias son de tamaño de 2 a 5 milímetros de diámetro, rosadas y de centro hundido, las células se presentan con muy pocos corpúsculos y tienen muy poca movilidad (2).

Fijan nitrógeno atmosférico en cultivos parcialmente puros, por ejemplo libres de Azotobacter y Clostridium. Son aerobios y microaerofílicos con una temperatura óptima entre 28 y 33°C.

Azospirillum lipoferum:

Su nombre se deriva del griego lipus grasa; del verbo latín fero llevar, adjetivo latín moderno lipoferus, productor de grasa (49).

Utiliza la glucosa como única fuente de carbono (10). Forma espirilos largos (2). Es incapaz de crecer sin biotina (49).

Produce acidez en medio aerobio en glucosa y en caldo de carne peptonado glucosado produciendo espirilos móviles con corpúsculos (2).

En medio sólido de malato y libre de nitrógeno (NFb) -

más 0.005% de extracto de levadura, las células son anchas y largas con forma de S o helicoidales y no móviles (88).

Azospirillum brasilense:

Su nombre se basa en el país en donde se encontró esta bacteria, es decir en Brasil. Son capaces de desarrollarse sin biotina. No producen espirilos largos e inmóviles (49). No generan acidez a partir de glucosa (2).

Esta especie es incapaz de acidificar anaerobicamente sobre la glucosa y forma colonias en caldo de carne peptonado (2). No acidifica con ribosa, manitol o sorbitol (88).

No tiene la capacidad fermentativa para los azúcares; no tiene requerimientos vitamínicos para el crecimiento (88).

C. Distribución ecológica de Azospirillum

Los diazótrofos están ampliamente distribuidos en la biosfera y han sido encontrados en diversos ambientes, desde los trópicos hasta los polos (10).

La distribución ecológica considerada por Dobereiner, - de Azospirillum es la de pertenecer a suelos tropicales (2), si bien Azospirillum ha sido aislada de suelos y raíces de una amplia variedad de plantas de regiones templadas y tropicales. Algunos investigadores consideran que éste organismo de especial significancia en los trópicos (10,26). Y en especial a las plantas C4 (27). Las herbáceas que poseen - la vía del ácido dicarboxílico C4 de fotosíntesis utilizan - su nitrógeno viable más eficientemente en la producción de - materia seca y en la fijación atmosférica de CO<sub>2</sub> que las her

báceas que poseen la vía C3 (10), Dobereiner sugirió que las plantas C4 son más eficientes en la estimulación de la fijación de nitrógeno por las bacterias en las raíces (26).

Con base en lo anterior se propuso la hipótesis de que A. lipoferum se encontraba asociada con las raíces del maíz, sorgo y pastos forrajeros (97) y A. brasilense se encontraba asociada a plantas C3 (28,85). Sin embargo, no hay un completo acuerdo con respecto a tal especificidad ya que se han encontrado ambas especies asociadas a plantas C3 y C4 indistintamente (91) y más aún hasta en dicotiledóneas del tipo CAM, metabolismo del ácido crasuláceo (78).

Vlassak y Reynders (96) encontraron que el 50% de las muestras estudiadas en zonas templadas contenían Azospirillum, en éstas áreas la distribución es diferente dependiendo del gradiente de temperatura. Entre los países de zona templada en donde se encontró la bacteria están: Grecia, Bélgica, Canadá, Francia, Suiza, E.U., Nueva Zelanda y de la zona tropical se encontró en: Egipto, India, Sri Lanka, Indonesia (96). Sin embargo, las diferencias con respecto a la distribución de este microorganismo parece ser más cuantitativa que cualitativa entre zonas tropicales y templadas (5). Además la gran distribución de la bacteria fué acentuada por los informes que indican su presencia en climas fríos y suelos ácidos como en Finlandia (36). Lo anterior ha sido reforzado por los aislamientos efectuados en casi todas las regiones del planeta, incluyendo zonas subtropicales como Argentina (2), México (32,57). Así el carácter ubicuo de

la bacteria parece ser evidente (72,98).

Entre las plantas con las que se asocia se encuentran, - entre otras:

Gramíneas: Trigo, cebada, maíz, sorgo, arroz y varios pastos forrajeros (96).

Compositae: Chicoria, girasol, girasol de Jerusalem y Diente de León (96).

Papilionaceae: Soya y Lupinus (96).

Cactáceas: Nopal y Biznagas (79).

Tanto en ecosistemas naturales como en cultivos (91).

Con respecto a los suelos, el tipo aluvial ha mostrado una fuerte influencia sobre la distribución de Azospirillum el pH óptimo del suelo debe ser de 7, aunque persiste hasta pH de 4.8 (10,36,64). Sin embargo, la bacteria ha mostrado ser muy efectiva en algunas ocasiones, en suelos alcalinos, calcáreos o muy limosos (71).

Las cepas de las regiones templadas, parecen mostrar -- una alta presión parcial de oxígeno óptimo, pH óptimos bajos y poca actividad específica así como pequeña eficiencia de - la nitrogenasa (96).

La simbiosis asociativa es común tanto en regiones templadas como tropicales y únicamente las condiciones climáticas extremas prohíben el crecimiento que puede influir en la ocurrencia de Azospirillum (96).

D. Características de interés agrícola de la bacteria Azospirillum sp. presenta dos características sobresalientes

tes:

- (1) Fija nitrógeno en asociación a ciertas plantas (64).
- (2) Produce sustancias reguladoras del crecimiento en estado de vida libre y asociada a pastos y gramíneas (41).

La importancia tanto de la fijación de nitrógeno como de la producción de sustancias reguladoras del crecimiento, no esta completamente determinada, pero se puede decir, que ambos procesos juegan un papel propio, dependiendo de las condiciones en que están considerados ambos fenómenos (95). Por una parte se ha propuesto que la contribución de la fijación de nitrógeno para la producción es mínima y que el efecto de inoculación en el desarrollo y fisiología de la planta son los principales factores benéficos y éstos son causados por las sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas producidas por la colonización bacteriana (71,89) o por las raíces como una reacción a ésta colonización (57). Se ha encontrado la producción de importantes cantidades de ácido indol acético, giberelinas y citocininas (6,16,23,89,95). Sin embargo, no se tiene el efecto estimulador a largo plazo de las fitohormonas y se piensa, que es posible que el mayor efecto de las sustancias reguladoras del crecimiento sea el estimular el desarrollo de la raíz, de ésta manera el mejoramiento del crecimiento de las raíces, dá como resultado un incremento en el acceso de los nutrimentos presentes en el suelo, lo cual origina parte o todas las respuestas de la planta a la inoculación (41,92). Así, la importancia de cada uno de éstos procesos es aún muy discutida, si bien las

observaciones iniciales otorgaron a Azospirillum una alta -- eficiencia en la fijación biológica del nitrógeno (85), la -- nitro fijación ha sido considerada como una causa menor por -- algunos investigadores (6), ya que existe una fuerte eviden- cia de la producción de sustancias reguladoras del crecimen- to (SRC) en cantidades importantes para el desarrollo de la -- parte vegetal (23,37) y además la fijación de nitrógeno es -- muy difícil de medir en condiciones de campo (71). De esta forma no se puede asumir que alguna de éstas características tenga una mayor importancia que la otra.

Por otra parte, la bacteria es muy relevante desde el -- punto de vista de su participación en los procesos de trans- formación del nitrógeno en la naturaleza (63), ésto se debe a sus características peculiares que son: (a) Todas las ce- pas presentan la capacidad de asimilar nitrato, (b) En condi- ciones limitantes de oxígeno, las bacterias transforman el nitrato en nitrito y rápidamente es reducido a gas en algu- nas cepas (54), (c) En ausencia de una fuente de nitrógeno -- la bacteria es capaz de fijarlo a bajas concentraciones de -- oxígeno (27,28,72). Por lo tanto Azospirillum es un organis- mo que puede tanto fijar nitrógeno como desnitrificarlo, por lo que la bacteria tiene un papel importante en los procesos de transformación del nitrógeno, cuando ocurre en cantidades importantes en el suelo (10,66).

### E. La rizocenosis asociativa.

Con el descubrimiento de la presencia de Azospirilla en las raíces de diversas plantas se abrió uno de los campos más prometedores y difíciles de elucidar en cuanto a la relación planta-microorganismo (98). Desde 1974 numerosas investigaciones han sido enfocadas desde muy diversos aspectos, uno de los de mayor atención es la caracterización de la simbiosis que se establece entre la bacteria y la planta.

Para definirla se le ha denominado rizocenosis asociativa (28), puesto que acontece en la raíz vegetal y se manifiesta como una relación no tan evidente como en el caso de las leguminosas y Rhizobia. La característica esencial de la asociación es la de carecer de estructuras visibles macroscópicamente que demuestren la existencia de la simbiosis (28, 71, 98), de aquí que se le ha denominado también asociación críptica u oculta (42). Este hecho dificulta mucho su estudio lo cual junto con la poca claridad que dan los resultados de las mediciones de nitro fijación en campo y la presencia simultánea de varios microorganismos asociativos por planta constituyen los más grandes obstáculos en la determinación de las características de la simbiosis (71, 98).

En la planta, Azospirillum se ha encontrado en tejido cortical de Digitaria; en células corticales y estelares de maíz (71, 93) y en células epidérmicas y vasos de xilema en plantas que crecen en arena (93, 92).

Azospirilla pueden entrar sobre las áreas en donde se encuentra el mucílago superficial radicular y donde las pare

des de las células de las raíces son delgadas, entrando a -- través de los pelos radiculares lisados y en los huecos de la epidermis, creados por la descamación epitelial y la emergencia de raíces laterales, ya que la bacteria es intercelular, sólo puede entrar a la célula de la raíz cuando el citoplasma está moribundo (92).

La presencia del microorganismo en la lamela media del tejido cortical y el mucílago, sugiere una asociación íntima (92). La presencia de citoplasma activo del hospedero y la existencia de células en división en los tejidos del mismo indican cierta compatitividad en la asociación (93). Al -- parecer, los Azospirilla asociados reciben fotosintatos exudados de la raíz (56), además de otras sustancias como biotina (41) y quimioattractores (23).

La evidencia de una asociación íntima bacteria-planta y la existencia de las características de nitro fijación y -- producción de sustancias reguladoras del crecimiento, ya citadas, junto con las posibilidades de que fuera una relación benéfica en cultivos tan importantes como los cereales, denotaron la importancia de la asociación. Por una parte, la posibilidad de disminuir la fertilización nitrogenada, uno de los lastres económicos de la agricultura en países desarrollados y subdesarrollados (10), en cultivos de importancia -- esencial en la alimentación mundial humana y por otra, el mejoramiento de la producción sin el costo ecológico y económico usual en las alternativas agronómicas actuales (66,100), se tuvieron como vía potencial de uso. Por ello las inves-

tigaciones e intentos de aplicación en campo de la asociación son numerosos. Sin embargo, muchos de éstos intentos fallaron inicialmente, con excepción de la aplicación en mijo y -- pasto guinea (71). En años recientes ha aumentado el número de informes que indican incrementos sustanciales y significativos en el rendimiento y mejoramiento de la nutrición vegetal a causa de la inoculación de la bacteria, por ejemplo, en -- Setaria italica (46), caña de azúcar (71), sorgo (47), trigo (5,60), maíz (65,66,67) y otros.

En la mayor parte de los experimentos los incrementos - de rendimiento conforme a los cultivos han sido del 20% (71) pero existen informes de más de 60% (66) y hasta 128% (39). De modo general, existen tres procesos que pueden ser los -- principales responsables de beneficio de Azospirillum a la - planta, aunque no hay evidencia firme de que uno de ellos -- sea más importante que otro (6,71):

(A) Efectos hormonales sobre la morfología de la planta. Se ha atribuido el beneficio principal en mijo perla y pasto -- guinea (89) y se ha propuesto el modelo de Azotobacter como válido para la asociación (6). Aunque en comparación con es -- te microorganismo (38,100) y otros promotores de crecimiento Azospirillum ha demostrado mayores efectos benéficos (71).

(B) Mejoramiento en la absorción de nutrientes. Esto es -- por el llamado efecto "esponja" propuesto por Okon en 1982, - que sugiere que la bacteria ablanda la lamela media de la - raíz por medio de enzimas pectinolíticas y con ello facili -- ta la entrada de nutrientes (71).

(c) La fijación de nitrógeno. Aunque no hay ninguna eviden --

cia de que el incremento del rendimiento sea por nitrofixación no se ha descartado esta posibilidad y algunos autores la proponen como complementaria en maíz (6), o principal en trigo (60) y otros cultivos como sorgo (46).

A pesar de que en muchos experimentos no han obtenido resultados benéficos y otros han variado año con año (67), - conforme se acumula más información es evidente que el beneficio es real pero que las condiciones para lograrlo no están totalmente definidas (7,67,71).

Así, las condiciones bajo las cuales la inoculación resulta en incrementos significativos y substanciales del rendimiento no están bien definidas (71), por ello son necesarios estudios que conduzcan a la elucidación de tales condiciones para proponer a Azospirillum como una auténtica alternativa para el productor agrícola.

## 5. EL MAIZ

### A. Taxonomía y Descripción.

El maíz, es la planta domesticada del género Zea, es una angiosperma del Orden 16: Gluniflorae, también llamado graminales o Poales de la familia de los pastos, subfamilia: Andropogonaceae, Tribu: Maideae, identificada específicamente como Zea mays L. (52,18).

Debido a su característica de domesticación, esta planta cultivada presenta una gran variabilidad fenotípica, sin embargo, en general responde a la siguiente descripción:

Es una planta anual, alta robusta y monoica, su vaina es sobrepuesta y tiene limbos anchos conspicuamente dísticos; -- las espiguillas se encuentran de 8 a 16, hasta 30 hileras en raquis engrosado y casi leñoso al que se le denomina olote, -- todo esto esta encerrado en numerosas brácteas o estapas palaceas llamadas totomoxtle u holoche, los estilos son largos -- saliendo en punta como una masa de hilo sedoso, el jilote; -- los granos en la madurez son mucho más largos que las glumas (18).

En nuestro país se encuentra una gran variedad de tipos de maíz diferenciados en sus caracteres vegetativos debido -- tanto a variaciones genéticas como a condiciones ambientales, de esta manera existen plantas de un metro hasta más de cuatro metros, con número de hojas diferente así como diferencias en tamaño de las espigas, de las mazorcas, raíces y entrenudos (18).

El cultivo crece en una gran variedad de climas que van desde el templado al tropical, siempre y cuando no se presente una capa de hielo, puesto que el maíz es muy sensible a -- bajas temperaturas. El maíz es considerado como una planta de día corto por su requerimiento de fotoperíodo. Su tiempo de maduración varía según la variedad y las condiciones ambientales, pero se considera entre 110 y 140 días (30).

La población vegetal dentro de un cultivo varía de ---- 20 000 a 30 000 plantas/Ha en variedades grandes y para obtención de grano, y de 50 000 a 80 000 plantas/Ha en variedades pequeñas y las destinadas a la producción a forraje. Crece --

bien en muchos tipos de suelo excepto en los arcillosos muy pesados y en los arenosos, prefiriendo suelos bien drenados y aireados (30).

El maíz tiene una demanda de fertilidad relativamente alta y la cantidad de fertilizante requerido, puede llegar - en las variedades de alto rendimiento hasta 200 Kg/Ha de N, 50-80Kg/Ha de P y 60-100 Kg/Ha de K. En general, el cultivo puede crecer y sembrarse continuamente, sólo si la fertilidad del suelo es mantenida (30).

La gran cantidad de variedades logradas bajo distintas condiciones ambientales causa que la elección adecuada de ésta dependa el éxito del cultivo.

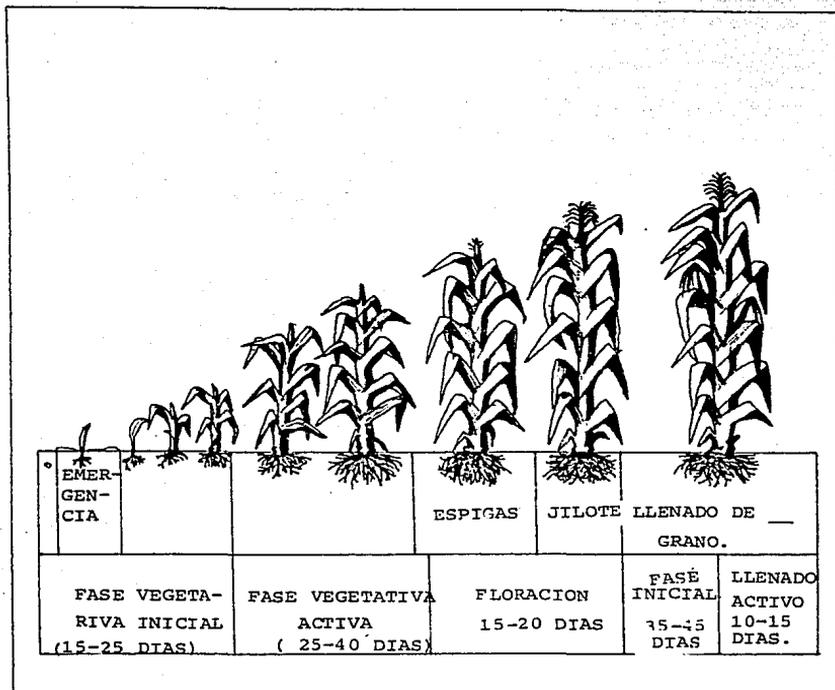
El ciclo de vida del maíz de un modo general y simplificado (Esquema No.2) muestra los distintos períodos de crecimiento en donde el desarrollo vegetativo es el predominante.

