

Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero*

Effect of inoculation with rhizospheric bacteria in two varieties of wheat Phase II: greenhouse

Carlos José Bécquer Granados^{1§}, George Lazarovits², Laura Nielsen², Maribel Quintan¹, Modupe Adesina², Laura Quigley², Igor Lalin² y Christopher Ibbotson²

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus, A. P. 2255, Z. P. 1. Sancti Spiritus, Cuba. ²Estación Experimental de London, Ontario, Canadá (Agriculture and Agri-Food Canada) Tel. 519 4572575. (lazarovtsg@alcanada.com). [§]Autor para correspondencia: pastossp@yayabo.inf.cu.

Resumen

Se llevó a cabo un experimento de invernadero para evaluar la influencia de la inoculación simple y combinada, efectuada con las bacterias rizosféricas *Sinorhizobium* y *Azospirillum*, en dos variedades de trigo. Materiales y métodos según lo descrito en las metodologías convencionales para este campo de estudio. El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 4 réplicas y 10 tratamientos. Análisis estadístico varianza bifactorial. Se utilizó tratamiento fertilizado con NH_4NO_3 (150 ppm/kg suelo). Se evaluó contenido de clorofila foliar, peso seco aéreo, peso seco radical, longitud del tallo y germinación. En caso de aparecer diferencias, se determinaron mediante la prueba de Duncan, y las diferencias entre las variedades con t-Student. Se concluye que la inoculación combinada de la cepa A2 (*Sinorhizobium meliloti*) con la cepa N7 (*Azospirillum zae*), fue la de mayor influencia positiva en el contenido de clorofila de las plantas. Por otra parte, existió una alta diferenciación entre las dos variedades de trigo en la longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical. Los resultados en peso seco aéreo y peso seco radical, al combinarse los dos factores estudiados, dependieron notablemente de las características varietales de la planta y del efecto significativo de la población autóctona de rizobacterias. La germinación de las plantas no estuvo vinculada a ninguno de los factores aplicados en el experimento.

Abstract

The experiment was carried out in a greenhouse so that the inoculation, both simple and combined (with the rhizospheric bacteria- *Sinorhizobium* and *Azospirillum*), in two varieties of Wheat. Materials and methodologies were used in accordance with previously prescribed conventional methodologies for this study. The experimental design was completely randomized, with 4 replicas and 10 treatments. A statistical analysis using two-way variance was done. Fertilized treatment was applied with NH_4NO_3 (150 ppm/kg soil). The content of chlorophyll foliage was evaluated, dry air weight, dry root weight, length of stem, and germination. In the event that differences appeared, it was determined through use of the Duncan Test, and the differences between varieties with t-Student. It is concluded that combined inoculation with the strain A2 (*Sinorhizobium meliloti*) and the strain N7 (*Azospirillum zae*) had the greatest positive influence on the chlorophyll content of the plants. On the other hand, there was a great difference between the two varieties of wheat in terms of length of stem, dry air weight, and dry root weight. The results of dry air weight and dry root weight, upon combining the two factors that were studied, highly depended on the varietal characteristics of the plant and on the native population of rhizobacteria. The germination of the plants was not linked to any of the applied factors in the experiment.

* Recibido: diciembre de 2011
Aceptado: julio de 2012

Palabras clave: *Azospirillum*, *Sinorhizobium*, clorofila foliar, fitohormonas.

Key words: *Azospirillum*, *Sinorhizobium*, foliage chlorophyll, phytohormones.

Introducción

El efecto positivo de las bacterias rizosféricas en gramíneas, en base a su producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, ha sido demostrado por diferentes autores (Antoun y Prévost, 2005; Anya *et al.*, 2009). Entre estas bacterias, *Azospirillum* constituye una de las más prometedoras, ya que coloniza la rizosfera de numerosos cultivos y la producción de fitohormonas, reducción de nitratos, así como la fijación del dinitrógeno, se le han atribuido para explicar su efecto positivo en las plantas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). En el presente trabajo se utilizó una cepa de *A. zea* y otra de *A. canadense*, ambas conocidas por incrementar el rendimiento de cereales (Mehnaz *et al.*, 2010). Otras bacterias, como los rizobios, colonizan no sólo las raíces de las leguminosas, sino también las de plantas pertenecientes a otras familias y producen diversos metabolitos que pueden actuar como sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Dakora, 2003). En el presente experimento se utilizaron cepas de *Sinorhizobium meliloti*, género reconocido como altamente eficiente por su efecto estimulador del crecimiento vegetal en trigo en combinación con cepas de *Azospirillum* (Askary *et al.*, 2009).

Por otra parte, se conocen trabajos sobre la coinoculación con bacterias pertenecientes a diferentes géneros, capaces de producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y de lograr un efecto positivo en diversos cultivos de forma sinérgica (Carolina y Lorda, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). La coinoculación puede beneficiar el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos (Bashan *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006), como el de cambios en la morfología y fisiología del sistema radical (Sarig *et al.*, 1992). El incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales causa el aumento de la superficie radical disponible para los nutrientes y la captación de agua (Bai *et al.*, 2003).

El objetivo general del experimento se centró en determinar la influencia de la inoculación simple y combinada con *Azospirillum* spp. y *Sinorhizobium* spp., así como de la variedad vegetal, en trigo, cultivado bajo condiciones de invernadero.

Introduction

The positive effect of the rhizospheric bacteria in graminea, based on its production of substances with vegetation growth stimulants, has been demonstrated by different authors (Antoun y Prévost, 2005; Anya *et al.*, 2009). Amongst the bacteria, *Azospirillum* constitutes as one of the most promising, as it colonizes the rhizosphere of many crops and the production of phytohormones, works in the reduction of nitrates, like the fixation of dinitrogen, it has been attributed to explain the positive effect on plants (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). In the present research, a strain of *A. zea* and another of *A. canadense* was used, both are known for increasing the yield of cereal crops (Mehnaz *et al.*, 2010). Other bacteria like the Rhizobes, colonize not only the roots of leguminous plants, but also plants belonging to other families and produce diverse metabolites that can act as substances that are promoters of vegetation growth (Dakora, 2003). In the current experiment strains of *Sinorhizobium meliloti* were used, a genus that is generally known as highly efficient for their stimulating effect of vegetation growth in wheat with strains of *Azospirillum* (Askary *et al.*, 2009).

