

# Efecto de *Azospirillum* sp sobre la altura de planta y biomasa en dos líneas de maíz forrajero

## Effect of *Azospirillum* sp upon plant height and biomass of two forage maize inbred lines

Rosalinda Mendoza-Villarreal<sup>1</sup>, Sergio Rodríguez-Herrera<sup>1</sup>, Marco Aurelio Puente-Flores<sup>2</sup>

E-mail: rosalindamendoza@hotmail.com

Depto. Ciencias Básicas. <sup>2</sup>Depto. Fitomejoramiento, <sup>3</sup>Estudiante Maestría en Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México. C.P. 25315.

### Abstract

Quality forage maize production is a commodity demanded by the dairy cattle industry. Years ago, maize varieties for forage were selected based mainly on high dry matter; at present, selection is applied toward plant and grain nutritional quality in order to increase cows milk production; in doing so, chemical fertilizers are the main source of plant-grain quality. However an alternative to chemicals is by the use of certain kinds of bio-fertilizers, as the ones made from fungi or bacteria. This research was initiated isolating strains of *Azospirillum* sp. in the locations: Buenavista and Torreon, state of Coahuila; and Celaya, Gto., Mexico. Cultures of them were inoculated on seeds previous to sowing in greenhouse. Experimental results have shown differences for plant height (+10.5 cm) comparing inoculated and check plants in line CML-321 (normal nitrogen content) using strain 22 from Celaya; a greater height difference (15.1 cm) was found in CML-384 (low nitrogen content) using strain 7 from Torreon. Bio-fertilizing maize seeds with a counting of  $10^6$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$  promoted the seedlings growth by an increase of auxins and gibberellins. From these data it can be concluded that strains 22 and 7 are suitable as bio fertilizers, and that inbred line CML-321 was the best in using it for higher root and shoot fresh and dry weights.

**Key words:** *Azospirillum* sp., bio-fertilizer, *Zea mays* L. forage, plant height.

### Resumen

El maíz forrajero sirve como alimento del ganado lechero, siendo necesaria la producción de forraje de calidad. Años atrás se seleccionaba en base a contenido de materia seca, pero en la actualidad se requiere de un contenido nutricional de planta-grano, que incremente la producción de leche. Variedades forrajeras de calidad toman los nutrientes de fertilizantes químicos. Una alternativa a esta fuente la constituyen los bio-fertilizantes a base de bacterias u hongos. Este trabajo de investigación se inició con el aislamiento de 40 cepas de *Azospirillum* sp., en las localidades de Torreón y Buenavista, Coahuila, y Celaya, Gto. en México. Después, se inoculó la semilla antes

de la siembra en invernadero, los resultados de altura de planta muestran diferencia de 10.5 cm con la cepa de 22 de Celaya en relación al testigo con la línea CML- 321 (contenido normal de nitrógeno) y 15.1 cm con la cepa 7 de Torreón en la línea CML-384 (bajo contenido de nitrógeno). La bio-fertilización con *Azospirillum* a la semilla a  $10^6$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  promovió el crecimiento de la planta de Maíz por el incremento en las auxinas y giberelinas. Se concluye que las mejores cepas nativas son la 22 y 7 aisladas de raíces de maíz en Celaya, Gto. y Torreón, Coahuila, respectivamente y la línea de contenido normal de nitrógeno produce mayor peso fresco y seco de follaje y raíz.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, bio-fertilizantes, *Zea mays* L., forraje, altura de planta.

## Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays*), tradicionalmente se ha utilizado por las familias mexicanas para consumo alimenticio, aunque el maíz ensilado es uno de los componentes importantes de la dieta del ganado lechero, porque constituye un tercio de su ración diaria. El maíz forrajero de calidad se selecciona con base a la materia seca, sin importar tanto su calidad nutritiva (Núñez *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2002). Una adecuada fertilización incrementa la materia seca y la calidad nutritiva del forraje, lo cual es importante porque éste se ha convertido en la dieta diaria del ganado lechero

Por tradición, los fertilizantes químicos se han utilizado para proporcionar los nutrientes que la planta necesita, sin embargo, se han detectado problemas de contaminación, y para disminuir este problema, una alternativa es el uso de fertilizantes orgánicos, entre los que se encuentran las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico. Las bacterias del género *Azospirillum* (Dobereiner, 1992) tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, ya que interactúan con las raíces de la planta; estas bacterias se han aislado de raíces de maíz, arroz, trigo y pastos (Paredes –Cardona *et al.*, 1988).

Se encontró que existe especificidad de especie en los cultivos, ya que el *Azospirillum lipoferum* es específico para maíz, y el *A. Brasilense*, para trigo (Baldani *et al.*, 1980). En maíz, el *A. sp* y *brasilense* tuvieron una influencia positiva en la emergencia, floración, altura y madurez fisiológica de planta (Mendoza, 1986). En pastos, la inoculación con *A. brasilense* incrementó la emergencia en un 50 %, y la sobrevivencia de 100 hasta 400 % (Esqueda *et al.*, 2004). En trigo también se aplicaron *Azospirillum* y *Pseudomonas* en forma individual y mezclada, lo que propició un incremento en amacollamiento, altura de planta, longitud de raíces, peso seco y número de granos.

La inoculación con  $10^5$  a  $10^6$  células de *Azospirillum* causó elongación e incremento del total de la raíz, pero  $10^8$  a  $10^9$  células causaron su inhibición (Kapulnik, *et al.* 1985), aunque el *A. brasilense* también produce hormonas del crecimiento como giberelinas, citocininas y auxinas (Zimmer, *et al.*, 1988, 1991; Lucangeli y Botín, 1997).

Debido al beneficio que le proporciona la bacteria a la planta, el objetivo de la investigación fue encontrar las cepas de *Azospirillum* que fijan mayor cantidad de nitrógeno y, por consiguiente, incrementen la altura de planta y la biomasa.

## Metodología Experimental

Se colectaron raíces de maíz de tres localidades (Torreón y Buenavista, Coah. y Celaya, Gto.), y se obtuvieron 40 cepas nativas de *Azospirillum* sp, las cuales se reprodujeron y aplicaron a la semilla, en concentración de  $10^6$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  en dos genotipos de maíz forrajero; una línea con bajo contenido de nitrógeno (CML- 384) y otra con contenido normal de nitrógeno (CML-321), en el laboratorio del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Por otro lado, se esterilizó suelo de bosque, que se tamizó con una malla de 2 mm y depositó en botes de cartón de 1 Kg de capacidad, en el invernadero 4 de Buenavista, en ésta Universidad; se realizó la siembra con cuatro semillas de maíz por bote (la semilla se inoculó un día antes de la siembra) y tres repeticiones de cada cepa, en un diseño completamente al azar.

Se tomaron datos de altura de planta durante cuatro semanas y, después, se cortó la base del tallo separando la raíz, se pesó el follaje y raíz por separado para obtener el peso fresco; posteriormente se secaron ambas en la estufa a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se obtuvo el peso seco o biomasa por diferencia de peso.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS, con el cual se analizaron: líneas, cepas, repeticiones, fechas de muestreo, peso fresco y seco del follaje y de la raíz.

## Resultados y Discusión

El análisis de varianza para altura de planta indica diferencia ( $P 0.01$ ) en la interacción de líneas por cepas, fechas de muestreo y fechas por líneas (Cuadro 1), pero entre líneas sucedió lo contrario. Por otro lado, el análisis de comparación de medias de Tukey (Cuadro 2), en la línea CML-321 muestra que la mejor cepa nativa de *Azospirillum* sp corresponde a Celaya, Gto., con el número 22, aunque también son estadísticamente iguales la 20, 18, 1, 17, 26, 39, 21, 28, 37, y 29. Para la línea CML-384, la que incrementó en mayor medida la altura de planta, fue la 7 aislada, de Torreón, aunque son estadísticamente iguales la 36,23, 3 y 26. Al comparar el testigo con cada línea, se encontró mayor diferencia en la CML-384, quizás por que es una línea con bajo contenido de nitrógeno. Es importante señalar que las cepas antes mencionadas inducen la síntesis de hormonas del crecimiento como auxinas y giberelinas, lo que provoca la respuesta de altura de planta como lo reporta Lucangeli y Botín, 1997.