El proceso de crecimiento de las plantas de maíz se divide en cuatro fases (86):

I. FASE VEGETATIVA INICIAL: Brotan las hojas y posteriormente se desarrollan en sucesión acrópeta. La producción de materia seca es lenta. Esta fase se termina al iniciarse -- ya sea la diferenciación de los órganos reproductivos o la elongación de los entrenudos o bien ambos casos.

II. FASE VEGETATIVA ACTIVA: Se desarrollan las hojas, el culmo o tallo y el primordio de los órganos reproductivos. Primeramente ocurre un incremento activo de las hojas y -- posteriormente del tallo. Esta fase termina con la emisión de los estigmas.

ESQUEMA No. 2  
 PERIODOS DE CRECIMIENTO  
 DEL MAIZ



III. FASE INICIAL DE LLENADO DE GRANO: El peso de las hojas y del culmo continúa incrementándose a una velocidad menor. continúa el aumento en el peso de las espatas y del raquis y el peso de los granos se incrementa lentamente. Esta puede ser considerada como una fase transitoria entre la etapa vegetativa y la de llenado de grano.

IV. FASE DE LLENADO ACTIVO DE GRANO: Se presenta un rápido incremento en el peso de los granos, que va acompañado de un ligero abatimiento en el peso de las hojas, culmo, espatas y raquis.

El valor alimenticio del maíz es diferente según la variedad de que se trate, sin embargo, en nuestro país se dice que este valor alimenticio es similar en las diferentes variedades. Es rico en carbohidratos y desequilibrado en sus proteínas, vitaminas y minerales, puesto que es deficiente en licina y triptófano, aminoácidos esenciales y deficiente en niacina (una vitamina), comparándolo con el trigo, este lo supera en proteínas, y con el arroz se tiene similitud, aunque el maíz tiene una mayor riqueza vitamínica (18).

#### B. Importancia económica y social del maíz.

A nivel global, el maíz es el tercer cultivo en importancia mundial (30). Este grano se utiliza para la alimentación humana principalmente, aunque es creciente la cantidad que se destina para consumo animal (30).

En México, para la producción de ésta gramínea se utilizaron en 1985; 7'328 882 Ha con una producción total de: ---

TABLA No. 1

## PRODUCCION DE LOS PRINCIPALES PRODUCTOS AGRICOLAS.

EN TONELADAS.

ENTIDAD FEDERATIVA.	AJONJOLI	ARROZ PULIDO	CEBADA EN GRANO	FRIJOL	MAIZ	SORGO EN GRANO.
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS:	92,000	459,156	635,000	1'270,000	13'830,000	6'729,000
AGUASCALIENTES:	----	459,156	----	7,891	75,427	3.09
BAJA CALIFORNIA:	17,235	----	66,462	578	27,102	10,19
BAJA CALIFORNIA S.:	8	----	----	2,444	5,180	13,42
CAMPECHE:	----	91,306	----	619	35,967	40
COAHUILA:	----	----	5,887	5,002	52,335	38.07
COLIMA:	23	14,794	----	167	95,751	3.66
CHIAPAS:	1,017	6,585	----	41,452	1'619,522	5.00
CHIHUAHUA:	----	----	18,441	66,652	368,344	92.93
DISTRITO FEDERAL:	----	----	----	152	26,537	-----
DURANGO:	----	----	1,239	184,371	268,798	41.47
GUANAJUATO:	----	----	52,474	63,423	752,888	1'962,177
GUERRERO:	12,000	6,077	----	6,316	667,299	21,384
HIDALGO:	----	----	197,188	29,753	599,114	-----
JALISCO:	457	11,217	5,677	56,016	2'193,458	1'229,217
ESTADO DE MEXICO:	292	607	57,539	22,487	2'139,340	2,132
MICHOACAN:	9,985	22,839	7,525	19,488	968,328	814,520
MORELOS:	----	27,663	----	4,140	50,404	105,804
NAYARIT:	207	13,576	12	104,580	161,478	65,815
NUEVO LEON:	----	----	2,269	4,297	113,658	113,018
OAXACA:	2,133	2,338	175	9,498	347,992	1,192
PUEBLA:	533	2,575	46,283	21,211	525,389	17,091
QUERETARO:	----	----	15,603	14,016	157,781	117,669
QUINTANA ROO:	----	24,443	----	5,012	29,905	-----
SAN LUIS POTOSI:	----	2,065	6,397	25,673	179,957	33,620
SINALOA:	8,992	163,534	34	145,636	132,427	606,329

SONORA:	38,872	-----	8,401	6,504	98,323	42,419
TABASCO:	-----	27,548	-----	976	77,075	-----
TAMAULIPAS:	241	1,231	1,779	18,804	749,287	1'362,114
TLAXCALA:	-----	-----	136,719	1,971	160,991	-----
VERACRUZ:	5	40,778	367	29,000	730,029	6,869
YUCATAN:	-----	-----	-----	6,578	129,925	-----
ZACATECAS:	-----	-----	4,529	364,087	479,989	19,063

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA GEOGRAFICA  
E INFORMATICA (1985).  
ANUARIO DE ESTADISTICAS ESTATALES 1985.  
INEGI. MEXICO. S.P.P.

SUPERFICIE, PRODUCCION, RENDIMIENTO Y VALOR DE LOS PRINCIPALES PRODUCTOS AGRICOLAS.

ENTIDAD FEDERATIVA.	SUPERFICIE COSECHADA (Ha).	M A I Z. PRODUCCION ( TON. ).	RENDIMIENTO (TON/Ha).	VALOR EN MILES DE - PESOS.
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS:	7'328,882	13'030,763	1.778	267'768,374
AGUASCALIENTES:	92,642	72,204	0.779	1'351,948
BAJA CALIFORNIA:	8,757	26,151	2.986	502,099
BAJA CALIFORNIA S:	2,069	4,959	2.397	95,213
CAMPECHE:	40,825	35,389	0.867	579,469
COAHUILA:	38,824	50,100	1.290	1'002,000
COLIMA:	33,482	91,560	2.735	1'739,640
CHIAPAS:	667,068	550,366	2.324	34'883,235
CHIHUAHUA:	343,156	352,615	1.028	6'770,208
DISTRITO FEDERAL:	12,151	13,505	1.111	310,615
DURANGO:	198,512	255,904	1.289	6'397,600
GUANAJUATO:	406,301	700,326	1.724	13'414,745
GUERRERO:	420,838	594,957	1.414	11'601,662
HIDALGO:	186,131	331,953	1.783	9'958,590
JALISCO:	604,600	2'099,695	2.610	41'615,955
ESTADO DE MEXICO:	703,485	2'055,214	2.921	41'104,280
MICHOACAN:	460,230	921,809	2.003	18'605,793
MORELOS:	49,911	48,252	0.967	1'309,945
NAYARIT:	62,993	154,583	2.454	2'941,405
NUEVO LEON:	54,577	78,310	1.435	1'503,552
OAXACA:	313,931	2'333,132	1.061	6'662,840
PUEBLA:	499,020	502,954	1.008	11'113,272
QUERETARO:	93,860	150,910	1.608	2'938,520
QUINTANA ROO:	40,558	28,728	0.708	574,560
SAN LUIS POTOSI:	144,445	170,655	1.181	3'381,529
SINALOA:	87,514	124,196	1.419	2'483,920

SONORA:	7,430	16,658	2.230	331,360
TABASCO:	34,817	53,751	1.542	1'075,020
TAMALLIPAS:	352,132	724,551	2.109	14'256,979
TLAXCALA:	134,570	154,117	1.145	2'959,046
VERACRUZ:	468,844	731,479	1.650	14'629,580
YUCATAN:	129,658	124,377	0.959	2'383,934
ZACATECAS:	435,521	459,493	1.055	9'189,860

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA GEOGRAFICA E  
INFORMATICA (1985).  
ANUARIO DE ESTADISTICAS ESTATALES 1985. INEGI  
MEXICO. S.P.P.

13'830,000 Ton, con un rendimiento de 1.78 Ton/Ha en promedio, siendo los principales productores Jalisco y el Estado de México (44) (Tabla No. 1).

Pese a que el problema de los alimentos está presente en el mundo entero, son los países en desarrollo los que pasan por una de las crisis más agudas. Este es el caso de México, que a perdido su autosuficiencia en la producción de maíz en los últimos años, por lo que las importaciones han aumentado (1,18). Y a pesar de los esfuerzos por incrementar la producción de granos en el Plan Nacional de Desarrollo 1983-1988, no se ha logrado cubrir las necesidades maiceras con producción nacional, aún cuando se han obtenido cosechas récord en buenos años (90).

En México, la actividad económica que ocupa la mayor superficie territorial con mas de 21 millones de hectáreas (17, 24) y mayor población económicamente activa (44), es la agricultura. Paradójicamente, los trabajadores del campo son los peores remunerados y con mayores problemas de marginación (44).

#### 6. LOCALIZACION DE LA ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio se encuentra localizada aproximadamente a :

100°23' 36''	Longitud Oeste
18°22' 54''	Latitud Norte
528	m.s.n.m.

A una distancia de 1 Km al sureste de la ranchería denominada cuadrilla de López, perteneciente al Pueblo de Palmar Chico, de la jurisdicción del municipio de Amatepec, en el -- Sur del estado de México, cerca de los límites con el estado de Guerrero (83). (Mapa No. 1)

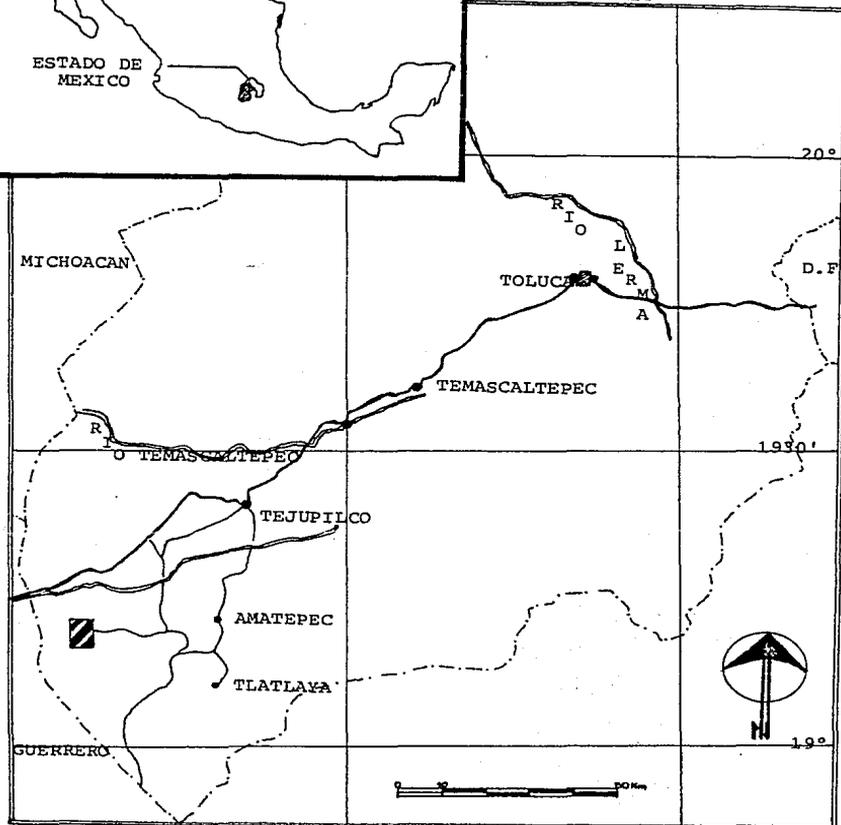
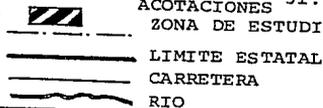
La morfología del lugar se caracteriza por ser muy ondulada de abundantes lomeríos. En ello se practican las dos - principales actividades económicas de la región, la ganadería como actividad de fin comercial y la agricultura de temporal de subsistencia en donde el cultivo principal es el maíz para fines de autoconsumo. La agricultura se practica de manera - tradicional, la opción de explotación con maquinaria es imposible de aplicar debido a las pendientes tan pronunciadas del lugar. La utilización de fertilizantes es esporádica y poco común por su alto costo, así como la aplicación de pesticidas aunque son recomendados por la Comisión de Desarrollo Agrícola y Ganadero del Estado de México (CODAGEM) principalmente los herbicidas. Debido a la siembra en pendiente, para el - mantenimiento de la fertilidad se siembra de año y vez, esto es, el cultivo se realiza cada dos ciclos.

El tipo de suelo predominante en la región es regosol - eútrico somero, que en cultivo de grano produce rendimientos de moderados a bajos (83).

El clima predominante corresponde al caliente subhúmedo con lluvias en verano, clasificado como  $Aw_1(w)(i')g$ , según - la clasificación de Koppen modificada por García, con una -- precipitación promedio de 1200 mm (34).

MAPA No. 1 LOCALIZACION DE LA ZONA DE ESTUDIO EN LA PARTE SUROESTE DEL EDO. DE MEX.

ACOTACIONES 51.  
ZONA DE ESTUDIO



La región es el inicio de la Cuenca del Balsas y a --  
ella pertenece (35). La corriente pluvial más importante  
corresponde al río Bejucos, que es uno de los afluentes del  
Balsas (83).

La vegetación natural del lugar corresponde a la selva  
baja caducifolia de la cual solo quedan algunos remanentes  
(35).

## III. ANTECEDENTES.

(LA ASOCIACION Azospirillum-MAIZ)

La importancia de los microorganismos como conservadores y mejoradores potenciales de la fertilidad del suelo se conoció hasta hace relativamente poco, ya que si bien desde tiempos del imperio Romano se conocía la utilidad de las leguminosas en este aspecto (10), fué a partir de los descubrimientos de Winogradski, a finales del siglo XIX, cuando se demostró la relevancia de los nitro fijadores edáficos para las plantas (73).

Actualmente, el único biofertilizantes que se utiliza como práctica común en algunos lugares es la asociación nitro fijadora simbiótica nodulante Rhizobium, Bradyrhizobium -leguminosa, la cual suministra cantidades significativas de nitrógeno asimilable a la planta (94).

A partir del descubrimiento de la posibilidad de inoculación en gramíneas con Azospirillum se tuvo una fuerte reacción principalmente en países tropicales, como Brasil, hacia la búsqueda del establecimiento de asociaciones de interés - como en el Maíz, Trigo, Sorgo (27), sin embargo los primeros ensayos realizados en la asociación con maíz mostraron resultados contradictorios y muchas veces decepcionantes que hicieron dudar de la viabilidad de la simbiosis con fines prácticos (75,99).

Las pruebas posteriores mostraron mejores resultados - al refinarse las técnicas y avanzar en el estudio de la bac

teria (29,67,71).

Las estimaciones de fijación de nitrógeno en raíces de maíz en algunas ocasiones han llegado a registrarse bajas - sin embargo, se ha visto que aún en éstas condiciones la -- asociación provee un gran beneficio económico, puesto que se reduce el uso de fertilizantes de 10 a 20% lo que produce - ahorros sustanciales desde el punto de vista económico (54).

Además de la fijación biológica de nitrógeno, la asociación provee el efecto de aumentar rendimientos en materia - seca y crecimiento, producto de su actividad secretora hormonal por lo que se agrega un beneficio más de la simbiósis -- (6,89,95). Sin embargo, a pesar de todos estos puntos positivos lo que se ha observado son las variaciones de resul--- tados de sitio a sitio, lo cual hace insegura la viabilidad de la asociación (28,42,67), las causas de este hecho no se han dilucidado con seguridad, pero entre las más importantes se encuentra la dificultad de afinidad entre la cepa de la - bacteria y el genotipo del maíz, que al parecer guardan es-- trecha relación (31), la dificultad citada a tratado de ser salvada por medio de un monitoreo y selección tanto de la - variedad de maíz como de la especie y cepa de la bacteria -- que realice mejores tasas de fijación, por medio de la prueba de reducción de acetileno, llegando a lograrse el estable cimiento exitoso de asociaciones con variedades de maíz que no tenían capacidad asociativa relevante, como es el caso del maíz sembrado en regiones de Estados Unidos (31). A su vez, también las condiciones ambientales que propician el éxito - de la asociación aún están en discusión e investigación (71).

Los resultados de experimentos realizados con fines -- prácticos tienden a probar el importante papel de la bacteria en el rendimiento del cereal, se ha comprobado que la - selección de cepas bacterianas y variedades de maíz logran resultados satisfactorios y sobre todo reducciones económicas importantes, puesto que al complementarse con niveles - bajos de fertilizantes, se logran rendimientos equiparables al uso de fertilización más pesada (6,66). Esto es muy con veniente ya que en algunos países como en la India (84) y - México (70) el costo de inoculación de Azospirillum es mucho menor a la fertilización química.

Obtenida la selección bacteriana y la variedad adecuada el proceso de inoculación no presenta mayores dificultades - y el agricultor no vería afectado el proceso de cultivo no mal puesto que con un soporte adecuado, por ejemplo turba, y un adherente la bacteria se pega a la semilla y se procede a sembrarla (45,57) o se puede agregar a pocos días después de la emergencia del brote, resultando con éxito ambas prá cticas (66).

La aplicación de esta asociación se ha realizado a nivel de invernadero y de campo experimental en países como India (84), Estados Unidos (31), Brasil (71), México (70). En -- Israel (66,67) y México (16) se han logrado llevar estos ensayos a nivel de parcelas comerciales con resultados que -- preven la aplicabilidad pragmática a mediano plazo. Pero -- los intentos son aún insipientes para que se tenga como ino culante comercial y sobre todo a nivel industrial de produc-

ción como en Rhizobium (31). Es por lo tanto necesario -- la dilucidación de todas las variables que afecten la rizocenosis durante el proceso de cultivo (71,96) para que se establezca con mayor seguridad como una práctica agrícola -- común que beneficiaría al trabajador del campo .