On the other hand, other investigations are known about the co-inoculation with bacteria belonging to a different genus, capable of producing substances that are vegetation growth stimulators and can achieve a positive effect in diverse cultigens in a synergetic form (Carolina and Lorda, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). The co-inoculation can benefit vegetation growth through different mechanisms (Bashan *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006), like the changes in morphology and physiology of the root system (Sarig *et al.*, 1992). The increase in the number of lateral roots and root hair cause an increase in the root surface that is available for nutrients and water capture (Baj *et al.*, 2003).

The general objective of the experiment centered on determining the influence of simple inoculation and combined (with *Azospirillum* spp. and *Sinorhizobium* spp.) inoculation, as well as vegetation variety, in wheat, cultivated under greenhouse conditions.

Materiales y métodos

Procedencia de las cepas: se utilizaron las cepas N7, perteneciente a *A. zeae*, así como la cepa DS2, perteneciente a *A. canadense*, donadas por Agriculture and Agri-Food Canada (London). Asimismo, se utilizaron las cepas A2 y NRG34, pertenecientes a *S. meliloti* y donadas por Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Varietades de trigo y procedencia: se evaluaron las variedades de trigo (*Triticum aestivum*): Barrie y Hoffman, donadas por Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Procedimiento experimental: utilizaron metodologías previamente descritas por Sabry *et al.* (1997) y Webster *et al.* (1997). Todas las cepas crecieron en medio sólido Levadura-Manitol (Vincent, 1970) y se resuspendieron en medio líquido Levadura-Manitol hasta lograr una concentración celular de 10^7 - 10^8 UFC/mL. Se aplicó el inóculo bacteriano en el momento de la siembra (1.0 mL/semilla), con una concentración celular de 10^7 - 10^8 UFC/mL y diluido en proporción de 1:10 mediante una solución salina estéril (0.85% NaCl). Una segunda inoculación, con la misma concentración, fue aplicada a los 5 días de siembra.

Se utilizaron macetas plásticas con 0.90 kg de suelo sin esterilizar, que se colectó en áreas pertenecientes a Agriculture and Agri-Food Canada, Estación Experimental Delhi (London, Ontario, Canadá) (42° 5' latitud norte, 80° 3' longitud oeste). Este suelo está clasificado como Luvisol Marrón-Brunosólico Gris (*Brunisolic Gray Brown Luvisol*) (Canadian System of Soil Classification) (Chapman y Putman, 1966) y se caracteriza por su predominio de arena (88%). Composición química: (N: 0.01 %; materia orgánica: 1%; P₂O₅: 217 ppm; K₂O: 101 ppm, NaCl: 6 ppm, Mg: 115 ppm; Ca: 62 ppm; pH: 6). Se sembraron las macetas con 10 semillas cada una, sin esterilizar. La evaluación fue realizada a las tres semanas de siembra con la utilización de técnicas de evaluación agronómicas convencionales para ensayos de invernadero (Somasegaran y Hoben, 1994), así como la determinación del contenido de clorofila foliar, con un detector de clorofila Minolta SPAD-501 (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998).

Diseño experimental y análisis estadístico: se realizó el análisis de varianza de un experimento bifactorial con un diseño completamente aleatorizado, con el objetivo

Materials and methods

Origin of the Strains: the strains N7, belonging to *A. zeae*, as well as the strain DS2, belonging to *A. canadense*, were used; they were donated by Agriculture and Agri-Food Canada (London). Likewise, the strains A2 AND NRG34, belonging to *S. meliloti* and donated by Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec) were used.

Varieties of wheat and their origins: the varieties (*Triticum aestivum*) of wheat were evaluated: Barrie and Hoffman, donated by Agriculture and Agri-Food Canada (Quebec).

Experimental procedure: methodologies previously described by Sabry *et al.* (1997) and Webster *et al.* (1997) were used. All of the strains grew in medium-solid Yeast-Mannitol (Vincent, 1970) and were suspended in medium liquid Yeast-Mannitol until reaching a cellular concentration of 10^7 - 10^8 UFC/mL. The bacteria inoculum was applied at the moment of planting (1.0mL./seed), with a cellular concentration of 10^7 - 10^8 UFC/mL and diluted in proportion of 1:10 by means of a sterile saline solution (0.85% NaCl). The second inoculum, with the same concentration was applied at 5 days after planting.

Plastic planters were used with .90 kg of unsterilized soil that was collected in areas belonging to Agriculture and Agri-Food Canada, Experimental Delhi Station (Lond, Ontario, Canada) (42° 5' latitude north, 80° 3' longitude west). This soil is classified as *Brunisolic Gray Brown Luvisol* (Canadian System of Soil Classification) (Chapman and Putman, 1966) and is characterized for its predominance of sand (88%). The chemical composition is: (N: 0.01 %; organic material: 1%; P₂O₅: 217 ppm; K₂O: 101 ppm, NaCl: 6 ppm, Mg: 115 ppm; Ca: 62 ppm; pH: 6). The planters were planted with 10 seeds in each without sterilization. The evaluation was done three weeks from planting with the use of conventional agronomic evaluation techniques for greenhouse trials (Somasegaran and Hoben, 1994), along with the determination of foliar chlorophyll content with a chlorophyll detector Minolta SPAD-501 (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998).

Experimental design and statistical analysis: the variance analysis was carried out for the bi-factorial experiment with a completely randomized design, with

de evaluar dos variedades de trigo con 10 tratamientos: control fertilizado químicamente (NH_4NO_3 : 150 ppm N/kg de suelo), tratamientos inoculados con las cepas NRG34, A2, N7, DS2; tratamientos coinoculados con NRG34+N7, A2+N7, NRG34+DS2, A2+DS2, así como el control absoluto. Se utilizaron 4 réplicas, y se evaluaron 5 plantas por tratamiento. Las diferencias entre las medias para la interacción de los dos factores y del tipo de fertilización, se determinaron mediante Duncan (1955) y las diferencias entre las variedades se determinaron con t-Student. Los datos fueron procesados en SPSS/PC versión 15.0 para Windows. Se evaluaron las variables: peso seco aéreo (g/planta), peso seco radical (g/planta), longitud del tallo (cm/planta), germinación (%) y contenido de clorofila foliar (SPADS/planta).