**Cuadro 1.** Cuadrados medios del ANVA para altura de planta en dos líneas de maíz forrajero inoculadas con 40 cepas de *Azospirillum* sp de tres localidades, en Buenavista, Coah., 2005

FV	GL	CME	F
Línea	1	1.90	0.1683 <sup>NS</sup>
Cepa (línea)	79	2.88	0.0001**
Fecha	3	3094.00	0.0001**
Línea *fecha	3	3.80	0.0101**
Error	237	0.95	

**Cuadro 2.** Comparación de medias de Tukey para altura de planta en línea CML- 321 (1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de Torreón (1-17), Celaya, Gto.(18- 26) y Buenavista, Coah. (27-40)

Línea	Cepa	altura	Línea	Cepa	Altura
1	22	66.71 a	2	7	63.98 a
1	20	66.42 a	2	36	63.72 a
1	18	65.83 a	2	23	63.51 a
1	1	64.10 a	2	3	62.77 a
1	17	64.02 a	2	26	61.39 a
1	26	62.21 a	2	1	59.63 b
1	39	61.91 a	2	24	59.50 b
1	21	61.46 a	2	38	59.38 b
1	28	61.39 a	2	2	59.34 b
1	37	61.06 a	2	9	58.17 b
1	29	60.92 a	2	17	57.49 b
1	15	60.55 a	2	19	56.67 b
1	35	60.51 a	2	39	56.65 b
1	10	59.80 a	2	18	56.56 b
1	23	59.43 b	2	21	56.32 b
1	36	59.36 b	2	37	55.64 b
1	19	59.30 b	2	34	55.14 b
1	24	59.27 b	2	4	55.02 b
1	30	59.24 b	2	31	54.95 b
1	7	58.87 b	2	6	54.88 b
1	9	58.63 b	2	22	53.53 b
1	16	58.17 b	2	29	53.06 c
1	2	58.13 b	2	25	53.03 c
1	24	57.83 b	2	14	51.14 c
1	33	56.39 b	2	20	51.01 c
1	Testigo 41	56.17 b	2	35	50.88 c
1	31	54.95 b	2	30	50.63 c
1	8	54.90 b	2	27	50.24 c
1	32	54.27 c	2	28	49.45 c
1	11	53.61 c	2 Testigo 42		48.88 c
1	6	53.50 c	2	33	48.74 c
1	38	53.42 c	2	13	48.71 c
1	12	51.62 c	2	33	48.58 c
1	34	51.53 c	2	40	48.12 c
1	3	50.80 c	2	11	46.93 c
1	27	50.19 c	2	10	46.17 c
1	40	48.80 c	2	8	45.81 c
1	25	47.47 d	2	15	45.31 d
1	13	41.36 e	2	16	43.25 d
1	5	41.03 e	2	12	41.91 d
1	14	34.14 f	2	42	39.48 d

También se analizó el peso fresco y seco de follaje y de la raíz, el cual indicó diferencia sólo entre líneas, como se muestra en el Cuadro 3, y al comparar las medias por la prueba de Tukey la línea con mayor peso fresco y seco fue la CML- 321, como lo indica el Cuadro 4. Aparentemente solo la línea (genotipo) es el responsable del incremento en el peso de follaje y raíz, sin embargo estos resultados se obtuvieron en el invernadero y no se llevó a hasta la cosecha para evaluar las diferentes etapas fenológicas del maíz forrajero.