En México, se han realizado estudios de la relación - Azospirillum-gramíneas poco tiempo después de redescubierto el microorganismo por Peña Cabriales y Dobereiner en 1974 - (29). Tales trabajos se pueden dividir en: (A) Las investigaciones básicas y (B) aquellos intentos tendientes al establecimiento de la asociación en el agro. Entre los primeros se hallan investigaciones de distribución ecológica (57), caracterización de productos metabólicos como las biocinas -- (57), la determinación de la resistencia a diversos antibióticos de acuerdo a su naturaleza química (81), aspectos de - la genética de Azospirillum (58) y otros tópicos. Por otra parte, los estudios de tipo pragmático abarcan trabajos de viabilidad de inoculantes (40), determinación de infectividad en sorgo, en cultivos de Guanajuato (32), efecto y selección en trigo a nivel invernadero (45), y de maíz en el Valle de Toluca (70), así como la aplicación en campo a nivel piloto de Azospirillum como biofertilizante de maíz en el - ejido de Guadalupe en Veracruz por Caballero y colaboradores (17), el cual constituye uno de los intentos más recientes y amplios de establecimiento de la bacteria como alternativa - de explotación agrícola.

Se tienen proyectos de investigación de la bacteria en

diversas instituciones como el Colegio de Posgraduados - en Chapingo, Ciencias Biológicas del IPN, CINVESTAV de Irapuato, el Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla y otros. Uno de estos proyectos es el referente a aspectos ecológicos y aplicabilidad de Azospirillum en el agro mexicano que se realiza por parte del ---- laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad - de Química de la U.N.A.M. y la CODAGEM y dentro del cual - se circunscribe el presente trabajo como extensión del estudio. Esto se realiza ya que los resultados obtenidos con -- maíz (20,70), indican que esta bacteria tiene aplicabilidad potencial y se hace evidente la necesidad de insertar esta - opción en condiciones ambientales diferentes a las ensayadas y más cercanas a las que se enfrenta el productor y en donde los requerimientos de alternativas de este tipo son mayores porque los experimentos anteriores se han realizado en cam-- pos experimentales continuamente fertilizados y por lo tanto el efecto de la bacteria queda enmascarado.

## IV. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

## (JUSTIFICACION)

El presente estudio contuvo un análisis de los parámetros agronómicos del cultivo que en la literatura respectiva pocas veces ha sido realizado, ya que en su mayoría toman -- factores de rendimiento y contenido de nitrógeno (38,66), o producción de sustancias reguladoras del crecimiento (6), -- además se pudieron comparar los resultados obtenidos con -- aquellos que presentan diversos autores en análisis similares (38,71).

Al ensayar microorganismos provenientes de diferentes lugares que incluyen diversos suelos y climas, se tuvo la -- oportunidad de obtener resultados que indicaran diferencias entre cepas y por lo tanto en infectividad y efectividad, -- además de proporcionar información acerca de la importancia del origen de la cepa, factores que pueden ser partícipes - en la determinación de la afinidad planta-bacteria.

Por otra parte, es evidente la importancia del maíz para la población tanto desde el punto de vista social como - económico. Las condiciones sociales de marginación de la -- mayor parte de los campesinos temporaleros no les permiten cubrir las necesidades más básicas y menos tener acceso a la tecnología de fertilizantes, pesticidas y maquinaria por su alto costo (18), que muchas veces resultan inadecuados para las características del campo mexicano (90). Así, dadas las condiciones críticas del agro de nuestro país, es evidente - la necesidad de opciones viables tanto económica como ecológicamente en los cultivos básicos. Azospirillum y otros organismos PGPR deben ser estudiados en todos los niveles po-

sibles, sobre todo en ensayos que permitan conocer su potencial real en condiciones similares a las que enfrenta el productor. De esta forma, el presente trabajo es útil como -- acercamiento primario a fin de conocer la viabilidad de la -- bacteria como biofertilizante en la región del ensayo, en -- donde la fertilización es necesaria pero muy costosa y el modelo de explotación agrícola moderna no puede funcionar, -- además de proporcionar las bases para posteriores investigaciones en la región.

## V. HIPOTESIS.

Dadas las condiciones climáticas y edáficas de la zona se esperaba la presencia de cepas nativas - que causarían competencia con las cepas inoculadas de las cuales serían más infectivas aquellas cuyo -- origen tuviera condiciones ambientales similares - a la región de ensayo.

Asimismo se esperaba una respuesta variable - entre cepa y cepa según su capacidad de proveer de nitrógeno asimilable a la parte vegetal y/o sustancias reguladoras del crecimiento.

## VI. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL :

Seleccionar a partir de un grupo de cepas de Azospirillum aquella o aquellas sobresalientes en su comportamiento como biofertilizantes en el cultivo de maíz de temporal desarrollado en una región de clima subtropical y suelos de tipo regosol.

OBJETIVOS PARTICULARES :

- .Cuantificar la influencia de la inoculación de la bacteria en el maíz, determinando el porcentaje de infección y su correlación con los parámetros agronómicos.
- .Conocer el efecto de Azospirillum sobre el desarrollo de la planta a través de la cuantificación de las partes aérea y radicular en las diversas etapas de crecimiento.
- .Conocer las cepas o cepa más infectiva a lo largo del desarrollo del maíz.
- .Seleccionar aquellas cepas o cepa efectivas como inoculante del maíz en las condiciones ambientales particulares de la región.
- .Determinar en parcela experimental la utilidad de Azospirillum, como biofertilizante mediante la comparación de tratamientos inoculados y con fertilización económicamente óptima.

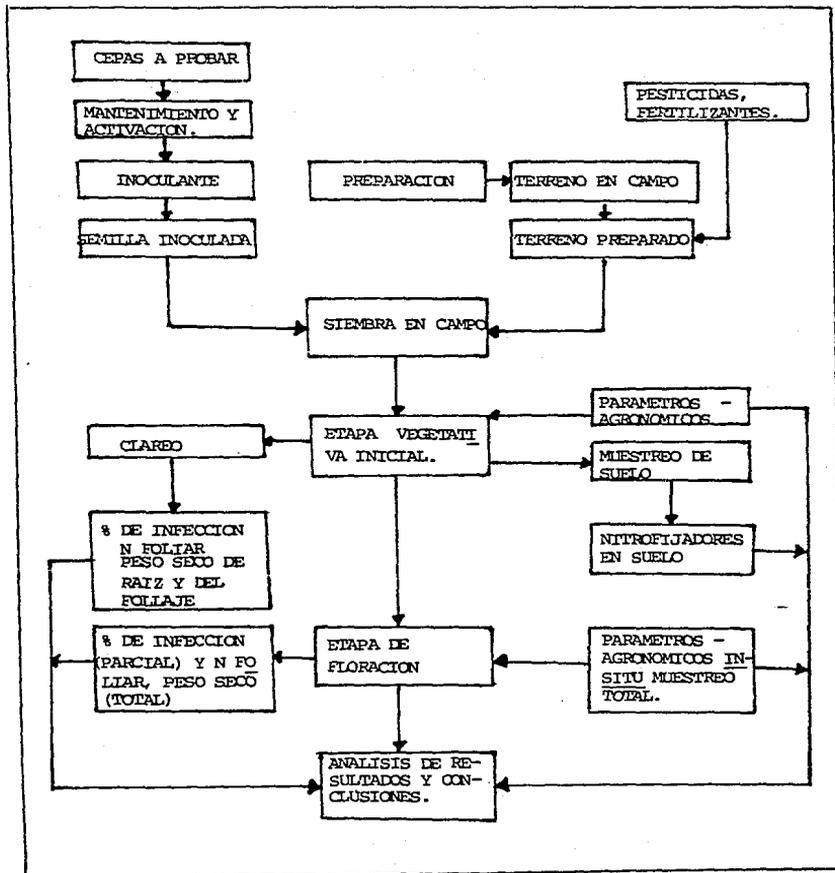
Para cubrir los objetivos trazados en el proyecto, se -- elaboró una metodología que comprendió dos secciones: La primera sección correspondió al trabajo experimental y la segunda al trabajo de gabinete . (Diagrama No.4)

#### 1. TRABAJO EXPERIMENTAL

- A. Mantenimiento, activación y elaboración del inóculo de 47 cepas de Azospirillum spp .
- B. Preparación del terreno, siembra, muestreos y mediciones en campo de parámetros agronómicos a lo largo del desarrollo de la planta en cultivo.
- C. Determinación en laboratorio de los parámetros microbianos como son: Porcentaje de infección, presencia - de nitro fijadores edáficos, determinación de nitrógeno foliar.

Las dos últimas fases se hicieron con la menor diferencia de tiempo posible para evitar que el material sufriera -- alteraciones por exceso de almacenamiento.

Se utilizaron 46 cepas de las cuales 46 fueron aisladas de diversos climas y suelos, por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizado en Toluca. Las cepas cuentan con una identificación preliminar, llegando hasta el nivel de género, de acuerdo a los criterios de Tarrand et al (88), la otra cepa correspondió a la denominada VT1, perteneciente al cepario de la Facultad de Química de la U.N.A.M., --



la cual ha sido identificada como A. brasilense, ensayada en maíz en una zona templada (70) aislada e identificada por el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la U.N.A.M.. En el mapa No. 2, se ilustra la localización del origen de cada una de las cepas ensayadas, las cuales fueron aisladas de raíz y suelos de cultivos cereales del Estado de México. Este grupo de cepas abarcan diversas regiones fisiográficas del Estado, así como diferentes -- suelos y climas (Tabla No. 3).

#### A. Mantenimiento, activación y elaboración del inóculo

Las bacterias se mantuvieron en el medio NFb que es el óptimo para el microorganismo (49).

A los cultivos iniciales se les verificó su pureza, mediante observaciones en fresco, dependiendo de sus características típicas como son: movilidad, forma y tamaño (88) para evitar manejar cultivos contaminados y así constituir el "stock" del experimento.

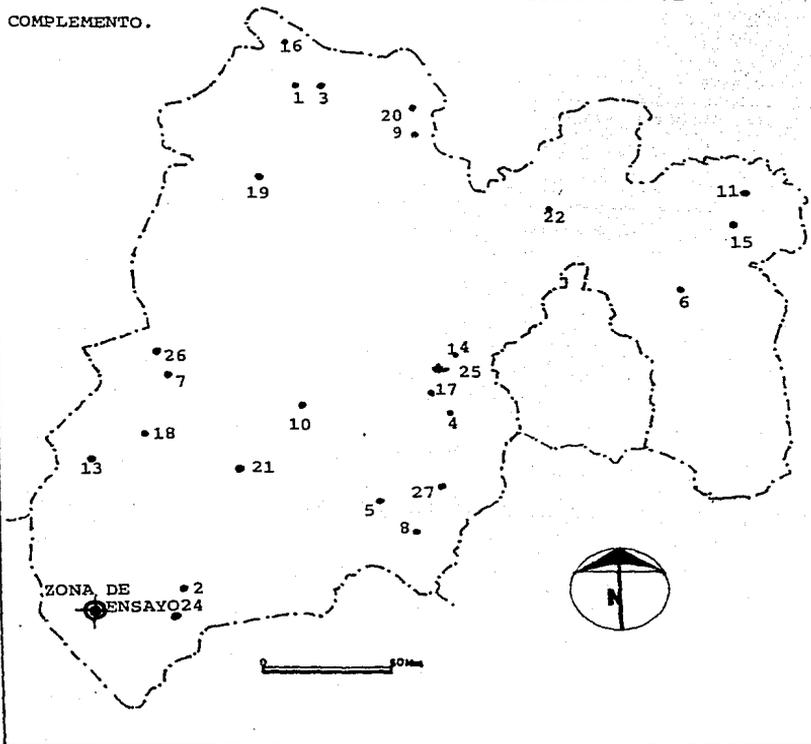
La activación de las cepas se efectuó resemebrando los "stock" en medio NFb semigelificado (Anexo No.1), sucesivamente durante tres días cada 18 horas (45), incubando a 28°C (40). La activación del inóculo se realizó con la metodología que ha demostrado ser la óptima, sembrando la bacteria en medio NFb líquido, creciendola hasta una concentración de  $1 \times 10^9$  células/mililitro, para mezclarla con turba como soporte e inoculando la semilla por adición de goma arábiga, -

LOCALIZACION DEL ORIGEN DE LAS CEPA

ENSAYADAS EN CAMPO

(Ver indicaciones)

LOS NUMEROS CORRESPONDEN A LOS ORIGENES INDICADOS EN EL COMPLEMENTO.



MAPA NO. 2. INDICACIONES

66.

COMPLEMENTARIAS .

EL AISLAMIENTO FUE EFECTUADO A PARTIR DE RAICES Y SUELOS DE CULTIVOS CEREALEROS DE DIVERSAS PARTES DEL ESTADO DE MEXICO .

<u>NO.</u>	<u>MUNICIPIO</u>	<u>CEPAS</u>
1.-	Aculco	2,3
2.-	Amatepec	44,45
3.-	Arroyo Sarco	14
4.-	Calimaya	6,7,8,9
5.-	Coatepec Harinas	36
6.-	Chiconcuac	25
7.-	Donato Guerra	46,47,48
8.-	Ixtapan de la Sal	10,11,12,13
9.-	Jilotepec	24
10.-	La Peñuela	39
11.-	Nopaltepec	15
12.-	Otolotepec	1
13.-	Otzoloapan	34,35
14.-	Otzolotepec	35,36
15.-	Otumba	16,17
16.-	Polotitlan	38
17.-	San Buena Ventura	4,5
18.-	Santa Teresa Rilospa	26
19.-	San Lorenzo Tlacotepec	28,29,30,31
20.-	Soyaniquilpan	19,20
21.-	Temascaltepec	40,41
22.-	Tepetzotlán	23
23.-	Tierras Blancas	37
24.-	Tlatlaya	42,43
25.-	Toluca	27
26.-	Villa de Allende	32,33
27.-	Villa Guerrero	21,22

T A B L A No. 3

CARACTERISTICAS DE LAS LOCALIDADES DE ORIGEN DE LAS CEPAS ENSAYADAS.

NORTE DEL ESTADO.

ACULCO:	SUBPROVINCIA	SUELOS:	Regosol, Feozem,
ARROYO ZARCO:	LOS LLANOS Y		Planosol, con pen-
POLOTITLAN:	SIERRAS DE QUE-	CLIMA:	dientes.
SOYANIQUILPAN:	RETARO E HIDAL-		Templado subhúmedo
JILOTEPEC:	GO.		con lluvias en vera-
SAN LORENZO		VEGETACION :	no.
TLACOTEPEC:			Pastizal inducido,
			matorral, agricultura
			ra de temporal.

CENTRO DEL ESTADO .

CALIMAYA:	SUBPROVINCIA	SUELOS:	Feozem y Vertisol
OTZOLOTEPEC:	DE LAGOS Y	CLIMA:	Templado.
SAN BUENA VENTURA:	VOLCANES DEL	VEGETACION :	Agricultura de tem-
LA PENUELA:	ANAHUAC		poral.
TOLUCA:			

SUR DEL ESTADO

COATEPEC HARINAS	SUBPROVINCIA	SUELOS:	Vertisol, Feozem --
VILLA GUERRERO	SIERRAS Y VALLES		Lluvisol.
IXTAPAN DE LA SAL	GUERRERENSES.	VEGETACION :	Selva baja caducifolia.

OESTE DEL ESTADO.

VILLA DE ALLENDE:	SUBPROVINCIA.	SUELOS:	Lomeríos y colinas
DONATO GUERRA			Andosol, Acrisol, Feozem.
SANTA TERESA RILOSPA		CLIMA:	Cálido y templado.
OTZOLOAPAN		VEGETACION:	Bosque de Pino-encino (suelos ácidos que fijan P).
TEMASCALTEPEC			

ESTE DEL ESTADO.

NOPALTEPEC:  
 OTUMBA:  
 CHICONCUAC:

SUBPROVINCIA.  
 DE LAGOS Y VOLCA  
 NES DEL ANAHUAC.

SUELOS: Feozem, Lluvisol.

SUROESTE DEL ESTADO.

AMATEPEC:  
 TLATLAYA:

SUBPROVINCIA DE  
 LA DEPRESION DEL  
 BALSAS.

SUELOS: Regosol.  
 VEGETACION: Selva baja ca-  
 ducifolia

DISTRITO FEDERAL.

TEPOTZOTLAN:

SUELOS: Vertisol.

(I.N.E.G.I., 1981).

como adherente (70,76).

## B. Trabajo de campo.

### i. Preparación del Terreno.

El barbecho, la cruz y el surcado se realizaron con -- yunta y arado, las escardas y el clareo se realizaron manualmente y en las fechas propicias, de acuerdo a la forma utilizada comúnmente en la zona .

Las características adoptadas para la siembra, así como sus dosis de fertilización y de pesticidas se describen en - la tabla No.4.

La cantidad de nitrógeno adicionado a los tratamientos inoculados al inicio de los cultivos se realizó con la finalidad de facilitar el desarrollo del brote y de la infección (77). Ya que se ha comprobado una mayor efectividad de la - rizocenosis en presencia de fertilizaciones medias nitrogenadas (71).

### ii. Parámetros agronómicos.

Se realizaron dos muestreos, uno en la etapa vegetativa y el segundo en la floración. El sitio se muestra en el mapa No.3. Los muestreos se realizaron a los treinta y setenta días después de la siembra, de ésta forma se tuvo un enfoque global de la respuesta del cultivo a la inoculación a lo largo de su desarrollo.