Resultados y discusión

La longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical difirieron ($p < 0.001$) sólo al comparar las variedades de trigo probadas. En el Cuadro 1 se observa que para la longitud del tallo, Hoffman muestra un comportamiento superior (10.11 cm). También esta misma variedad se mantiene por encima de Barrie para el peso seco aéreo (1.08 g/planta) y el peso seco radical, con 0.61 g/planta.

Cuadro 1. Resultados del análisis de varianza del factor variedad con las variables longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical en las variedades de trigo evaluadas.

Table 1. Results of the variance analysis for the variety factor with variables of length of stem, dry air weight, and dry root weight in the evaluated wheat varieties.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Peso seco aéreo (g/planta)	Peso seco radical (g/planta)
Hoffman	¹ 10.11a	1.08a	0.61a
Barrie	7.94b	0.78b	0.48b
C.V. (%)	16.28	8.81	12.20
Significación	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

¹letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente.

Es evidente que existió una alta diferenciación entre los representantes de las dos variedades al constatar la superioridad de la variedad Hoffman. Esta diferencia de significación estadística indica una influencia marcada de la variedad vegetal en las variables agronómicas antes mencionadas. Askary *et al.* (2009) encontraron que la coinoculación de trigo con *Azospirillum brasilense* y *Sinorhizobium meliloti* influyó favorablemente en determinados parámetros de crecimiento de la planta,

the objective to evaluate the two types of wheat with 10 treatments: control chemically fertilized (NH_4NO_3 : 150 ppm N/kg de suelo), inoculated treatments with strains NRG34, A2, N7, DS2; co-inoculated treatments with NRG34+N7, A2+N7, NRG34+DS2, A2+DS2, as well as absolute control. Four replicas were used and five plants for treatment were evaluated. The differences between the modes of interaction of the two factors and the type of fertilization were determined by Duncan (1955) and the differences between varieties were determined with a T-test. The data was processed in SPSS/PC version 15.0 for windows. The variables were evaluated: dry air weight (g/plant) dry root weight (g/plant), length of stem (cm/plant) germination (%) and foliar chlorophyll content (SPADS/plant).

Results and discussion

The length of the stem, dry air weight, and dry root weight differed ($p < 0.001$) only upon comparing the tested wheat varieties. In table 1, the length of the stem can be shown; Hoffman shows a superior performance (10.11 cm). Also, these same varieties remain above Barrie in the dry air weight (1.08 g/plant) and the root weight with 0.61 g/plant.

It is evident that a great difference exists between the two varieties upon verifying the superiority of the Hoffman variety. This difference of statistical significance indicates a marked influence of the plant variety aforementioned agronomic variables. Askary *et al.* (2009) found that co-inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Sinorhizobium meliloti* favorably influenced the determination of parameters for plant growth, but that these results also depended on the variety of wheat that

pero que esos resultados dependieron también de las variedades de trigo utilizadas. Diversos autores, como Döbbelaere *et al.* (2002) y Pecina-Quintero *et al.* (2005) consideraron que la respuesta de la planta a la inoculación depende de factores diversos, entre los que se encuentra el genotipo de la planta, lo cual se corrobora en el informe de Van Loon (2006), de que las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* alteran la expresión genética de las plantas en raíces y hojas a diferentes niveles, lo cual es un indicativo del reconocimiento de uno o más factores bacterianos determinantes por los receptores específicos de la planta.

Esta propiedad indudablemente debe variar entre las especies vegetales por estar condicionada, tanto al genotipo vegetal, como al genotipo del microorganismo. También Bosco *et al.* (2006) detectaron una clara tendencia en la correlación entre las variedades de plantas y el efecto de un inóculo probiótico, compuesto de bacterias rizosféricas y micorrizas vesículo arbusculares.

Esta tendencia de la influencia de la variedad en los resultados agroproductivos se observó también en la interacción de los factores variedad x tipo de fertilización, la cual presentó en el análisis de varianzas diferencias significativas ($p < 0.001$) ante peso seco aéreo y peso seco radical. En el Cuadro 2 se observa, en peso seco aéreo, que los tratamientos más sobresalientes fueron Hoffman-fertilizado (1.34 g), Hoffman+N7 (1.19 g) y Hoffman-control absoluto (1.12 g). El primer tratamiento fue estadísticamente superior al resto, excepto Hoffman+N7. Es evidente la marcada influencia del factor variedad en dicha interacción de factores, pero también la población autóctona de la rizosfera debió jugar un papel importante. Según Chelius y Triplett (2000) estas rizobacterias, al igual que las introducidas, se asocian a las raíces de la planta debido a la influencia de compuestos orgánicos producto de los exudados radicales, como carbohidratos, ácidos orgánicos y factores de crecimiento microbiano. Una prueba de ello fue, que en peso seco radical, aunque persistió la influencia varietal en los resultados, los valores estadísticamente superiores correspondieron a Hoffman-control absoluto (0.84 g), el cual compartió superíndices comunes con Hoffman+A2+DS2 (0.79 g), Hoffmann+NRG34+DS2 (0.74 g), Hoffman+N7 (0.65 g) y Hoffman+DS2 (0.62 g). Al igual que en peso seco aéreo, los valores inferiores correspondieron a los tratamientos de la variedad Barrie.

was used. Various authors like Döbbelaere *et al.* (2002) y Pecina-Quintero *et al.* (2005) considered that the plant response to inoculation depended on diverse factors, amongst those whose plant genotype is found. This would corroborate Van Loon's (2006) report, that the bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, altered the genetic expression of the plants in their roots and leaves at different levels- which would be a recognition indicator of one or more bacterial factors determined by the specific receptors of the plant.

This property should undoubtedly vary between plant species by conditioning, both the plant genotype as the genotype of the microorganism. Also Bosco *et al.* (2006) detected a clear tendency in the correlation between the plant varieties and the effect of the probiotic inoculation, composed of the rhizospheric and vesicular arbuscular bacteria.