**Cuadro 3.** Cuadrados medios de peso fresco y seco con 40 cepas de *Azospirillum* sp en dos líneas de maíz forrajero, CML- 321 (contenido de nitrógeno normal) y CML – 384 (contenido bajo de nitrógeno) en invernadero, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah. México, 2005

FV	PFF			PSF		PFR		PSR	
	GL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F
Línea	1	1386.242	51.08**	13.968	49.29**	202.033	50.74**	4.056	47.90**
Cepa	41	35.099	1.29 <sup>NS</sup>	0.379	1.34 <sup>NS</sup>	5.436	1.37 <sup>NS</sup>	0.072	0.85 <sup>NS</sup>
Línea*cepa	39	36.720	1.35 <sup>NS</sup>	0.352	1.24 <sup>NS</sup>	5.021	1.26 <sup>NS</sup>	0.102	1.20 <sup>NS</sup>
Error	164	27.137		0.283		3.982		0.085	

**Cuadro 4.** Comparación de medias de Tukey para peso fresco y seco de follaje y raíz en línea CML-321(1) y CML- 384 (2), inoculadas a semilla con 40 cepas de *Azospirillum* sp

Línea	PFF		PSF		PFR		PSR	
	Media		Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media
1	16.53 a	1	1.61a	1	3.78a	1	0.71a	
2	11.68 b	2	1.14b	2	1.95b	2	0.43b	

### Conclusiones

La cepa 22 de *Asospirillum* sp aislada, de Celaya, Gto., obtuvo la mayor altura de planta con relación al testigo en la línea con bajo contenido de nitrógeno CML-384, y la cepa 7 aislada, de Torreón, lo fue para la CML-321 (contenido normal). La línea CML-321 obtuvo el mayor peso fresco y seco de follaje y raíz.

### Literatura Citada

- Baldani, V., Lucija, D. y Dobereiner, J. 1980. Host-plant specific infection of cereals with *Azospirillum* spp Soil Biol. Biochem. 12: 433-439.
- Dobereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, pp 2236-2253. In: A. BalowsH. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (Ed.). The prokaryotes: A handbook on the

- biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer Verlag, New York., USA.
- Esqueda, C. M. H., M. L. R. Carrillo, A. C. Melgoza, M. H. M. Royo y J. C. Jiménez. 2004. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas inoculadas con biofertilizantes en condiciones de invernadero. *Tec. Pec. Mex.* 42: 459-475.
- Kapulnik, Y., Gafny, R., Okon, Y. 1985. Effect of *Azospirillum* spp inoculation on root development and NO<sub>3</sub> uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam). *Canadian Journal of Botany* 63: 627-634.
- Lucangeli, C. and Bottini, R. 1997. Effects of *Azospirillum* spp on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Simbiosis.* 23(1): 63-72.
- Mendoza, V. R. 1986. Respuesta del maíz (*Zea maíz* L. var. Lucio Blanco (AN-361) a la inoculación de *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *Azospirillum* sp en Derramadero, Coah., México. Tesis de Maestría. 81 p.
- Núñez. H. G., E.F. Contreras G. R. Faz C y R. Herrera. 1999. Selección de híbridos para obtener mayor rendimiento y alto valor energético en maíz para ensilaje. *In: componentes tecnológicos para la producción de ensilados de maíz y sorgo.* SAGAR-INIFAP CIRNOC-CELAYA. pp. 2-5.
- Paredes, C., E. M. Carcaño. M. A. Mascarua, E. y J. Caballero, M. 1988. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 30: 351-355.
- Zimmer, W., C. Aparicio and C. Elmeric. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3 – acetic acid production in *Azospirillum* identification and sequencing of trp GDC cluster. *Mol. Gen. Genet.* 229: 41-51.
- Zimmer, W., K. Koeben, and H. Bothe. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta* 176: 333-342.