Los parámetros morfológicos vegetativos (69) medidos fueron: (a) altura de la pla a, (b) diámetro de la corona, (c) área foliar por el método de largo y ancho máximo de las hojas --

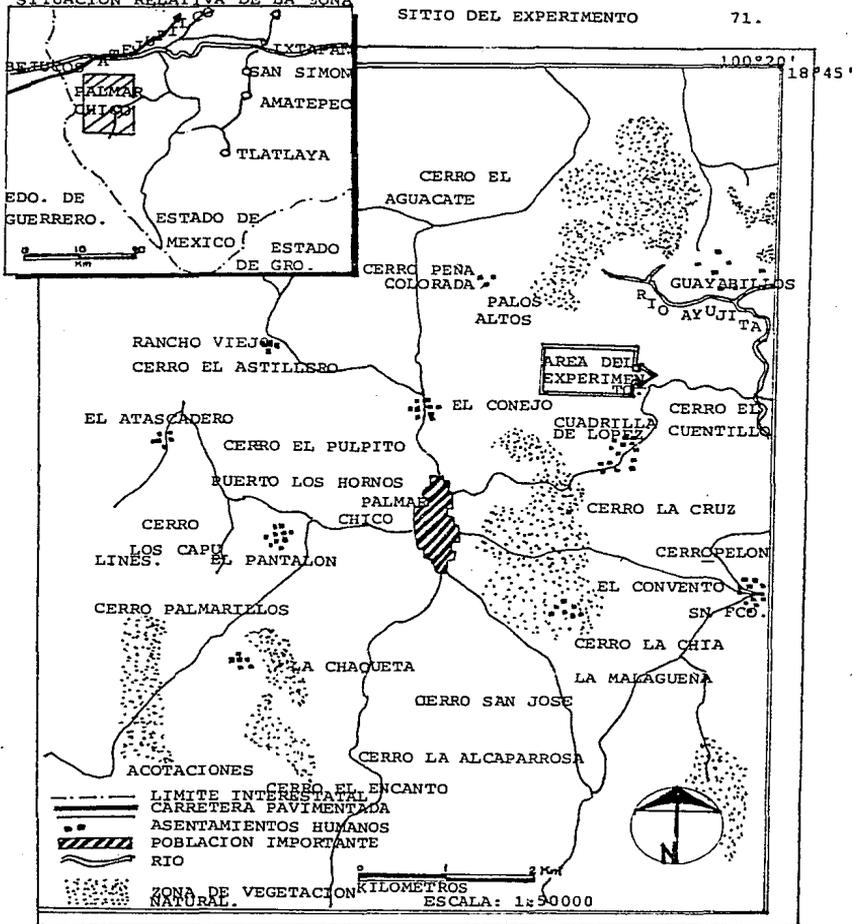
CARACTERISTICAS AGRONOMICAS DEL EXPERIMENTO  
EN CAMPO

SIEMBRA:	Primera quincena de Junio de 1986.
DENSIDAD:	50 000 plantas/Ha.
MAIZ UTILIZADO:	"Maracay" (C.I.M.M.Y.T.) recomendado por C.O.D.A.G.E.M.
PESTICIDAS:	Gesaprim 80, 2Kg/Ha y Paraquat 2L/Ha (herbicidas) en aplicación preemergente.
TESTIGOS:	
ABSOLUTO (A)	Siembra normal de maiz no inoculado, sin adición de fertilizante.
POSITIVO (P)	Siembra normal de maiz no inoculado con aplicación preemergente de dosis económicamente óptima (CODAGEM) 120:60:30 NPK.
DE REFERENCIA (R)	Siembra normal de maiz no inoculado con aplicación preemergente de dosis reducida de fertilización nitrogenada 30:60:30.
TRATAMIENTOS:	46 tratamientos con siembra normal de maiz inoculado con cepa de prueba y fertilización reducida en N: 30:60:30.
TAMAÑO DE LA PARCELA	4 surcos X 6 m de largo con 2 surcos centrales tratados. Distancia intermata 80cm
MODELO ESTADISTICO	Latice simple 7 X 7 con dos repeticiones.
AREA TOTAL OCUPADA	1/2 Ha. aproximadamente.

SITUACION RELATIVA DE LA ZONA

SITIO DEL EXPERIMENTO

71.



(59), (d) Número de hojas, incluyendo la hoja envainante. Es tas mediciones se realizaron in situ, de esta forma no se -- afectó al cultivo en su desarrollo normal. En el primero y segundo muestreos se tomaron 15 tratamientos, incluyendo a -- los testigos (ver diagrama No.5). De cada lote se tomaron - 10 plantas localizadas en el centro de cada surco tratado a fin de evitar en lo posible efectos de los tratamientos late -- rales.

En la floración se realizó un muestreo total midiendose in situ la altura y se obtuvo la hoja bandera de cinco plantas de cada tratamiento, a fin de medir su área y peso seco. En el clareo (30 días después de la siembra) en plena etapa vegetativa inicial, las plantas extraídas sirvieron para medir el área, largo y peso seco de la raíz, así como el peso seco del follaje. El material obtenido se guardó en bolsas de plástico y se transportó y midió en el menor tiempo posible a fin de evitar el maltrato del material y posibilitar -- el uso de las raíces extraídas para obtener el porcentaje de infección de la bacteria.

### iii. Determinación de los Parámetros microbiológicos.

Los parámetros microbiológicos que se determinaron fueron: (a) Porcentaje de infección, (b) Presencia de nitrofixadores edáficos y (c) Determinación de nitrógeno foliar.

El porcentaje de infección se midió, conforme a Flores - (32) y Jiménez (45), por medio de la siembra en medio NFb -- semigelificado de segmentos de raíces de un centímetro de --

largo en tubo de ensaye, observándose al microscopio (en --- fresco y Gram) en la primera y segunda resiembra, la presencia o ausencia de Azospirillum .

Se muestreó suelo de la región (capa arable) en zonas - aledañas al cultivo, parte de esta muestra fue sembrada en - 10 tubos con medio NFB semisólido a fin de permitir el crecimiento de microorganismos microaerofílicos y nitro fijado-- res, los tubos con presencia de película de crecimiento se - resembraron dos veces y aquellos de la última resiembra se - observaron al microscopio en fresco y Gram, buscando morfología y movilidad típica del microorganismo (49). En caso positivo se asumió la presencia de microorganismos nitro fijado res microaerofílicos semejantes a Azospirillum.

La determinación de nitrógeno foliar se realizó por microKjedahl de acuerdo con Mitchell (62), a partir de muestras clareadas y secadas a 70°C durante 48 horas y de hojas bandera de plantas de todos los lotes con el mismo pretratado, éstas muestras fueron pulverizadas en un molino Wiley antes de realizar la digestión. La curva patrón se realizó conforme a la literatura (62), obteniéndose una recta de ajuste con un - coeficiente de correlación de 0.0999. Los resultados se extrapolaron de acuerdo al peso seco de la parte muestreada y representan la proporción de nitrógeno del peso seco del follaje.

## 2. TRABAJO DE GABINETE

Las mediciones realizadas en los muestreos parciales de los lotes señalados en el diagrama No. 5 se les obtuvo la media, desviación estándar y varianza a fin de realizar un análisis de medias poblacionales utilizando como estadígrafo una *t* de student y así determinar grupos significativamente iguales que reflejaran las tendencias del efecto de la inoculación.

El modelo estadístico elegido, *latice*, se utilizó en el análisis de los parámetros en el muestreo total, con este modelo y bajo sus restricciones y alcances se manejaron los resultados y se calculó el error probable, así como las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y los testigos. El análisis de varianza y de Duncan se realizaron como lo indican Cochran y Cox (19), utilizandose una computadora Sigma Commodore No. 32, con un programa elaborado de acuerdo con éstos autores, éste programa fué revisado por el Personal del I.I.M.A.S. de la U.N.A.M. .

Los resultados obtenidos se discutieron de acuerdo a la literatura disponible para así inferir las conclusiones del presente trabajo.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSION.

## 1. PORCENTAJE DE INFECCION

El porcentaje de infecciones uno de los parámetros más importantes en la evaluación de un inoculante, puesto que indica la presencia del microorganismo que se introdujo al cultivo. Sin embargo, ya que Azospirillum no es nodulante es muy difícil asumir si la bacteria ha establecido la simbiosis con la planta (71), por lo que el porcentaje de infección solo indica el grado de colonización en la parte de la planta muestreada, ya sea rizosfera o interior de la raíz y así la infectividad, entendida como la cantidad de microorganismos que entran en relación con la parte vegetal no puede ser asumida (74). Empero, éste parámetro resulta de utilidad para inferir sobrevivencia en el medio y competitividad indicativos importantes de la infectividad.

La tabla No. 5 muestra los valores obtenidos del primer y segundo muestreo de quince lotes de la primera repetición (Ver Diagrama No.- 5). Los porcentajes de infección de los lotes muestreados, en su mayoría van del 55 al 100 % que son valores relativamente altos con respecto a los encontrados en zona templada en ensayos similares (70). Sin embargo, la región de ensayo, presenta características de zona tropical y en éste tipo de regiones la bacteria tiende a ser más abundante (10,64,96,98).

La presencia de un alto porcentaje de infección en los

PORCENTAJE DE INFECCION  
(SUPERFICIE DE LA RAIZ DESINFECTADA)

L O T E S	M U E S T R E O		ORIGEN DE LA CEPA
	PRIMERO	SEGUNDO	
T(+)	77	100	PROBABLES AUTOCTONAS
T(-)	-	100	"
11	-	66	SAN LORENZO TLACOTEPEC
22	77	33	SOYANIKUILPAN
33	100	44	SAN LORENZO TLACOTEPEC
44	55	66	TLATLAYA
55	55	77	DONATO GUERRA
66	66	100	DONATO GUERRA
77	88	88	SAN LORENZO TLACOTEPEC
27	77	77	TOLUCA
26	88	77	OTZOLOAPAN
35	88	88	AMATEPEC
53	88	100	VILLA DE ALLENDE
62	66	100	SAN BUENA VENTURA
61	100	-	IXTAPAN DE LA SAL.

SE MUESTRAN EN % DE PLANTAS MUESTREADAS .

CRITERIOS: Segunda resiembra en Nfb con película típica morfología, movimiento y tamaño en observación al microscopio positivo. Prueba de Gram(-).

- NO SE OBTUVIERON DATOS.

UBICACION DE LAS CEPAS EN EL EXPERIMENTO EN CAMPO.

PRIMERA REPETI CION.	29 (11)	8	22	1	15	36	43	PARTE SUPE- RIOR DE LA LADERA
	13	20 (23)	6	48	41	(26) 34	(27) 27	
	38	24 T(-)	31 (33)	3	45 (35)	17	10	
	28	21	49 t(+)	42 (44)	7	35	14	
	18 T(R)	39	32 (53)	11	46 (55)	25	4	
	12 (61)	5 (62)	33	26	19	47 (66)	40	
	2	23	16	9	37	44	30 (77)	
	22	27	24 m	23	26	28	25	
SEGUN- DA REPETI CION.	31	34	35	32	30	33	29	PARTE INFERIOR DE LA LADERA.
	44	47	46	43	49	48	45	
	10	11	8	14	13	9	12	
	37	39	36	41	42	40	38	
	1	4	2	6	5	7	3	
	18	16	15	21	28	17	19	

( ) Indican los lotes muestreados de manera parcial y la nomenclatura usada para su análisis.

testigos en el segundo muestreo, indican la posibilidad de condiciones de competencia con las cepas inoculadas. La observación del movimiento, y morfología y crecimiento en NFB de las cepas aisladas de los diferentes tratamientos corroboraron la presencia de Azospirillum nativo con características diferentes (bacilos más cortos y de menor grosor) -- a las cepas introducidas. En tanto que las características microscópicas del microorganismo aislados de los tratamientos inoculados fueron constantes, por lo que se asume que -- los porcentajes de infección obtenidos de los lotes inoculados indican el grado de éxito competitivo con respecto a cepas autóctonas o al menos, nitro fijadores presentes en suelo y rizosfera, que frecuentemente compiten por sitios en la -- raíz con los Azospirilla (71). Esta observación reviste -- particular importancia ya que el éxito competitivo de la bacteria ha sido tomado como uno de los factores que determinan el establecimiento de la asociación y por lo tanto la efectividad de los ensayos (7).

A su vez, si se observan los valores alcanzados por los distintos lotes y el origen de la cepa correspondiente no -- hay evidencia de relación entre ambos datos, puesto que cepas de origen similar a la región de ensayo, Tlatlaya por ejemplo o muy diferentes como Tlacotepec, alcanzan valores altos (66 y 88% respectivamente). Lo anterior sugiere que no hay relación entre el origen de la cepa y la capacidad de colonizar la rizosfera del maíz compitiendo con organismos autóctonos. Lo que rechaza parte de la hipótesis inicial ya citada. De --

esta forma la capacidad de colonización de la rizosfera del - maíz, en éste caso parece estar gobernada por otras caracte- rísticas ajenas al origen de la cepa.

Con respecto a la sobrevivencia de las diferentes cepas a través del tiempo (muestreos 1 y 2) se observa que la mayo- ría de los lotes conservan, en algunos casos aumentando su por- centaje de infección, lo que indica la capacidad de persisten- cia de la bacteria en la rizosfera al menos hasta la flora- - - ción (último muestreo). Las excepciones las constituyen dos lotes (33 y 22) que declinan su sobrevivencia con el tiempo.

El comportamiento anterior coincide con algunos estudios en trigo en donde los Azospirilla se mantienen o aumentan en el estadio reproductivo de la planta en la rizosfera (13), - aunque esta capacidad propia de cada cepa se ha reportado co- mo un problema en la implementación de la bacteria en campo - ya que muchas veces es corta su permanencia en la planta --- (71).

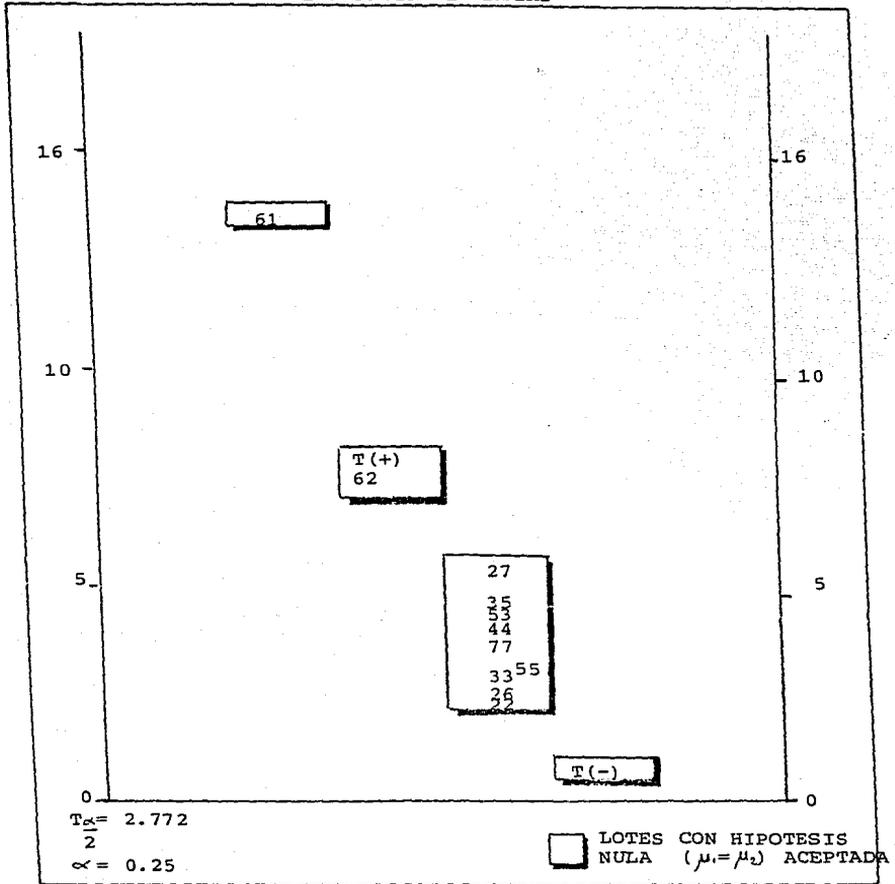
## 2. PARAMETROS AGRONOMICOS. MUESTREOS PARCIALES

En las gráficas Nos. 1 al 10, se muestran los datos obte- nidos en los muestreos 1 y 2 de quince tratamientos (diagra- ma No. 5). Estos resultados se discuten en forma particular y después en general a fin de mostrar su utilidad en la deter- minación de los efectos de la inoculación en el desarrollo de la planta.

## A. Determinaciones en la raíz

A las raíces de las plantas clareadas se les analizó: Largo promedio, área de la raíz, raíz más larga y peso seco de la misma, los tres primeros parámetros mostraron variaciones sin relación con la inoculación, probablemente debido a la destrucción del sistema radicular en el proceso de obtención de la planta por la pedregosidad del suelo, sin embargo, se debe señalar que en mijo y pasto guinea el largo promedio, es afectado negativamente (89), lo que no se observó en éste caso. Por otra parte, el peso seco de la raíz (Gráfica No.1) es afectado positivamente por la inoculación, ya que la mayoría de los lotes muestreados tienen valores mayores al testigo negativo (T(-)) y existen sobresalientes que se acercan al testigo positivo (T(+)) como 62 y aún lo sobrepasan como 61. Aunque esto no sucede en mijo (89) la misma tendencia ha sido observada en otros hospederos donde se atribuye este efecto a la secreción de sustancias reguladoras del crecimiento -- (SRC) por parte de Azospirillum (41), ya que tales sustancias causarían un aumento en el número de raíces secundarias y pelos radiculares (23), lo que se ha observado en la inoculación de la bacteria en maíz (71). Este hecho reviste -- particular importancia ya que al aumentar la superficie radicular de exposición, posibilita un mejoramiento en la absorción de nutrimentos y agua y por lo tanto un beneficio general a la planta (6,41).