This tendency of the varietal influence, in the agro-productive results, was also observed in the interaction of the variety factors, type x of fertilization, which presents a variance analysis with significant difference of significant difference e ($p < 0.001$) when faced with dry air weight and dry root weight. In table 2, the dry air weight can be observed; the most significant treatments were Hoffman-fertilized (1.34 g), Hoffman +N7 (1.19 g) and Hoffman-absolute control (1.12 g). The first treatment was statistically superior to the rest, minus that of Hoffman+N7. It is evident that there is a marked influence in the variety factor in said factor interactions, but that also, the native population of rhizosphere should play an important role. According to Chelius and Triplett (2000) these rhizobacteria, just like the introduced bacteria, is associated with the plant roots given the influence of the composed organic products of the exuded roots, like carbohydrates, organic acids and microbial growth factors. A test of this was, that in dry weighing the root, even though varietal influence of the results persisted, the superior statistic values corresponded to Hoffman-control absolute (0.84 g) of which shared super-indexes in common with Hoffman+A2+DS2 (0.79 g), Hoffmann+NRG34+DS2 (0.74 g), Hoffman+N7 (0.65 g) and Hoffman+DS2 (0.62 g). Just like in dry air weight, the lesser values corresponded to the treatment of the Barrie variety.

In these results, it can be observed that, apart from the influence of the variety, there are other patterns: on one hand, there is the marked influence of the native rhizobacteria,

Cuadro 2. Resultados del análisis de varianza de la interacción variedad x tipo de fertilización con las variables peso seco aéreo y peso seco radical.**Table 2. Results from the variance analysis of the variety x type interaction of fertilizer with the variables dry air weight and dry root weight.**

Tratamientos	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Barrie+A2	0.79 efgh	0.49 cdefg
Barrie+NRG34	0.79 efgh	0.39 efg
Barrie+N7	0.76 fgh	0.51 cdefg
Barrie+DS2	0.78 efgh	0.50 cdefg
Barrie+A2+N7	0.70 gh	0.43 defg
Barrie+NRG34+N7	0.88 cdefg	0.60 bcdef
Barrie+A2+DS2	0.76 fgh	0.49 cdefg
Barrie+NRG34+DS2	0.62 h	0.36 fg
Barrie-control absoluto	0.84 defgh	0.58 bcdef
Barrie-control fertilizado	0.74 gh	0.30 g
Hoffman+A2	0.79 efgh	0.53 cdefg
Hoffman+NRG34	1.09 bc	0.58 bcdef
Hoffman+N7	1.19 ab	0.65 abcd
Hoffman+DS2	1.10 bc	0.62 abcde
Hoffman+A2+N7	1.01 bcde	0.52 cdefg
Hoffman+NRG34+N7	0.99 bcdef	0.44 defg
Hoffman+A2+DS2	1.05 bcd	0.79 ab
Hoffman+NRG34+DS2	1.09 bc	0.74 abc
Hoffman-control absoluto	1.12 b	¹ 0.84a
Hoffman-control fertilizado	1.34 a	0.51 cdefg
Significación	$p < 0.001$	$p < 0.001$

¹letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente.

En estos resultados se pueden observar, además de la influencia de la variedad, otros dos patrones: por una parte la influencia marcada de las rizobacterias autóctonas, y por otro, el componente cepa N7 (*Azospirillum zae*) en tratamientos donde se comparten valores altos estadísticamente similares entre sí. Este último patrón también se repite con el factor tipo de fertilización (Cuadro 3). Estos resultados parecen guardar estrecha relación con la secreción específica de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal por las rizobacterias y la forma de incidir éstas en las variables agronómicas de la planta. Brasil *et al.* (2005 y 2006), así como Kuss (2006), encontraron presencia de *Azospirillum* no sólo en el interior de las raíces, sino también en la parte aérea de las plantas, debido a lo cual esta bacteria puede presentar ventajas sobre otros géneros bacterianos de la rizosfera.

but on the other, the component strain N7 (*Azospirillum zae*) in treatment where there is a sharing of high statistical values that have similarity between them. This last pattern also repeats with the factor type of fertilization (Table 3). These results appear to be closely related with the specific secretion of substances that are plant growth stimulators due to the rhizobacteria and the form of stress on the agronomic variables of the plant. Brasil *et al.* (2005 and 2006), found that the presence of *Azospirillum* is not only in the interior of the roots, rather it is also in the aerial part of the plant, and as such, this bacteria can present advantages over other bacteria genus of rhizosphere.

On the hand, Vessey (2003) assures that the indole acetic acid produced by the rhizobacteria can provoke root initiation and cellular elongation, the production of

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza del factor tipo de fertilización con las variables contenido de clorofila foliar y peso seco radical.

Table 3. Results of the variance analysis for the factor “fertilization type” with the variables of foliar chlorophyll and dry root weight.

Tratamientos	Contenido de clorofila foliar (SPADS/planta)	Peso seco radical (g)
A2	33.85c	0.51abc
NRG34	32.15d	0.49bc
N7	34.07c	0.58abc
DS2	32.19d	0.56abc
A2+N7	35.99b	0.47bc
NRG34+N7	32.10d	0.52abc
A2+DS2	34.14c	0.64ab
NRG34+DS2	33.13cd	0.55abc
Control absoluto	34.33c	0.41c
Control fertilizado	¹ 40.38a	0.71a
C.V. (%)	7.91	11.80
Significación	$p < 0.001$	$p < 0.001$

¹letras diferentes en una misma columna difieren estadísticamente.

Por otra parte, Vessey (2003) asegura que el ácido indolacético producido por las rizobacterias puede provocar iniciación radicular y elongación celular; la producción de citoquininas puede favorecer la división celular y la expansión de los tejidos; así como las giberelinas influyen en la elongación del tallo. De la forma exacta en que estas sustancias pudieron haber influido en los resultados expuestos no se estudió en este trabajo, pero evidentemente los mismos deben depender de alguna u otra forma del tipo y cantidad de metabolitos segregados por los diferentes géneros y especies de bacterias que se usan en la biofertilización, así como de la población autóctona de la rizosfera. Se impone una profundización adecuada en este campo de estudio.

El contenido de clorofila foliar sólo presentó diferencias significativas ($p < 0.001$) ante los diferentes tipos de fertilización probados. En el Cuadro 3 se observó que el tratamiento fertilizado (40.38 SPADS/planta) presentó los mayores valores ($p < 0.001$) en comparación con el resto de los tratamientos, seguido por el tratamiento inoculado con A2 +N7 (35.99 SPADS/planta). El resultado de dicho tratamiento inoculado pudiera estar vinculado al efecto de las citoquininas en la planta, secretadas en este caso por las cepas que conformaron dicha combinación. Según Zahir *et al.* (2001), en experimentos de campo con arroz existió aumento en el rendimiento y en contenido de N, P y K, después de aplicaciones exógenas de citoquininas; lo cual reafirma la hipótesis de que estas hormonas, suplementadas a través de bacterias, pueden mejorar el crecimiento y rendimiento de los

cytokines can favor the cellular division and expansion of the tissues; just like the gibberellins influence the length of the stem. In the same way that these substances could have influenced in the displayed results that were not studied in this research, but evidently the same should be dependent, one way or another, of the type and quantity of the segregated metabolites by the different genus and species of bacteria that are used in bio-fertilization. Likewise, the native population of rhizosphere merits an adequately deeper look into this field of study.

The foliar chlorophyll content only presented significant differences ($p < 0.001$) in the presence of different types of tested fertilizers. In table 3, it was observed that the fertilized treatment (40.38 SPADS/plant) presented the highest values ($p < 0.001$) when compared to the rest of the treatments, followed by the treatment inoculated with A2 +N7 (35.99 SPADS/plant). The result of said inoculated treatment could have been linked to the effect of the cytokines in the plant, secreted, in this case by the strains that composed the said combination. According to Zahir *et al.* (2001), in field experiments with rice, there was an increase in yield and in N, P, and K content after the exogenous applications of cytokines; this reaffirms the hypothesis that these hormones, supplemented by the bacteria can improve the growth and yield of the crops. Cacciori *et al.* (1989) demonstrated the production of these hormones in *Azospirillum* spp., much like Upadhyaya *et al.* (1991) did in *Rhizobium* spp. Another focus of these

cultivos. Cacciori *et al.* (1989) demostraron la producción de estas hormonas en *Azospirillum* spp., así como Upadhyaya *et al.* (1991) lo hicieron en *Rhizobium* spp. Otro enfoque de estos resultados podría tenerse en cuenta, en base al posible efecto sinérgico de estas cepas. Tejeda *et al.* (2009) consideran que la coinoculación de cultivos de plantas con el empleo de diferentes géneros bacterianos conlleva a efectos positivos.

Askary *et al.* (2009) observaron que la combinación de dos cepas, pertenecientes a *Sinorhizobium meliloti* y a *A. brasilense*, conllevó al aumento 45% de N en grano de trigo en el tratamiento inoculado, en comparación con el control no inoculado. Estos resultados pudieran de la misma forma responder a un sinergismo significativo de la cepa N7 (*A. zeae*) en cuanto a su aporte de nitrógeno a la planta. Además de su alta capacidad de producir ácido indolacético (Reis Junior *et al.*, 2004), existen informes que aseguran la influencia de *Azospirillum* en la formación de raíces laterales en trigo por la secreción de nitritos, producto de la nitratación (Bashan y Holguin, 1997). No se descarta, aún en discrepancia con Mehnaz y Lazarovits (2006), quienes informaron sobre la pobre actividad fijadora de nitrógeno de N7 en maíz; que el tratamiento coinoculado con A2 (*S. meliloti*) y N7, al presentar los mayores índices de clorofila foliar entre los tratamientos inoculados, indicara una fuerte actividad de la enzima nitrogenasa en N7, superior a la de producción de fitohormonas.

Se demostró por Khammas y Kaiser (1992) que la actividad nitrogenásica de *Azospirillum* se incrementa cuando crece en combinación con otras bacterias, incluso cuando éstas provengan de hábitats diferentes; lo que pudo ocurrir con la combinación usada en el presente experimento. Existen informes de Holguin y Bashan (1996) de que un inóculo mixto de *Staphylococcus* y *Azospirillum* promovió la actividad dinitrofijadora de *Azospirillum*; así como la inoculación combinada de *A. brasilense* con *Pseudomonas striata* incrementó significativamente el rendimiento de grano, nitrógeno y absorción de P en sorgo (Alagawadi y Gaur, 1992). Cárdenas *et al.* (2010) observaron altos índices de reducción de acetileno en cepas de *A. brasilense* inoculadas en Guinea (*Panicum maximum* Jacq.), bajo condiciones de campo en Colombia.

Se constató, por otra parte, que las combinaciones de A2+DS2 (34.14 SPADS/planta) y NRG34+DS2 (33.13 SPADS/planta), así como las aplicaciones simples de A2 (33.85 SPADS/planta) y N7 (34.07 SPADS/planta) y el control absoluto (34.33 SPADS/planta), compartieron superíndices

reuslts could be to take into account the possible synergistic effect of these strains. Tejeda *et al.* (2009) considered that the co-inoculation of these cultigens of plants with the employment of different genera of bacteria that entails positive effects.

Askary *et al.* (2009) observed that the combination of the two strains belonging to *Sinorhizobium meliloti* y a *A. brasilense*, meant an increase of 45% of N for the grain of wheat with the inoculated treatment, when compared that the non-inoculated control. These results could, in the same manner respond to a significant synergy of the strain N7 (*A. zeae*) with respect to the contribution of nitrogen to the plant. Apart from its high capacity to produce indoleacetic acid (Reis Junior *et al.*, 2004, there are reports that assert the influence of *Azospirillum* in the formation of lateral roots in wheat through nitrate secretions, a product of nitrification (Bashan and Holguin, 1997). However, the discrepancy of Mehnaz and Lazarovits (2006) is not ruled out; they studied the poor fixative activity of the nitrogen of N7 in maize; the treatment co-inoculated with A2 (*S. meliloti*) and N7, upon presenting the highest foliar chlorophyll indexes amongst the inoculated treatments, was indicated to have strong activity of the enzyme nitrogenase in N7, superior to the production of the phyto-hormones.

It was shown by Khammas and Kaiser (1992) that the nitrogenase activity of *Azospirillum* increases when it grows in combination with other bacteria, even when it comes from different habitats, something that can occur with the combination that was used in the current experiment. There are reports from Holguin and Bashan (1996) that a mixed inoculation of *Staphylococcus* and *Azospirillum* promotes the dinitro-fixative activity of *Azospirillum*; as such, the combined inoculation of *A. brasilense* con *Pseudomonas striata* significantly increased the grain yield, nitrogen and absorption of P in sorghum (Alagawadi y Gaur, 1992). Cárdenas *et al.* (2010) observed high indices of the reduction of acetylene in the strains *A. brasilense* inoculated in Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) under field conditions in Colombia.