PESO SECO DE LA RAIZ  
PRIMER MUESTREO  
DIFERENCIA DE MEDIAS



### B. Número de hojas

Las gráficas Nos. 2 y 3 muestran el desarrollo del número de hojas en los lotes medidos. Se observa la tendencia general de los inoculados a agruparse entre los testigos en ambos muestreos existiendo sobresalientes alrededor de T -- (positivo). El efecto de la mayoría de las cepas es moderado y nulo en algunos casos en el segundo muestreo (Gráfica No. 3). Sin embargo, se observa el mantenimiento o mejoría del efecto a la floración. La importancia de éste parámetro radica en que es un determinante del área de exposición fotosintética, pero en éste caso no se observa una influencia -- uniforme o sobresaliente de la inoculación de Azospirillum.

### C. Area Foliar..

De acuerdo a los datos de las gráficas 4 y 5 el área foliar es influenciada evidentemente por la inoculación. Al igual que en el número de hojas se tiene una agrupación de la mayor parte de los lotes entre los testigos y la presencia de sobresalientes, estas tendencias se observan con mayores diferencias en el segundo muestreo (Gráfica No. 5). Lo que coincide con algunas observaciones que señalan el aumento del beneficio en los estadios reproductivos (13,71). A su vez, de acuerdo a otros informes el área foliar es uno de los parámetros más extensamente afectados por la inoculación en maíz (39) lo que coincide con lo observado. La importancia de és-

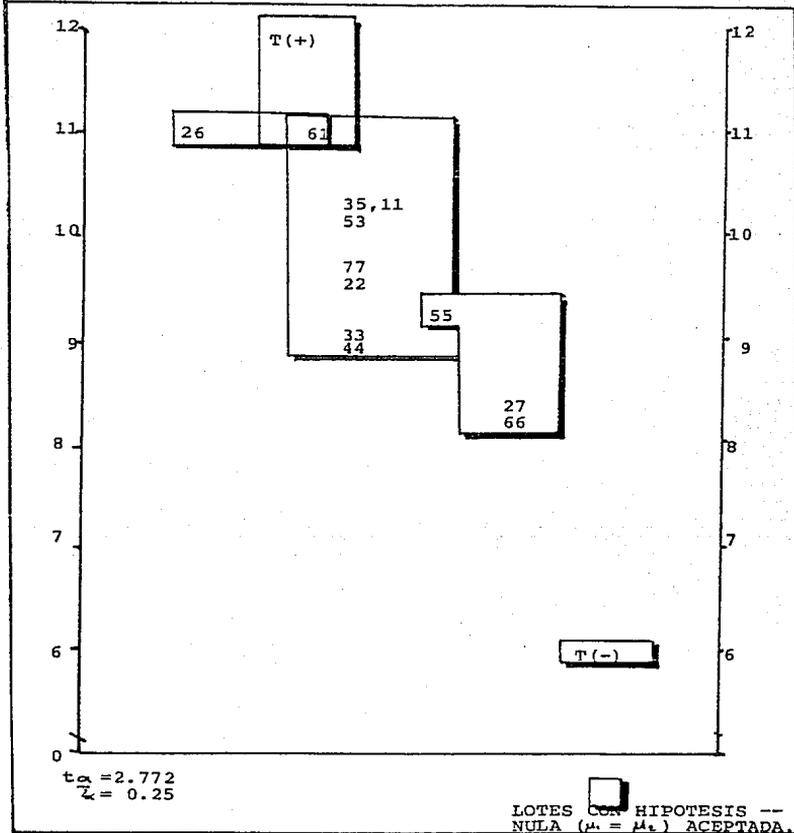
GRAFICA No. 2

83.

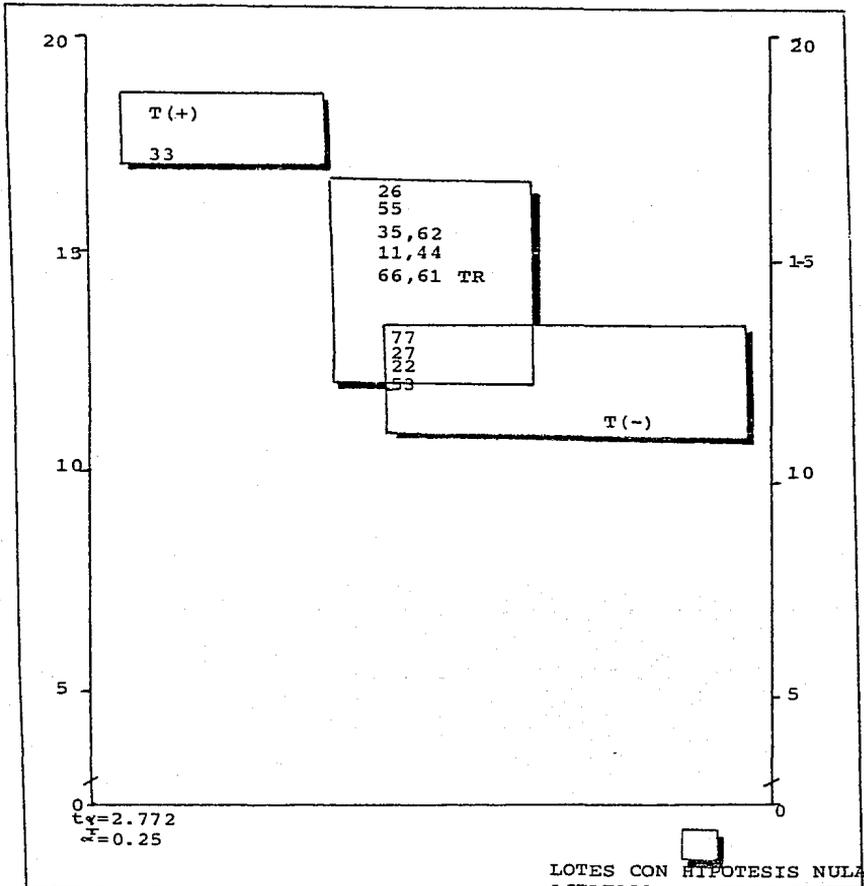
NUMERO DE HOJAS

PRIMER MUESTREO

DIFERENCIA DE MEDIAS



NUMERO DE HOJAS  
SEGUNDO MUESTREO  
DIFERENCIA DE MEDIAS



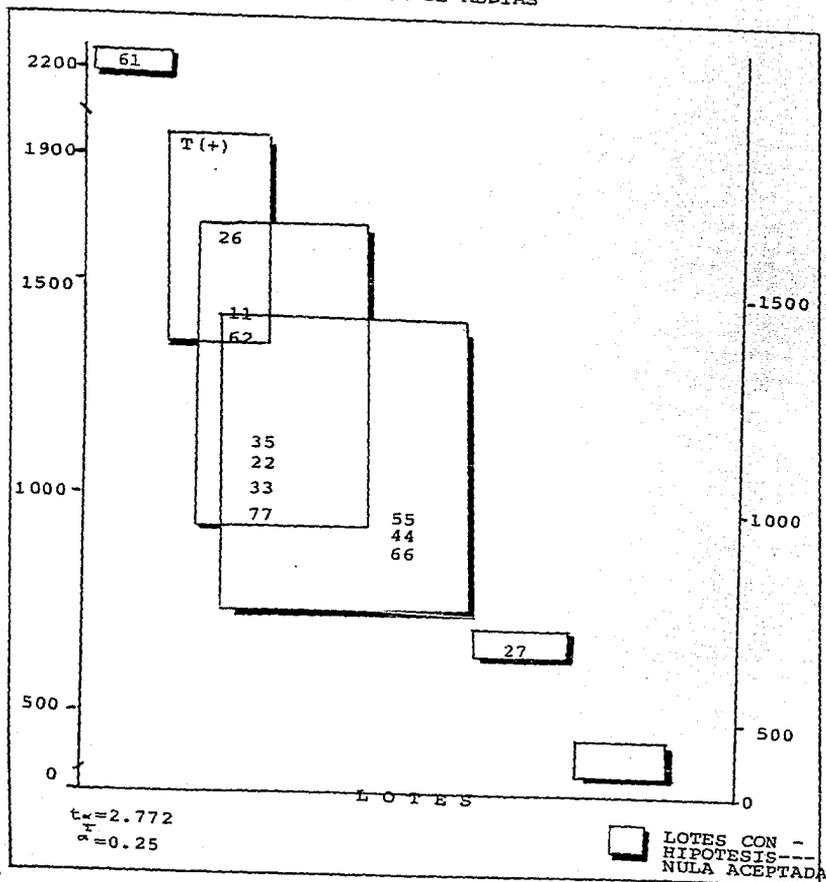
GRAFICA No. 4

85.

AREA FOLIAR

PRIMER MUESTREO

DIFERENCIA DE MEDIAS



te beneficio es evidente, ya que del área foliar depende el rendimiento en paja del maíz (3). Un aumento en el área foliar puede ser causado por el mejoramiento en la nutrición nitrogenada, si va acompañado de una mayor cantidad de nitrógeno foliar (51) o por la producción de SRC (71), de ésta -- forma el área foliar no puede aportar información acerca de la naturaleza del efecto bacteriano si se analiza en forma -- aislada.

#### D. Peso seco del Follaje.

Componente determinante del rendimiento en paja, al -- igual que el área foliar (3), éste parámetro muestra su comportamiento en la gráfica No. 6 de las plantas muestreadas en el clareo. Las mismas tendencias generales observadas -- en el área foliar se tienen en el peso seco, lo que indica -- un crecimiento activo en esta parte de la planta. En mijo -- y pasto guinea este fenómeno benéfico se ha atribuido a la -- producción de SRC (89) y en la mayoría de los casos de ensayos en maíz y otras plantas, el aumento en el peso seco del follaje ha sido uno de los efectos más evidentes (6,13,21,39, 66,71).

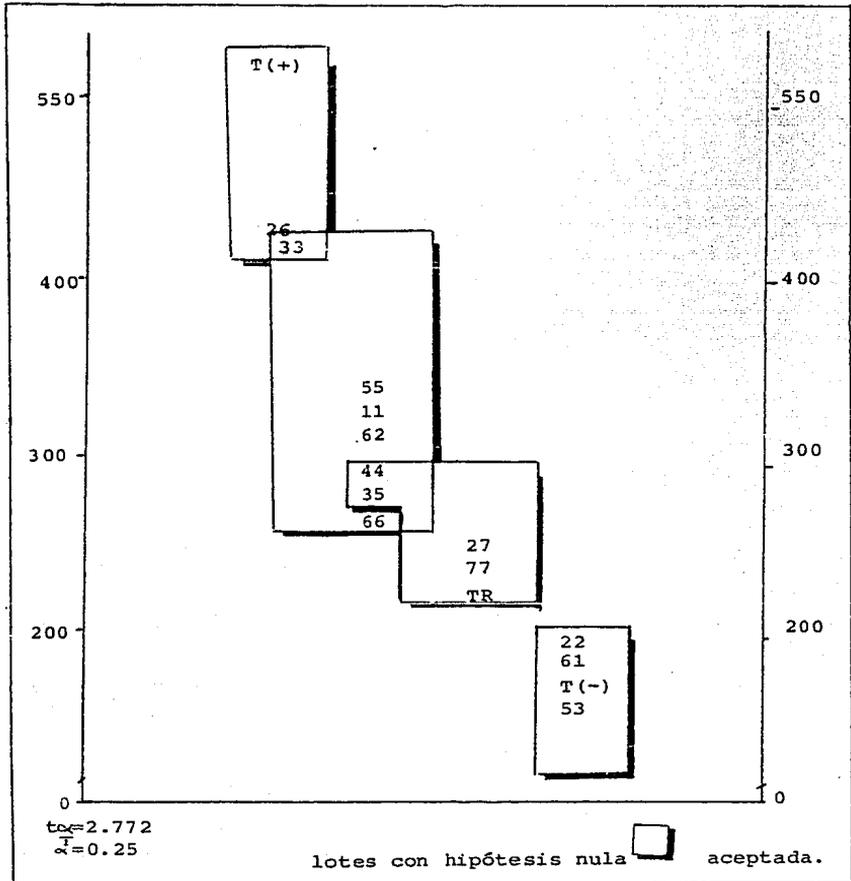
#### E. Diámetro de la Corona

Uno de los parámetros más interesantes es el diámetro -- de la corona ya que es un indicativo primario del vigor de la

AREA FOLIAR

SEGUNDO MUESTREO

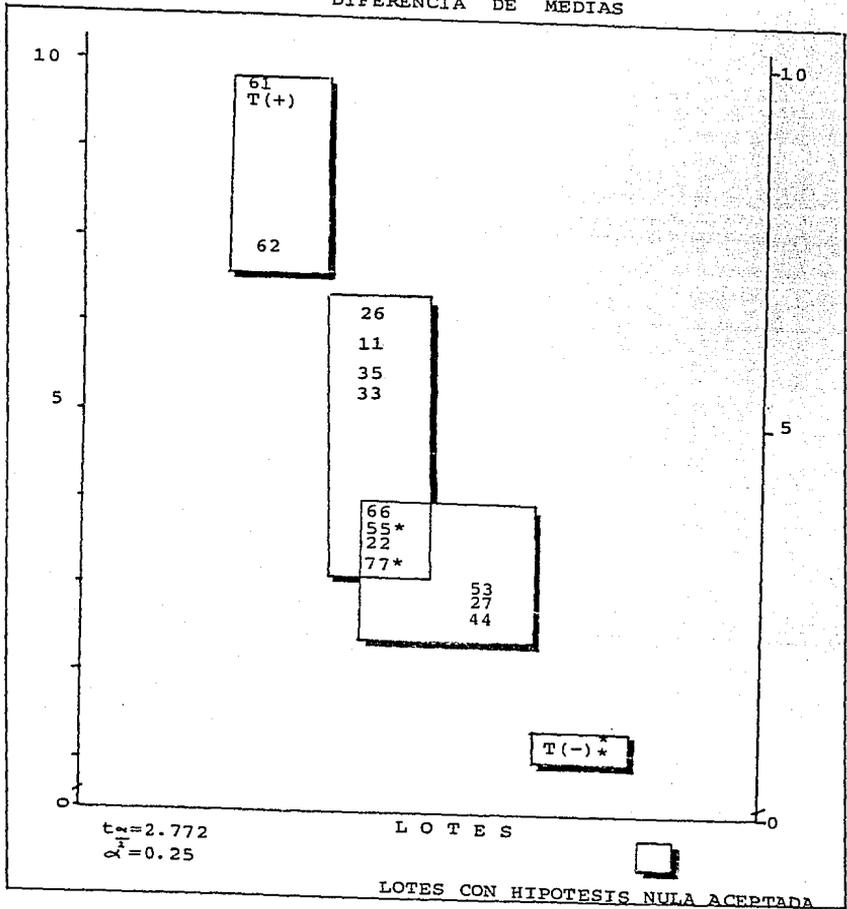
DIFERENCIA DE MEDIAS



PESO SECO DEL FOLLAJE

PRIMER MUESTREO

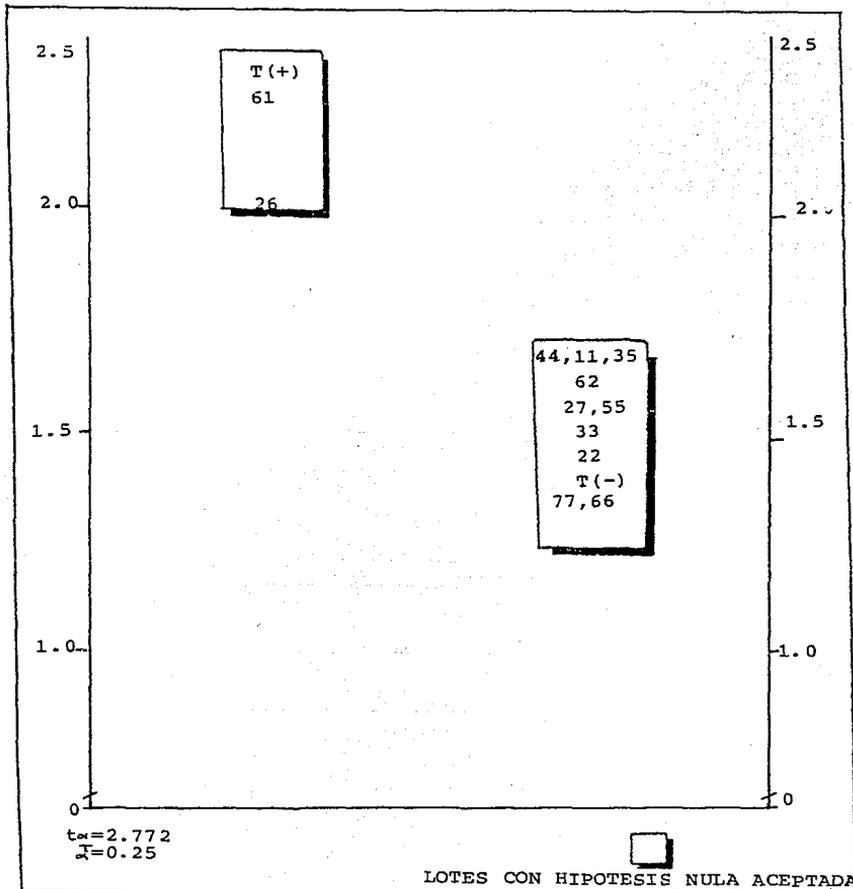
DIFERENCIA DE MEDIAS



DIAMETRO DE LA CORONA

PRIMER MUESTREO

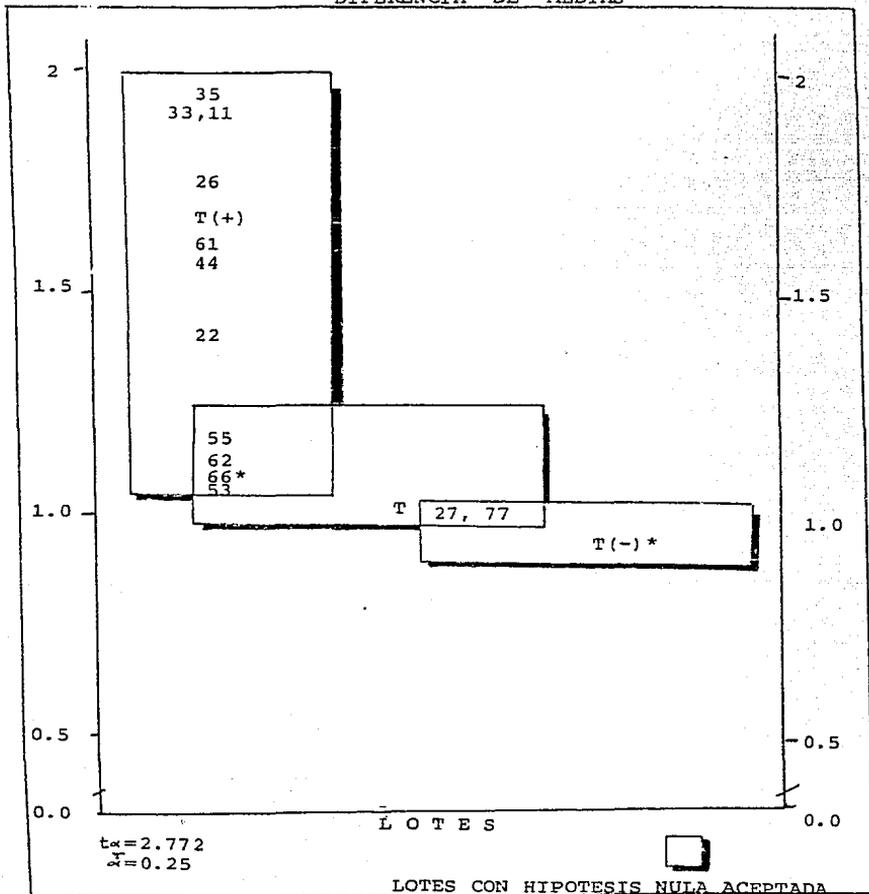
DIFERENCIA DE MEDIAS



DIAMETRO DE LA CORONA

SEGUNDO MUESTREO

DIFERENCIA DE MEDIAS



planta y determina la capacidad de resistencia al acame entre otras cosas. En las gráficas Nos. 7 y 8 se observa el efecto de la inoculación, que en su forma general es similar a los parámetros ya analizados, sin embargo es importante señalar que en la floración (gráfica No.8) hay un agrupamiento más numeroso alrededor del testigo positivo, lo que indica un aumento del efecto benéfico en esta etapa de crecimiento de la planta, lo que coincide con investigaciones previas ya señaladas.

La presencia de un efecto de la inoculación en el diámetro de la corona es un indicativo de la producción de SRC, - ya que en maíz se logró imitar tal efecto por medio de la adición de proporciones determinadas de fitohormonas (46).

#### F. Altura.

Las gráficas Nos. 9 y 10 muestran el comportamiento de la altura en los diferentes tratamientos, como se observa, - al igual que en el número de hojas el efecto es moderado y en algunos casos nulo, existiendo muy pocos sobresalientes.

La altura es un indicativo del mejoramiento de la nutrición nitrogenada (51), sin embargo no parece existir en este ensayo efectos sobresalientes en altura.

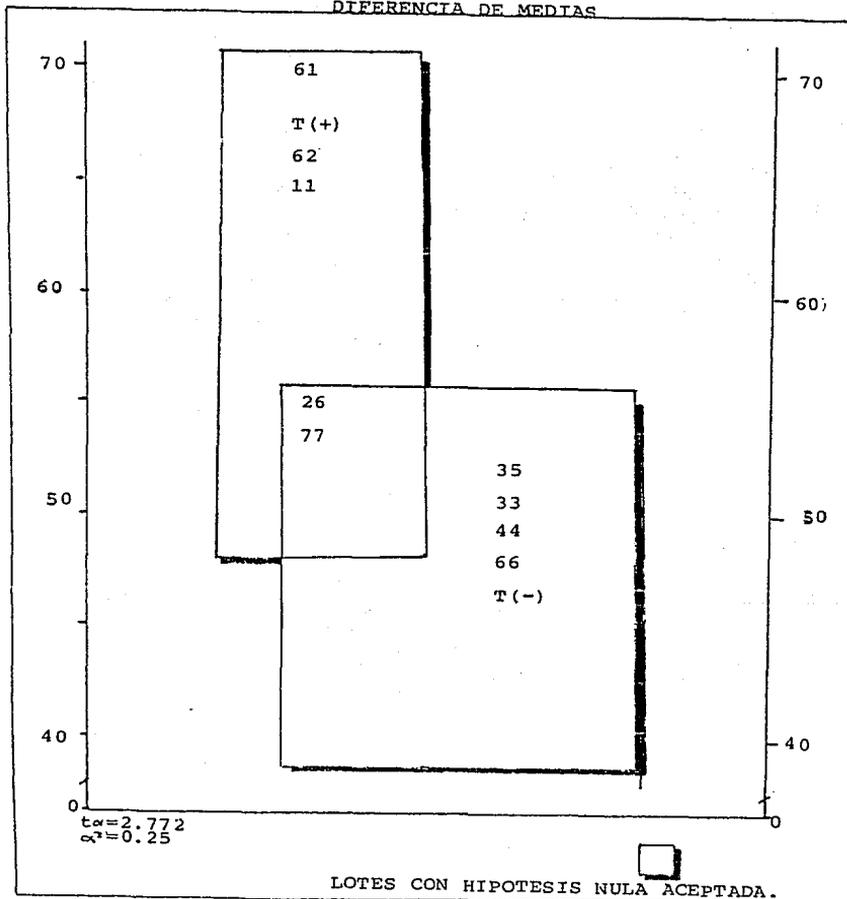
Del análisis detallado anterior se pueden obtener algunas aseveraciones:

El efecto de las diferentes cepas durante el desarrollo

A L T U R A

PRIMER MUESTREO

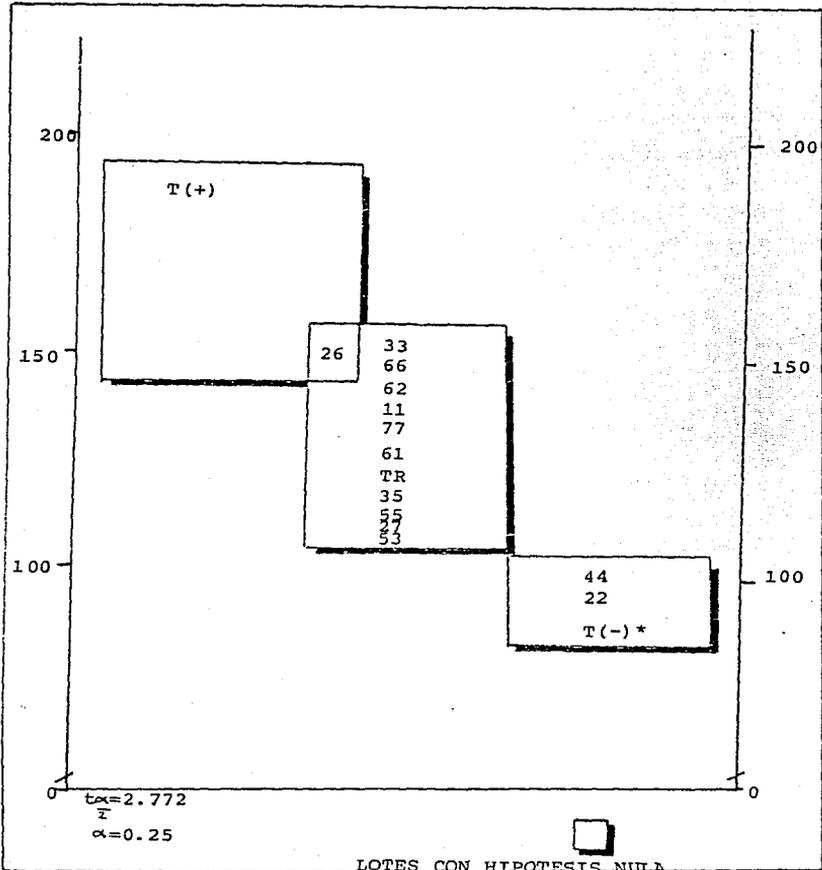
DIFERENCIA DE MEDIAS



A L T U R A

SEGUNDO MUESTREO

DIFERENCIA DE MEDIAS



del cultivo se mantiene o aumenta en la floración, en general la mayor parte de las cepas tienen un efecto moderado sobre el maíz.

Existen cepas que no proporcionan beneficios a la parte vegetal (27,66,22,44,77) ya que muestran un efecto de bajo a nulo en la planta, lo que se evidencia por su similitud al testigo de referencia y/o testigo negativo. Asimismo, existen cepas sobresalientes que se acercan al testigo positivo como son las 26, 33,61 en la mayor parte de los parámetros.

Es interesante señalar aquí que la cepa 61 sufre una -- sensible baja en el beneficio a la planta, en el segundo muestreo en parámetros como el área foliar, el peso seco y la altura, esto hace suponer que probablemente esta cepa no proporciona un mejoramiento de nutrición nitrogenada por nitrificación pero sí induce la formación de una mayor cantidad de raíces (véase gráfica No.1) por lo que la caída en la etapa de floración sería causada por el agotamiento de nutrimentos al alcance de la raíz. Ya que cada cepa desarrolla su efecto en la planta de forma diferente se puede suponer que existen diferencias entre cepas en cuanto a su capacidad de producción de SRC, eficiencia de nitrato reductasa, etc, como lo indica Balandreu (4).

Debido a que Azospirillum no incide en una forma tan específica en el suministro de nitrógeno combinado a la planta como los Rhizobia, los diversos parámetros agronómicos serían indicativos de la efectividad de las cepas inoculadas, en donde ésta está dada por una serie de fenómenos que comprenden la producción de SRC, el mejoramiento de la nutrición nitroge

nada, ya sea por nitrificación, efecto "esponja" o como recientemente se ha propuesto por la alta eficiencia de la nitrato reductasa bacteriana (13), lo que confirma parte de la hipótesis.

Por otra parte, al observar el origen de las cepas ensayadas, su porcentaje de infección (Tabla No. 5) y su efectividad no hay evidencia de relación entre el origen y la efectividad, lo que no está de acuerdo con algunos autores (13,--28). A su vez, tampoco parece existir relación entre el porcentaje de infección y la efectividad, lo que probablemente se debe a que el porcentaje de infección se obtuvo a partir de raíces lavadas y desinfectadas y no esterilizadas en la superficie, puesto que se ha observado que entre raíces lavadas y peso seco del follaje no hay correlación, pero sí entre éste parámetro y las raíces con la superficie esterilizada, al menos en trigo (5), lo que puede suceder también en maíz, sin embargo existen discrepancias respecto al tiempo necesario de esterilización de superficie con cloramina-T, pues hay autores que proponen una hora (28) y otros 5 minutos (13), por lo que es necesario estudios más profundos al respecto (16).

Basándose en este análisis se procedió a evaluar el comportamiento de todos los tratamientos y repeticiones en un muestreo total en la floración, ya que es en ésta etapa donde se evidenció más el efecto de Azospirillum, y así, al utilizar el modelo estadístico propuesto, poder confirmar o desechar si las tendencias o aseveraciones realizadas en los mues

treos de quince tratamientos eran válidas para todos los demás. Los parámetros a medir seleccionados fueron: área foliar, peso seco del follaje, altura y nitrógeno foliar, lo que se hizo con base en el efecto observado en muestreos parciales y para obtener indicativos más específicos de la nutrición nitrogenada en el caso del nitrógeno foliar.

Excepto la altura que fue medida in situ, los otros parámetros se obtuvieron a partir del análisis de la hoja bandera la cual tiene relación directa con el área foliar y el peso seco en el maíz (86). Esto se realizó para no afectar en lo posible el desarrollo normal del cultivo, a fin de obtener un análisis de rendimiento en la cosecha.

Con respecto a la cosecha, esta no se obtuvo, debido a que el porcentaje de éxito de fructificación fué extremadamente bajo del 20 al 30%, por lo que un análisis de rendimiento carecía de validez. Tal caída de la producción se debió probablemente a la presencia de una sequía durante la época de floración lo que ocasionó una falla en la polinización y por lo tanto un llenado de grano deficiente o nulo, tal fenómeno se observó en gran parte de la región afectando las cosechas de los productores.

### 3. PARAMETROS AGRONOMICOS. MUESTREO TOTAL.

El comportamiento del área foliar, peso seco del follaje, altura y nitrógeno foliar se resumen en las tablas Nos. 6,7,8 y 9 y en las gráficas Nos. 11,12,13 y 14, para su análisis se dividió la discusión de acuerdo a resultados simila-

res en los parámetros, de ésta forma se discute inicialmente el área foliar y el peso seco del follaje y posteriormente - los últimos parámetros mencionados.

#### A. Area foliar y Peso seco.

Utilizando el modelo de látice propuesto, en ambos parámetros resulta con una F mayor a la de tablas (Tablas Nos 6 y 7), lo que indica diferencias significativas entre los diversos tratamientos, así se asegura que ambos componentes del - rendimiento son afectados por la inoculación de Azospirillum confirmándose las tendencias observadas en los muestreos parciales, lo que pone de manifiesto la importancia en la producción del cultivo de la inoculación, tal como se señaló en los muestreos parciales. Las pruebas de Duncan correspondientes (Gráficas Nos. 11 y 12) muestran un comportamiento muy similar al señalado en la discusión previa: Los grupos con medias significativamente iguales mostradas en peso seco Gráfica -- No. 11, se reúnen alrededor de los testigos negativo y de - referencia, mientras que otro grupo se encuentra entre el -- testigo de referencia y el testigo positivo, se observa un - tercer grupo que se encuentra alrededor del testigo positivo correspondiendo al comportamiento exhibido durante el pri-- mer muestreo. Si bien, no se observan tratamientos superiores al testigo positivo, como sucede en algunos reportes de ensayos con maíz en Egipto (39), sí hay un claro efecto de - la bacteria lo que resalta su importancia y potencial como - biofertilizante. El beneficio obtenido puede equipararse --

PESO SECO DEL FOLLAJE  
(MUESTREO TOTAL DE TRATAMIENTOS Y REPETICIONES)

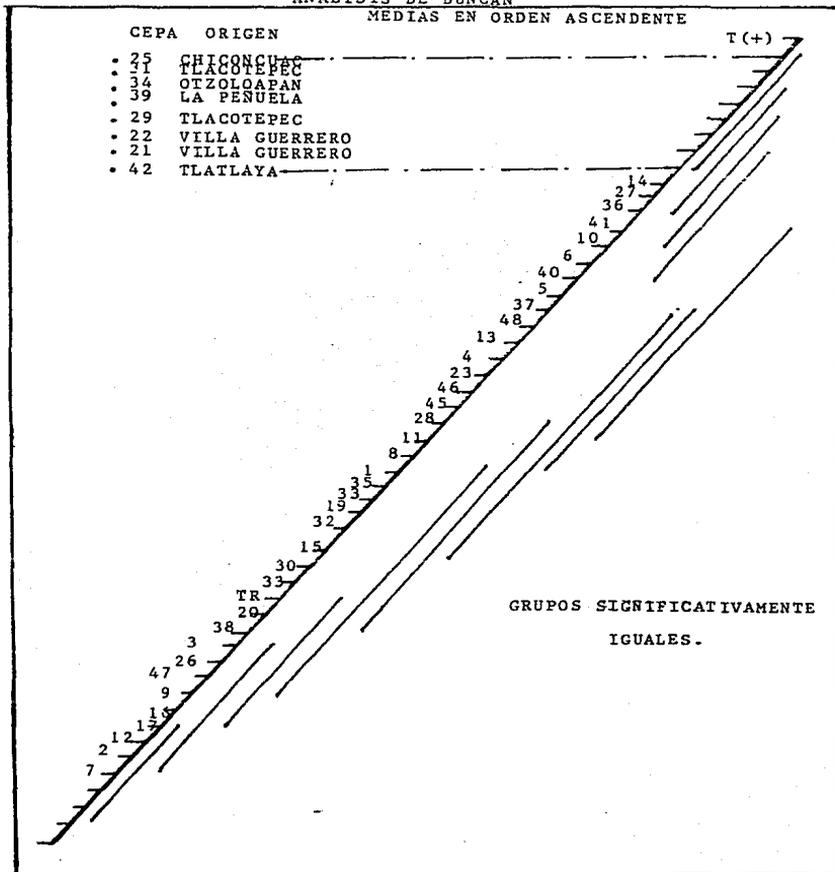
## ANALISIS DE VARIANZA.