It was found, on the other hand, that the combinations of A2+DS2 (34.14 SPADS/plant) y NRG34+DS2 (33.13 SPADS/plant), like the simple applications of A2 (33.85 SPADS/plant) y N7 (34.07 SPADS/plant) and the absolute control (34.33 SPADS/plant) shared super-indices in common and presented values below the previously

comunes y presentaron valores por debajo de los tratamientos antes mencionados, aunque fueron estadísticamente superiores ($p < 0.001$) a NRG34+N7 y a NRG34 (Cuadro 3).

El efecto de estas cepas y de sus combinaciones sobre la planta, pudiera responder a problemas de supervivencia en el suelo que puede variar en dependencia de la cepa. Okon (1982) aseguró que en suelo no estéril los microorganismos nativos interfieren con la colonización de la bacteria *Azospirillum*. Según Prigent-Combaret *et al.* (2007), la actividad fitoestimuladora de *Azospirillum* puede ser reducida por la presencia de ciertas especies de *Pseudomonas* en el suelo. Además, Kiers y Denison (2008) demostraron que las cepas de rizobios pueden variar significativamente en su habilidad de mejorar las variables agronómicas de los cultivos; desde no tener ningún impacto, hasta incrementar los rendimientos el doble o el triple en comparación con el tratamiento no inoculado.

Es válido tener en cuenta también de que Hilali *et al.* (2001) reportaron que varias cepas pertenecientes a *Rhizobium leguminosarum*, tuvieron diferentes efectos en el rendimiento de trigo en dependencia del tipo de suelo. Se demostró por Egamberdiyeva *et al.* (2006) que los diferentes tipos de suelo afectan la eficiencia promotora del crecimiento vegetal de las rizobacterias en trigo, chícharo, algodón y maíz. En el actual ensayo, sólo se utilizó un tipo de sustrato, por lo que se desconoce de qué forma podrían influir en las plantas las cepas evaluadas al utilizar otros ambientes edáficos.

También en el Cuadro 3, esta vez sin la intervención del factor varietal que pudiera enmascarar de cierta forma el efecto de la inoculación, se observó en peso seco radical que la combinación de la cepa A2 (*Sinorhizobium meliloti*) con DS2 (*Azospirillum zae*), superó al control absoluto (0.41 g) ($p < 0.001$), aunque se igualó al control fertilizado (0.71 g) y al resto de los tratamientos. Independientemente que la producción de la auxina indol-3-acido acético (AIA), está reconocida como un factor importante en las habilidades directas de *A. brasilense* en su efecto promotor del crecimiento vegetal (Dobbelaere *et al.*, 2001), el efecto producido por esta combinación de cepas pudiera deberse a que la inoculación con rizobios con capacidad estimuladora del crecimiento vegetal, conlleva a cambios morfológicos en las raíces (Biswas, 1998), por lo que las hormonas producidas específicamente por estas dos cepas, quizás ejercieron un mayor estímulo en el desarrollo del sistema radical de la planta, lo que conllevó a un efecto superior al producido por las demás cepas. Este efecto pudiera tenerse en cuenta en la aplicación práctica de estos estudios, para la inoculación de cultivos en condiciones

mentioned treatments, even though they were statistically superior ($p < 0.001$) a NRG34+N7 y a NRG34 (Cuadro 3). The effect of these strains and their combinations over the plant, could respond to the soil survival problems that can vary depending on the strain. Okon (1982) asserted that the in unsterile soil, native micro-organisms interfere with the colonization of the *Azospirillum* bacteria. According to Prigent-Combaret *et al.* (2007), the phyto-stimulating activity of *Azospirillum* can be reduced by the presence of certain species of *Pseudomonas* in the soil. Furthermore, Kiers and Denison (2008) reported that various strains belonging to *Rhizobium leguminosarum*, had different effects on the wheat yield, depending on the type of soil. It was shown by Egamberdiyeva *et al.* (2006) that the different types of soil affect the efficiency promoter of vegetation growth of the rhizobacteria in wheat, pea, cotton, and maize. In the actual trial, only a type of substratum was used, because it is unknown how the evaluated strains could affect the plants upon using other soil environments.

Also in Table 3, this time without the intervention of the varietal factor, that could disguise in a way, the inoculation effect, the dry root weight with the combination of the A2 strain (*Sinorhizobium meliloti*) with DS2 (*Azospirillum zae*) was observed; it superseded the absolute control (0.41 g) ($p < 0.001$), even though it was equaled to the fertilized control (0.71 g) and the rest of the treatments. Independent of the production of auxin indole-3-acetic acid (ALA), *A. brasilense* is known as an important factor in the direct abilities of in its prompting effect of plant growth (Dobbelaere *et al.*, 2001). The produced effect by this combination of strains could be attributed to the inoculation with rhyzobes, with the stimulating capacity of plant growth, leading to morphological changes in the roots (Biswas, 1998). The hormones produced for these two specific strains, perhaps acted as a greater stimulate in the development of the root system of the plant, which led to a superior result upon producing for the other strains. This effect could be taken into account with the practical application of these studies, for the inoculation of the cultigens in specific hydric stress conditions, for the advantage off efficient of absorption of humidity and nutrients that presuppose a developed root system (Yang *et al.*, 2009).

It should be highlighted that the percentage of germination, did not present significant differences in any of the measured cases, which indicates a homogenous behavior

de estrés hídrico, por la ventaja de absorción eficiente de humedad y de nutrientes que presupone un sistema radical desarrollado (Yang *et al.*, 2009).

Es de destacar que el porcentaje de germinación, no presentó diferencias significativas en ninguno de los casos medidos, lo cual indica un comportamiento homogéneo del potencial germinativo en las variedades probadas ante los diferentes tipos de fertilización. Similares resultados encontraron Canto-Martin *et al.* (2004), al inocular semillas de ají con *Azospirillum*. Asimismo, Tang (1995), informó que la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en *Panicum máximum* y *Cenchrus ciliaris* tuvo un efecto negativo en la germinación de las plántulas. Torres *et al.* (2003) no observaron diferencias entre tratamientos en semillas de *Phaseolus vulgaris*, inoculadas con *A. brasilense*, *A. chroococcum* y *Rhizobium leguminosarum*, de forma simple, o combinada. Sin embargo, Bécquer y Salas (inédito) encontraron que *Sporobolus cryptandus* presentó un incremento de 20% en la germinación con relación al control absoluto, al ser inoculado con una cepa comercial de *Sinorhizobium fredii*. De forma similar, Santillana *et al.* (2005) informaron de un aumento 20% de germinación con respecto al control, en semillas de tomate inoculadas con *Rhizobium* sp.