	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
REPETICIONES	1	90.9059	-
TRATAMIENTOS	48	190.27	-
BLOQUES DENTRO DE			
REPETICIONES	12	44.108	3.6757
ERROR INTRA- BLOQUE	36	0.07737	-
<hr/> TOTAL	<hr/> 97	<hr/> 329.3587	

F=2.0263

VALOR DE F OBTENIDO MAYOR A TABLAS  
CON 0.05 POR TANTO, LA PRUEBA MUES-  
TRA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN-  
TRE TRATAMIENTOS.

ANALISIS DE DUNCAN  
 MEDIAS EN ORDEN ASCENDENTE



## AREA FOLIAR

( MUESTREO TOTAL DE TRATAMIENTOS Y REPETICIONES)

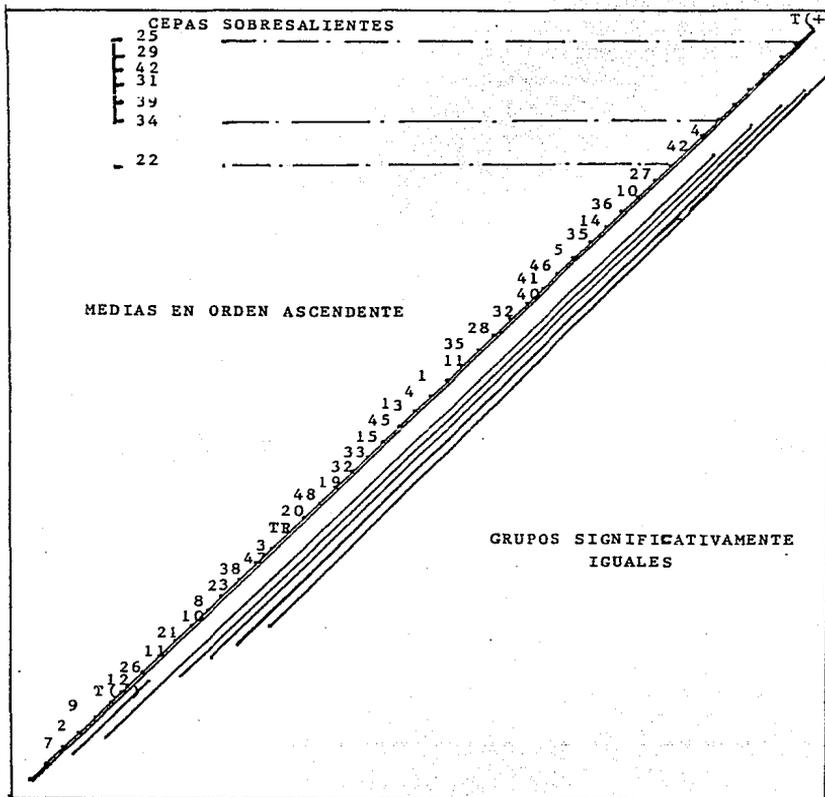
## ANALISIS DE VARIANZA.

	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
REPETICIONES	1	37.124	-
TRATAMIENTOS	48	74998.06	-
BLOQUES DENTRO DE			
REPETICIONES	12	199447.59	16620.63
ERROR INTRA- BLOQUE	36	6430.51	-
TOTAL	97	280873.284	

$$F = 2.4065$$

VALOR DE F OBTENIDO MAYOR A TABLAS  
CON 0.05 POR TANTO, LA PRUEBA MUES-  
TRA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN--  
TRE TRATAMIENTOS.

AREA FOLIAR  
ANALISIS DE DUNCAN



a resultados anteriores ( 21,71 ) en donde el incremento en peso seco es moderado. Las cepas sobresalientes, señaladas en la gráfica con su origen correspondiente, no muestran una relación entre esta y su efectividad de aumento de peso seco, ya que lugares de origen similar a la región de ensayo (Tlaxtlaya, Villa Guerrero) y muy diferentes (Chiconcuac, San Lorenzo Tlacotepec) corresponden a estas cepas por lo tanto -- no se tiene un comportamiento preciso entre ambas características, lo que refuerza lo encontrado en los muestreos parciales.

En cuanto al área foliar (gráfica No.12) el agrupamiento de tratamientos significativamente iguales es muy amplio y solo se distingue el grupo similar a T(-) y todos los demás lotes, esta falla en la demostración de tendencias claras se puede atribuir al efecto de enmascaramiento causado -- por las grandes variaciones entre repeticiones dado que el experimento se encontraba en una pendiente, lo que causó que las plantas de la repetición localizada en la parte inferior fueran mayores por acumulación de nutrientes arrastrados respecto a su homólogo de la parte superior. Por otra parte, - si se observan las medias en orden ascendente, los más cercanos a T(+) (Señalados al lado izquierdo de la gráfica) son los sobresalientes en peso seco del follaje, esta coincidencia - apoya la aseveración previa de la existencia de crecimiento activo.

Ya que el testigo positivo tuvo como característica única la adición de fertilización química en cantidades importantes y no es superado por tratamiento alguno se puede asu-

mir que un factor limitante para el desarrollo del cultivo - en la región es la cantidad de nitrógeno combinado disponible. Empero, no se puede asumir que el mejoramiento de la inculcación sea causado por nitrificación, ya que el área foliar y el peso seco del follaje están estrechamente relacionados a la producción de SRC (6,89) así como varios de los parámetros -- afectados por la bacteria en los muestreos parciales como se señalo previamente.

#### B. Altura y Nitrógeno foliar.

Parámetros relacionados claramente al estado de la nutrición nitrogenada vegetal (3,51) muestran valores de F menores a los de tablas en el análisis de varianza correspondientes - (Tablas Nos. 8 y 9) y por lo tanto no hay diferencias significativas entre tratamientos, lo que fué causado probablemente por el efecto de pendiente ya mencionado y porque la inoculación afecta en menor grado éstos parámetros como ya se había señalado en las gráficas Nos. 9 y 10 de altura.

Sin embargo, es interesante observar el comportamiento - del orden de medias señalado en las gráficas Nos. 13 y 14 en donde se muestran las tendencias generales de los muestreos parciales, a su vez, los sobresalientes en peso seco del - follaje y área foliar denotados al lado izquierdo de la gráfica se dispersan entre T(+) y T(R). Esto puede indicar que al menos éstas cepas afectan la altura y el nitrógeno foliar independientemente de su efecto en el área foliar y peso seco del follaje, confirmándose lo discutido anteriormente.

## ALTURA

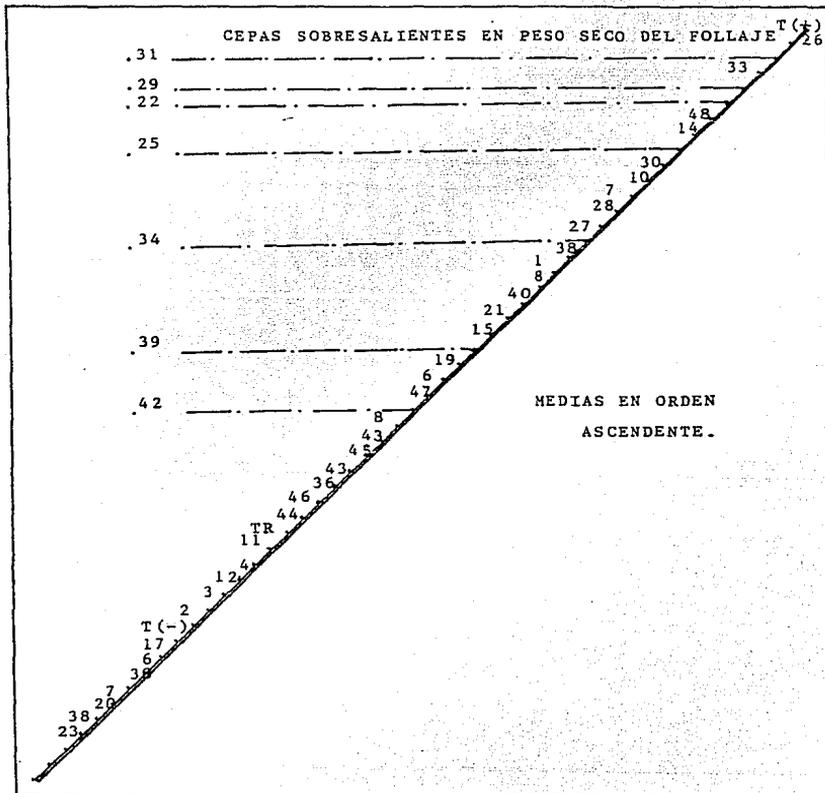
( MUESTREO TOTAL DE TRATAMIENTOS Y REPETICIONES)

## ANALISIS DE VARIANZA

	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
REPETICIONES	1	24110.15	-
TRATAMIENTOS	48	53256.38	-
BLOQUES DENTRO DE			
REPETICIONES	12	9179.73	764.97
ERROR INTRA- BLOQUE	36	517.607	-
<b>TOTAL</b>	<b>97</b>	<b>87063.9439</b>	

VALOR DE F OBTENIDO MENOR AL DE  
TABLAS CON 0.05. POR LO TANTO ,  
LA PRUEBA NO MUESTRA DIFERENCIAS  
SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS.

AL T U R A  
ORDENACION DE MEDIAS



## NITROGENO FOLIAR

(MUESTREO TOTAL DE TRATAMIENTOS Y REPETICIONES)

## ANALISIS DE VARIANZA

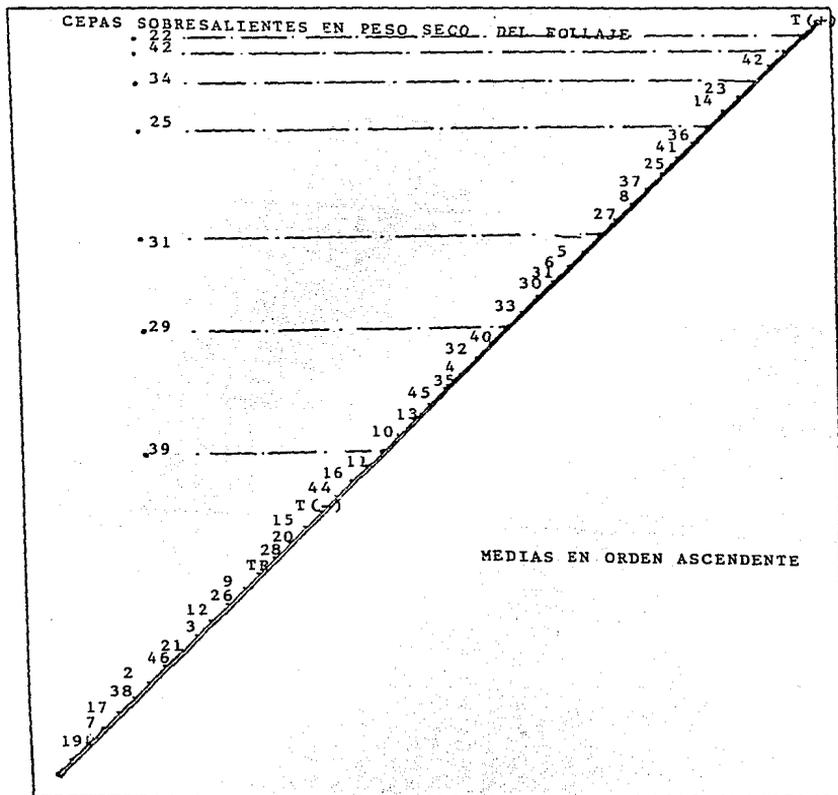
	g.l.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
REPETICIONES	1	29.91	-
TRATAMIENTOS	48	67.24	-
BLOQUES DENTRO DE			
REPETICIONES	12	16.91	1.40
ERROR INTRA- BLOQUE	36	0.7219	
TOTAL	97	114.7819	

$$F = 1.2647$$

VALOR DE F OBTENIDO MENOR AL DE  
TABLAS CON 0.05. POR LO TANTO,  
LA PRUEBA NO MUESTRA DIFERENCIAS  
SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS.

NITROGENO FOLIAR

ORDENACION DE MEDIAS.



Así se observan entre este grupo algunos cercanos a T(+) y -- otros a T(R). Lo que conduce a pensar en la existencia de - cepas que afectan el crecimiento de la planta (en follaje) y la nutrición nitrogenada al mismo tiempo, como el caso de la cepa No. 22, por ejemplo que sería una cepa recomendable para estudios de establecimiento posterior. Lo anterior resalta la importancia de la selección de cepas de Azospirillum, como un requisito indispensable para su implementación en campo como lo han señalado algunos autores (13,28).

Este análisis demuestra que las tendencias observadas - en los muestreos parciales pueden ser válidas para todos los tratamientos.

Al parecer hay un efecto sobresaliente en parámetros relacionados a promotores del crecimiento, aunque no se puede descartar el mejoramiento de la nutrición nitrogenada el cual puede ser causado por cualquiera de los mecanismos propuestos como el efecto "esponja" (71), el aumento de la superficie radicular (6,41), efecto de la nitrato-reductasa bacteriana - (13), o la fijación biológica de nitrógeno (21,60).

Los resultados obtenidos coinciden con los diversos estudios previos como se ha demostrado en la discusión anterior reuniéndose, en el presente trabajo, un seguimiento del efecto de la inoculación más detallado que en la mayor parte de - los informes existentes al respecto. A su vez, las tendencias presentadas coinciden con los resultados en campo de -- inoculaciones con Azospirillum en el estado de Veracruz, rea-

lizada recientemente y en aplicación actual (16).

El efecto de las diferentes cepas bacterianas no alcanzó a ser superior al testigo positivo y en general éste no fué igualado totalmente por ningún tratamiento, lo que indica que la bacteria puede ser un biofertilizante efectivo pero no un substituyente total de la fertilización química.

Parece adecuado ensayar las cepas sobresalientes obtenidas en combinación con diversas dosis reducidas de fertilizante nitrogenado a fin de encontrar la proporción adecuada para mantener y/o mejorar el rendimiento logrado agregando la cantidad óptima económica de fertilización química recomendada. Sin embargo, en las condiciones actuales del campo mexicano, especialmente en zonas temporaleras de rendimientos pobres como la región en que se efectuó el ensayo y muchas de gran parte del país es evidente que se necesitan alternativas no costosas como puede ser Azospirillum que sin alcanzar -- los rendimientos que ofrece la aplicación de fertilización química ayuda a mejorarlos, como lo demostró el presente trabajo, por lo que se propone ahondar en estudios similares a fin de complementar información conducente al establecimiento de Azospirillum como un biofertilizante en uso en el agro del país.

## IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1. El Porcentaje de infección de la bacteria se mantiene a - partir del establecimiento en las etapas tempranas del creci miento vegetal, al menos hasta la floración.
2. No parece existir relación entre la efectividad, infecti- vidad y el origen de la cepa.
3. El efecto benéfico a la planta no puede ser atribuido a una sola causa, como la fijación del nitrógeno o la producción de SRC, sino a una acción integral de todos estos facto- res .
4. Es necesaria una selección de cepas previa al estableci- miento de Azospirillum como biofertilizante para una re-- gión dada.
5. Azospirillum no puede ser utilizado como substituyente total de la fertilización química nitrogenada, pero sí como un coadyuvante de ésta con un ahorro importante de tal in- sumo agrícola.

## RECOMENDACIONES

1. Ensayar las cepas seleccionadas en una mayor variedad de - condiciones ambientales con diferentes tipos de maíz.
2. Efectuar una repetición del trabajo variando la reducción de fertilización química y su tiempo de aplicación.

## X. BIBLIOGRAFIA.

1. A.F.P. (1986). "Análisis de E.U.: México, incapaz de -- autoalimentarse". La Jornada. Año:2. No. 639. 28 de junio p.4.
2. Álvarez, R., (1983). Presencia de Azospirillum lipoferum y Azospirillum brasilense en la rizosfera de algunas plantas cultivadas y silvestres. Rev. Facultad de Agronomía - 4(3) 271-276.
3. Arnon, I., (1974). Mineral nutrition of maize. International Potash Institute. Berna Suiza. pp.452.
4. Balandreau, J., (1983). Microbiology of the association Can. J. Microbiol. 29:851-859.
5. Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. Dobereiner, J. (1983). -- Effects of Azospirillum inoculation on roots infection and nitrogen incorporation in wheat. Can.J. Microbiol. - 29:924-929.
6. Barea, J.M., Bonis, A.F., Olivares, J. (1983). Interactions between Azospirillum and VA-micorrhiza and their effects on growth nutrition of maize and ryegrass. Soil Biol. -- Biochem. 6(115):705-709.
7. Bashan, Y. (1986). Enhancement of wheat root colonization and plant development by Azospirillum brasilense Cd following temporary depression of rhizosphere microflora. Applied Environmental Microbiology. 51(5):1067-1071.
8. Bassols, B.A. (1984). Geografía Económica de México, Teoría, fenómenos generales, análisis regional. Ed. Trillas México. pp.428.

9. Bedmar J.E., Olivares J. (1982). Limitaciones de la fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia. -- 65:26-41.
10. Berkum, P.V., Bohlool, B.B. (1980). Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. Microbiological Reviews. 3(44):491-517.
11. Bidwell, R.G. (1979). Fisiología Vegetal. A.G.T. Editor. Barcelona, España. pp 800 .
12. Boddey, R.M. y Dobereiner, J. (1984). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. En: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Ed: Subba Rao, N. S. Edward Arnold LTD . New Delhi, India. pp. 277-314.
13. Boddey, R.M., Baldani, L.D.V. Dobereiner, J. (1986). --- Effect of inoculation of Azospirillum spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. Plant and Soil. 95: -- 109-121.
14. Bulow, J.L., Dobereiner, J. (1975). Potential for Nitrogen Fixation in maize genotypes in Brasil. Proc. Nat. Sci. --- U.S.A. 72:2389-2393.
15. Caballero, M.J. (1986). Jefe del Departamento de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la -- Universidad Autónoma de Puebla. Comunicación Personal.
16. Caballero, M.J. (1987). Idem. Comunicación Personal.
17. C.C.I.S.I.E.P.A. (1986). "Las metas del campo mexicano - para '86". El Nacional. Año: 58, Tomo II, No. 20609. Lunes 30 de junio. Tercera sección. P.1.
18. C.D.I.A., (1980). El cultivo del maíz en México. Centro - de Investigaciones Agrarias. México. pp. 149.

19. Cochran, W.G., Cox, G.M. (1983). Diseños experimentales. Ed. Trillas, México. pp.661.
20. CODAGEM, Lab. Microbiol. Exp. (1985). Fijación de nitrógeno por Azospirillum spp en el cultivo del maíz en condiciones de temporal en el Valle de Toluca. CIDAGEM, Metepec, Edo. de México. pp. 105.
21. Cohen, E., Okon, Y., Kigel, J., Nur, I., Henis, Y. ---- (1980). Increase in dry weight and total nitrogen contain in Zea mays and S. italica associated with nitrogen-fixing Azospirillum sp . Plant. Physiol. 64(4):745-749.
22. Delwiche, C.C. (1976). El ciclo del Nitrógeno. En: Química y ecosfera. Ed. Hamilton C. L. Selecciones de Scientific American. Herman Blume. España. pp. 53-62.
23. Devender, D.J., Patriquin, D.G. (1985). Characterization of substance produced by Azospirillum with causes branching of wheat root hairs. Can. J. Microbiol. 31:206-210
24. Dirección General de Agricultura ( 1980 ). Atlas del uso del suelo en la República Mexicana. S.A.R.H. México, D.F. pp. 79.
25. Dobereiner, J., Day, J.M. (1975). Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. Proc. Inst. Int. Symp. Nitrogen fixation. Pullman, Washington, 2:518-538.
26. Dobereiner, J., Day, J.M. (1976). Ecological distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck . Can. J. Microbiol. - 25:1264-1269.
27. Dobereiner, J. (1978). Potential for nitrogen fixation - in tropical legumes and grasses. En: Limitations and po

- tentials of biological nitrogen fixation. Ed: Dobereiner J. Burr, R.H. Plenum Press. New York, U.S.A. pp.13-23.
28. Dobereiner, J. DePolli, H. (1981). Diazotrophic rhizocoe nosis . En: Nitrogen Fixation. Ed: Stewart P.D.W., Gallon S.R. Academic Press. Inglaterra. pp. 301-329.
  29. Dobereiner, J. (1983). Ten years of Azospirillum. Experiencia Suplementum. 48:9-22.
  30. Doorenbos, J. (1979). Yield reponse to water. F.A.O. Roma Italia. pp.193.
  31. Ela, S.W. Stephen, W.E., Anderson, M.A., Rill, S.W. -- (1982). Screening and selection of maize to enhance -- associative bacterial nitrogen fixation. Plant. Physiol. 70:1564-1567.
  32. Flores, A.A., (1985). Aislamiento y caracterización de - Azospirillum sp de la rizosfera del sorgo en Valle de - Santiago, Gto. Tesis de Licenciatura. Fac. de Quím. --- U.N.A.M. pp. 89.
  33. Falk, E.C. Johnson, J.L., Baldani, V.L.S., Dobereiner, J. Krieg, N.R. (1986). Desoxyribonucleic and ribonucleic - acid. Homology studies of the genera Azospirillum and - Conglomeromonas . International Journal of Systematic Bacteriology. 36(1):80-85.
  34. García, E. (1981). Modificaciones al sistema de Clasificación climática de Koppen. Instituto de Geografía, UNAM México, D.F. pp. 251.
  35. García M.E., Falcón, D.F. (1984). Nuevo Atlas Porrúa de - la República Mexicana. Ed. Porrúa. S.A. México, D.F. -- pp. 250.

36. Haahtela, K., Wartiovaara, T. Sundman, V., Skujins V., (1981). Root-associated  $N_2$ -fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and Azospirillum in cold- climate Spodosols. Applied and Environmental Microbiology. 41(1) 203-206.
37. Hartmann, A. Singh, M., Klingmuler, W., (1983). Isolation characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of AIA. Can. J. Microbiol. 29:923-976.
38. Hegazi, M.A., Monib, M., Vlassak, K. (1979). Effect of inoculation with  $N_2$ -fixing Spirilla and Azotobacter on nitrogenase activity on roots of maize grown under subtropical conditions. Appl. and Environm. Microbiol. 38(4):-- 621-625.
39. Hegazi, N.A., Monib, M., Hussein, A., El-Sayed, S. (1983). - Response of maize plants to inoculation with Azospirilla and or straw amendment in Egypt. Can. J. Microbiol. 29: 888-894.
40. Hernández, P. S., Ruiz, S. (1987). Evaluación del comportamiento de cepas de Azospirillum en turba . Tesis de Licenciatura. Fac. de Quim. U.N.A.M.
41. Hubell, D.M., Tien, M.F., Gaskins, M.H., Lee, L. (1981). -- Physiological interactions in the Azospirillum - grass root association . En: Associative  $N_2$ -Fixation. Ed: Vose P.B., Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Ratón, Florida U.S.A. pp. 1-15.
42. Hubell, D.M., Gaskins, M.H. (1984). Associative  $N_2$ -Fixation with Azospirillum. En : Biological Nitrogen Fixation Ecology, Technology and Physiology. Ed: Alexander, M. Ple

- num Press Incorporation. Nueva York, U.S.A. pp.3-10.
43. I.N.E.G.I. (1981). Síntesis Geográfica del Estado de México. S.P.P. México, D.F. pp. 174.
  44. I.N.E.G.I. (1985). Anuario de estadísticas estatales, 1985. S.P.P. México, D.F. pp. 662.
  45. Jiménez, G.M. (1986). Efecto de la inoculación de Azospirillum sp. en dos variedades de trigo, realizado a nivel invernadero. Tesis de Licenciatura. Fac. de Quim. U.N.A.M. pp. 74.
  46. Kapulnik, Y., Kigel, J., Okon, Y., Nur, I., Henis, Y. (1981). Effects of Azospirillum inoculation on some growth parameters and N content of wheat, Sorghum and Panicum. Plant and Soil. 61:65-70.
  47. Klucas, R.V., Pederso, W., Shearman, R.C., Wood, L.V. (1981). Nitrogen Fixation associated with winter wheat, sorghum and Kentucky -- bluegrass. En: Associative N<sub>2</sub>-Fixation. Ed: Vose, P.B., Ruschel, A. P. . C.R.C. Press. Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp. 119-130.
  48. Krebs, J.C. (1978). Ecology, The Experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row Publishers. Nueva York, U.S.A.
  49. Krieg, N.R., Dobereiner, J. (1984). The Genus Azospirillum. En : -- Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Ed: Krieg, N.R., Holt, - J.G. Vol. I. The Williams and Wilkins Co. , Baltimore, U.S.A. pp. -- 94-104.
  50. La Jornada (1987). Incrementos hasta de 235% en costos de producción de maíz. La Jornada. p. 8, 2a. Columna. 12 de Febrero.
  51. Larcher, R. (1977). Ecofisiología Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España. pp. 305.
  52. Lawrence, M.H. (1951). Taxonomy of Vascular Plants. Ed. McMillan Publishing Co. Inc. New York, U.S.A. pp. 823.

53. Magalhaes, S.M. (1981). Infection of Maize Roots by Azospirillum spp. En: Associative  $N_2$ -Fixation. Ed: Vose, P.B., Ruschel, A.P. -- CRC Press. Boca Patón Florida, U.S.A. pp. 201-205.
54. Magalhaes, S.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R., Döbereiner, J. (1983). A new Acid Tolerant Azospirillum sp. An. Acad. Bras. Cienc. 55(4):417-430.
55. Mahan, H.B. (1977). Química. Fondo Educativo Interamericano. U.S.A. pp. 813.
56. Martin, P. Glatzle, A. (1982). Mutual influences of Azospirillum spp. and Grass. *Experientia Supplementum*. 42:108-120.
57. Martínez, P. (1979). Algunos aspectos ecológicos de la simbiosis -- Azospirillum-gramíneas . Tesis de Licenciatura. Fac. de Quím.U.N.A.M. pp.97.
58. Mascarúa, E.M.A. (1986). Investigador del Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla. Comunicación Personal.
59. Mendoza.O.B.E., González,H.V.A., Ortiz,C.J.(1984). Factores de Conversión de tamaños de muestra en la estimación del área foliar en raíz. *Agrociencia*. 58 :141-151.
60. Mertens, T., Hess, D. (1984). Yield Increases in spring wheat (Triticum aestivum, L) inoculated with Azospirillum lipoferum under green-house and fiel conditions of a temperate region. *Plant and Soil*.82:87-99.
61. Milthorpe, F.L., Moorby, J. (1979). *Crop Phisiology, an introduction*. -- Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp. 243.
62. Mitchell, H.L. (1972). Microdetermination of Nitrogen in Plant Tissues *Journal of The AOAC*. 55(1):1-3.

63. Neyra, C.A. (1977). Denitrification by fixing Spirillum lipoferum . Can. J. Microbiol. 23: 300-305.
64. Neyra C.A. , Dobereiner, J. (1977). Nitrogen fixation in grasses. Advances in Agronomy. 29:1-39.
65. Nur, I., Okon, Y., Henis, Y. (1980). Comparative studies of nitrogen-fixing bacteria associated with grasses in Israel with Azospirillum brasilense . Can.J.Microbiol. 26: 714-718.
66. Okon, Y. (1982). Field inoculation of grasses with Azospirillum. En: Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Ed:Graham, H.P., Harris, C.S. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, - Colombia. pp. 459-467.
67. Okon, Y. (1985). Azospirillum as a potential inoculant - for agriculture. Trends in Biotechnology. 3(9):223-228.
68. Okon, Y., Hadar, Y. (1987). Microbial inoculant as Crop - yield enhancers. C.R.C. Critical Reviews in Biotechnology. En prensa.
69. Ortiz, C.J., Mendoza, C.L., González, H.V. (1984). Cambios en las características morfológicas y fisiométricas del maíz por efecto de la selección in situ y rotativa - basada en el rendimiento de grano. Acta Agronómica. 58: 153-163.
70. Otake, K.G., Echegaray, A., Ramírez, G.M.R., Márquez, J. - (1985). Evaluación de la fijación del nitrógeno en la - asociación Azospirillum- Maíz, bajo condiciones de temporal, en el Valle de Toluca. En: Resúmenes de la Tercera Reunión sobre fijación Biológica del Nitrógeno. Ed: Ramí-

- rez, G.R.M., Tzuzuki, R.G.. CONACYT, Facultad de Química U.N.A.M., Colegio de Postgraduados de Chapingo, UACH, -- FERTIMEX. México, D.F. pp. 36-37.
71. Patriquin, D.G., Dobereiner, J., Jain, D.K. (1983). Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29:900-915.
  72. Pedroza, F.O., Sthepan, M.S., Dobereiner, J. (1981). Interaction of nitrogenase and uptake hydrogenase in Azospirillum brasilense. En: Associative  $N_2$ -Fixation. Ed: Vose, P.B., Ruschell, A.P. CRC, Press. Boca Ratón Florida, U.S.A. pp. 15-25
  73. Pelczar, J.M., Reid, R., Chan, E.C. (1982). *Microbiología* Ed: Mc. Graw Hill. México, D.F. pp. 826.
  74. Peña, C.J.J. (1987). Coordinador de Investigación Microbiológica del CINVESTAV, Irapuato, I.P.N. Comunicación Personal.
  75. Postgate, J. (1981). Fijación de nitrógeno. Ed. Omega. Barcelona, España. pp. 83.
  76. Ramírez, R.M. (1982). Estudio comparativo de la supervivencia de Rhizobium phaseoli en compostas y turba. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M.
  77. Ramírez, G.R.M. (1986). Jefe del Laboratorio de Microbiología experimental de la Facultad de Química. U.N.A.M. - Comunicación Personal.
  78. Rao, A.V., Venkateswarlu, V. (1982). Associative simbiosis of Azospirillum lipoferum with dicotyledoneus succulent plants of de Indian Desert. *Can. J. Microbiol.* 28:300-305
  79. Reinhold, B., Hureck, T., Fendrik, I., Pot, B. Gillis, M.

- Kersters, K., Thielemens, S. Deley, J. (1987). Azospirillum halopraeferens sp. nov., A Nitrogen-Fixing organism associated with roots of Kallar grass (Leptochloa fusca (L.) ). International Journal of Systematic bacteriology. 37(1):43-51.
80. Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Ed. LIMUSA. - México, D.F. pp. 432.
81. Soto, U., Herrera, C., Baca, B., Mascarua, E., Caballero, M.J. (1986). Presencia de beta-lactamasas en diferentes cepas de Azospirillum. En: Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Microbiología. Ed: Jiménez, Z.L., Trujillo, G.A., García, O. E. Asociación Mexicana de Microbiología. Puebla, México. pp. 22.
82. Smith, R.L. (1980). Ecology and field Biology. Harper & Row Publishers. New York, U.S.A. pp. 835.
83. S.P.P. (1977). Carta topográfica Palmar Chico. Clave: -- E14 A65. SPP, México, D.F.
84. Subba Rao, N.S. (1981). Response of crops to Azospirillum inoculation in India. En: Associative  $N_2$ -Fixation. Ed: Vose P.B. Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Raton Florida U.S.A. - pp. 137-144.
85. Stephan, M.P., Pedrosa, F.O., Dobereiner, J. (1981). Physiological Studies with Azospirillum. En: Associative  $N_2$ -Fixation. Ed: Vose, P.B., Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Raton Florida, U.S.A. pp. 7-13.
86. Tanaka, A. Yagamuchi, J. (1977). Producción de materia seca componentes del rendimiento y rendimiento de grano en -- maíz. Traducción autorizada del Inglés del artículo de: -

- J. of The Fac. of Agriculture Hokaido University. 57: - 71-132. Año: 1972. Colegio de Postgraduados de Chapin-go, México. pp. 124.
87. Tapia, H.A., Mascarúa, E.M., Caballero, M.J. (1986). Actividad y algunas actividades de bacteriocinas en Azospirillum sp. En: Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Microbiología Ed: Jiménez, Z.L., Trujillo, J.A., García, O. E. Asociación Mexicana de Microbiología. Puebla, México. pp.22.
88. Tarrand, J., Krieg, R.N., Dobereiner, J. (1978). A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) and Azospirillum brasilense sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-979.
89. Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubell, D.H. (1979). Plant -- growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effects on the growth of Pearl millet (Pennisetum maximum L. ). Applied Environment. Microbiol. 37:1016-1024
90. Toledo, V.M., Carabias, J., Mapes, C., Toledo, D. (1985). Ecología y autosuficiencia alimentaria. Ed: Siglo XXI. - México, D.F. pp.118.
91. Tyler, M.E., Milán, J.R., Shang, S.C. Zuberer, D.A. (1979) Isolation of Azospirillum from diverse geographic regions Can. J. Microbiol. 25: 693-697.
92. Umalli-García, M., Hubell, D.H., Gaskins, M.H., Dazzo, F. B. (1980). Association of Azospirillum with grass roots. - Applied and Environment. Microbiol. 39(1):219-226.
93. Umalli-García, M., Hubell, D.H., Gaskins, M.H., Dazzo, F.

- (1981). Absorption and mode of entry of Azospirillum brasilense to grass roots. En: Associative N<sub>2</sub>-Fixation Ed: Vose P.V., Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp. 49-62.
94. Valdez, M.R. (1986). Jefe del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Comunicación Personal.
95. Vlassak, K., Reynders, L., (1979). Rhizocoetic dinitrogen fixation by Azospirillum spp. En: II Congreso, Abstracts of lectures and poster demonstrations. Ed: Federation of European Societies of plant Physiology. Santiago de Compostela. España. pp.33-34.
96. Vlassak, K., Reynders, L., (1981). Agronomic aspects -- of biological dinitrogen fixation by Azospirillum spp. En: Associative N<sub>2</sub>Fixation. Ed: Vose, P.B. Ruschel, A.P. CRC Press. Boca Ratón Florida U.S.A. pp. 93-102.
97. Volpon, A.G., Depolli, H., Dobereiner, J. (1981). Physiology of nitrogen fixation in Azospirillum lipoferum Br17 (ATCC 29709). Arch. Microbiol. 128:371-375.
98. Vose, P.B. (1983). Developments in nonlegume N<sub>2</sub>-fixing systems. Can. J. Microbiol. 29:837-849.
99. Weier, K.L. (1980). Nitrogen Fixation Associated with grasses. Tropical grasslands. 14(3):194-201.
100. Yahalom, E., Kapulnik, Y., Okon, Y. (1984). Response of Setaria italica to inoculation with Azospirillum brasilense as compared to Azotobacter chroococum. Plant and Soil. 82(1):77-86.

## APENDICE No. 1

## MEDIO Nfb SMISOLIDO LIBRE DE NITROGENO

Acido succínico	5.0	g
$K_2HPO_4$	0.5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.1	g
$CaCl_2$	0.02	g
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.002	g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01	g
Azul de Bromotimol		
(Solución alcohólica al 0.5%)	2.0	ml
FeEDTA		
(Solución acuosa al 1.64%)	4.0	ml
Biotina		
(Solución al 0.01%)	1.0	ml
NaOH o KOH	4.5	g

Ajustar el pH a 6.8-7.0 con una solución de NaOH o KOH al 10%, agregar 1.75-2.0 g de agar. Completar a un litro y colocar en tubos de -- cultivo o en matraces para posteriormente vaciar en placas y esterilizar a 120°C, durnate 15 minutos.