Conclusiones

La inoculación combinada de la cepa A2 (*Sinorhizobium meliloti*) con la cepa N7 (*Azospirillum zea*), fue la de mayor influencia positiva en el contenido de clorofila de las plantas, debido probablemente a un incremento de la actividad de la enzima nitrogenasa en *Azospirillum*, provocado por su combinación con *Sinorhizobium*.

Existió una alta diferenciación entre las dos variedades de trigo en la longitud del tallo, peso seco aéreo y peso seco radical, lo que indica una influencia marcada de las características varietales de las plantas en dichas variables.

Los resultados en peso seco aéreo y peso seco radical, al combinarse los dos factores estudiados, dependieron notablemente de las características varietales de la planta y del efecto significativo de la población autóctona de rizobacterias.

La germinación de las plantas no estuvo vinculada a ninguno de los factores aplicados en el experimento.

of germinating potential in the tested varieties that were confronted with different types of fertilization. Canto-Martin *et al.* (2004) found similar results upon inoculating chili seeds with *Azospirillum*. Likewise, Tang (1995) said that the inoculation with *Azotobacter chroococcum* in *Panicum maximum* and *Cenchrus ciliaris* had a negative effect on the germination of seedlings. Torres *et al.* (2003) did not observe differences between treatments in *Phaseolus vulgaris* seeds inoculated (both simple and combined) with *A. brasilense*, *A. chroococcum* y *Rhizobium leguminosarum*. However, Bécquer y Salas (unpublished) found that *Sporobolus cryptandus* present an increase of 20% in the germination with relation to the absolute control, upon being inoculated with a commercial strain of *Sinorhizobium fredii*. In a similar fashion, Santillana *et al.* (2005) said that a 20% increase in germination with respect to the control in tomato seeds inoculated with *Rhizobium* sp.

Conclusions

The combined inoculation of the A2 (*Sinorhizobium meliloti*) strain and the N7 (*Azospirillum zea*) strain had the greatest positive influence on the chlorophyll content of the plants, probably due to the increase in activity of the nitrogenase enzyme in *Azospirillum*, provoked by the combination of *Sinorhizobium*.

There was a great difference between the two wheat varieties in terms of the length of stem, dry air weight, and dry root weight, which indicated a marked influence in the varietal characteristics of the plants in said varieties.

The results in dry air weight and dry root weight, upon combining the two studied factors, notably depended on the varietal characteristics of the plant and on the significant effect of the native population of rhizobacteria.

The germination of the plants was not linked to any of the applied factors in the experiment.

End of the English version



Agradecimientos

Este trabajo fue llevado a cabo con la ayuda de una beca concedida por el Centro de Desarrollo Internacional, Ottawa, Canadá.

Literatura citada

- Alagawadi, A. R. and Gaur, A. C. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphatesolubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.) in dry land. Trop. Agric. 69:347-350.
- Antoun, H. and Prévost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: PGPR: biocontrol and biofertilization. Siddiqui, Z. A. (ed.). 318 p.
- Anyá, A. O.; Archambault, D. J.; Bécquer, C. J. and Slaski, J. J. 2009. Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies. In: microbial strategies for crop improvement. Khan, M. S. et al. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter. 4:287-300.
- Askary, M.; Mostajeran, A.; Amooaghaei, R. and Mostajeran, M. 2009. Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 5:296-307.
- Bai, Y.; Zhou, X. and Smith, D. L. 2003. Crop ecology, management and quality: Enhanced Soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Sci. 43:1774-1781.
- Bashan, Y.; Holguin, G. and de-Bashan, L. E. 2004. Responses of agronomically *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances. Can. J. Microbiol. 50:521-577.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43:103-121.
- Bécquer, C. J. y Salas, B. Influencia de diferentes bacterias rizosféricas en la germinación y otras variables fisiológicas de *Sporobolus cryptandus*. Proyecto internacional de colaboración Alberta Research Council (Alberta, Canada)-Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus. Inédito.
- Biswas, J. C. 1998. Effect of nitrogen fixing bacteria on growth promotion of lowland rice (*Oryza sativa* L.). PhD Thesis. Los Baños, Dep. Of Soil Sci., Univ. of Philippines.
- Bosco, M.; Boldini, M.; Magnani, R.; Guiati, B. and Picard, C. 2006. Variety-specific differential response to commercial PGPR and probiotic inocula in vegetable plant production. Abstracts 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Noordwijkerhout, The Netherlands. Poster, O. 9. 17 p.
- Brasil, M. S.; Baldani, J. I. e Baldani, V. L. 2005. Ocorrencia e diversidade de bacterias diazotroficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. R. Bras. Ci. Solo. 29:179-190.
- Brasil, M. S.; Baldani, V. L.; Baldani, J. I. e Manhaes, S. 2006. Efeitos da inoculacao de bacterias diazotroficas em gramíneas do Pantanal. Bolsista de Pos-Graduacao da UFRRJ, em Seropedica-RJ.
- Cacciori, I.; Lippi, D.; Pietrosanti, T. and Pietrosanti, W. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. Plant Soil. 115:264-271.
- Canto-Martin, J. C.; Medina-Peralta, S. y Morales, Avelino, D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). Tropical Subtropical Systems. 4:21-27.
- Cárdenas, D. M.; Garrido, Ma. F.; Bonilla, R. R. y Baldani, V. L. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos y Forrajes. 33:285-300.
- Carolina, R. y Lorda, G. 2009. Producción de inoculantes mixtos: desarrollo de procesos fermentativos para el cultivo conjunto de *Bradyrhizobium japonicum* y *Pseudomonas fluorescens*. Memorias XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba. 232 p.
- Chapman, L. J. and Putman, D. F. 1966. Physiography of southern Ontario. Univ. of Toronto Press, Toronto. 150 p.
- Chelius, M. K. and Triplett, E. W. 2000. Prokaryotic nitrogen fixation; model system for the analysis of a biological process. (Ed.) Horizont Scientific Press. Hwitts Lane Wymondahm NR18. England. 1-20 pp.
- Dakora, F. D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. New Phytol. 158:39.

- Döbbelaere, S. A.; Croonenborghs, A.; Thys, D.; Ptacek, J.; Vanderleyden, P.; Dutto, C.; Labandera-González, J.; Caballero-Mellado, J.; Francisco Aguirre, F.; Kapulnik, Y.; Brener, S.; Burdman, S.; Kadouri, D.; Sarig, S. and Okon, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol. 28:871-879.
- Döbbelaere, S. A.; Croonenborghs, A.; Thys, D.; Ptacek, J.; Vanderleyden, P. and Okon, Y. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol. Fertil. Soils. 36:284-297.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics. 11:1.
- Egamberdiyeva, D.; Kucharova, Z. and Gafurova, L. 2006. The soil type affects plant growth promoting bacterial efficiency. Abstracts 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Noordwijkerhout. The Netherlands. 23-51 pp.
- Hilali, A.; Prévost, Danielle; Broughton, W. J. and Antoun, H. 2001. Effects de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. Can. J. Microbiol. 47:590-593.
- Holguin, G. and Bashan, Y. 1996. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with mangrove rhizobacteria *Staphylococcus* sp. Soil Biol. Biochem. 28:1651-1660.
- Khammas, K. M. and Kaiser, P. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. Ca. J. Microbiol. 38:794-797.
- Kiers, E. T. and Denison, R. F. 2008. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 39:215-236.
- Kuss, A. V. 2006. Fixacao de nitrogenio por bacterias diazotroficas em cultivares de arroz irrigado. Tese de Doutorado. Programa de Pos-Graduacao em Ciencia do Solo. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciencias Rurais.
- Mehnaz, S. and Lazarovits, G. 2006. Isolation of PGPR from corn and their beneficial effects on two corn varieties under green house and field conditions. Abstracts 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Noordwijkerhout. The Netherlands. 43-61 pp.
- Mehnaz, S.; Kowalik, T.; Reynolds, B. and Lazarovits, G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. Soil Biol. Biochem. 42:1848-1856.
- Okon, Y. 1982. Recent progress in research on biological nitrogen fixation with non leguminous crops. Phosphorous Agric. 82:3-8.
- Pecina-Quintero, V.; Díaz-Franco, A.; Williams-Alanis, H.; Rosales-Robles, E. y Garza-Cano, I. 2005. Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en Sorgo. Rev. Fitotec. Mex. 28:389-392.
- Prigent-Combaret, C.; Couillerot, O.; Pothier, J. F.; Poirier, Marie-Andrée.; Challita, E. and Moëgne-L. Y. 2007. Effect of the biocontrol compound 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* on *Azospirillum* PGPR. Abstracts Rhizosphere' 2007. International Conference Montpellier. 17 p.
- Reis Junior, R. B.; Silva, M. F.; Teixeira, K.; Urquiaga, S. e Reis, V. M. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormonio pela bacteria. R. Bras. Ci. Solo. 28:103-113.
- Rodríguez-Mendoza, M. N.; Alcántar, G.; Aguilar, A.; Etchevers, D. J. y Santizo, J. A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra Latinoamericana. 16:135-141.
- Rodríguez, H.; Fraga, R.; González, T. and Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant Soil. 287:15-21.
- Rodríguez, J.; Tejeda, G.; Fresneda, J.; Mesa, E. A.; Ortega, M.; García, A.; Soca, U.; Cañizares, K.; Martínez-Viera, R.; Ríos, Y. y Fey, L. 2009. Aplicación de DIMABAC: bioproducto mixto con efectividad biocontrol sobre tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.). Memorias XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba. 223 p.
- Sabry, S. R. S.; Saleh, S. A.; Batchelor, C. A.; Jones, J.; Jotham, J.; Webster, G.; Kothari, S. L.; Davey, M. R. and Cocking, E. C. 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. Proc. R. Soc. Lond. B. 264:341-346.

- Santillana, N.; Orellana, C. y Zúñiga, D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller.). Ecol. Aplicada. 4:1-2.
- Sarig, S.; Okon, Y. and Blum, A. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of Sorghum bicolor roots. J. Plant Nutr. 15:805-819.
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag. New York. 450 p.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24:487-506.
- Tang, M. 1995. Efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* en la germinación y altura de las plántulas en dos leguminosas y dos gramíneas. Pastos y Forrajes. 18:145-150.
- Tejeda, G.; Rodríguez, J.; García, R.; Dibut, B.; Martínez-Viera, R.; Ríos, Y.; Socas, U.; Ortega, M.; Pérez, R.; Mesa, E.; Fey, L.; Martínez, A.; Izquierdo, L. y Cañizares, K. 2009. Biopreparado mixto a partir de *Bacillus subtilis* y *Azotobacter* sp. para la estimulación del crecimiento vegetal y la prevención de enfermedades en cultivos hortícolas. Memorias XXIV RELAR. La Habana, Cuba. 226 p.
- Torres, R.; Pérez, C. y Suarez, N. 2003. Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Agrícola. 30:56-60.
- Upadhyaya, N. M.; Lethm, D. S.; Parker, C. W.; Hocart, C. H. and Dart, P. J. 1991. Do rhizobia produce cytokinins? Biochem. Int. 24:123-130.
- Van Loon, L. C. 2006. Plant responses to PGPR. Abstracts 7th International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Noordwijkerhout, The Netherlands. 13 p.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 164 p.
- Vessey, K. J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Kluwer Academic Publishers. Plant Soil. 255:571-586.
- Webster, G.; Gough, C.; Vasse, J.; Batchelor, C. A.; O'Callaghan, K. J. O.; Kothari, S. L.; Davey, M. R.; Dénarie, J. and Cocking, E. C. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. Plant Soil. 194:115-122.
- Zahir, Z. A; Asghar, H. N. and Arshad, M. 2001. Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. Soil Biochem. 33:05-408.
- Yang, J.; Kloepper, J. W. and Choong-Min, R. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. In: Trends Plant Sci. 14(1)1-4.