



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA



**EFFECTO DE DOS MOMENTOS DE
INOCULACIÓN DE *Azospirillum* spp. NATIVAS
EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE *Zea
mays* L. EN CONDICIONES DE INVERNADERO**

TESIS

**PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO
ACADÉMICO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

AUTOR:

**TERESITA CRISTINA RUBIÑOS
RIVAS**

Lambayeque-Perú

2017

**EFFECTO DE DOS MOMENTO DE INOCULACIÓN DE *Azospirillum* spp. NATIVAS
EN EL DESARROLLO VEGETATIVO DE *Zeamays* L. EN CONDICIONES DE
INVERNADERO**

.....

Teresita Rubiños Rivas

Autor

.....

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

Asesora

Presentada a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Para optar el grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGIA

APROBADO POR:

Dr. Luis Chicoma Chaqui

(Presidente)

Dra. Carmen Calderón Arias

(Secretario)

Dra. Marlene Cardoso Quinteros

(Vocal)

LAMBAYEQUE – PERÚ

2017

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño primeramente a Dios y a mis padres, porque ellos son mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más, gracias porque su presencia me han ayudado a construir y forjar la persona que ahora soy.

A mi hermana y sobrinos quienes con sus palabras de aliento no dejaban decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpla mis ideales.

A mis profesores, compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas, a todas aquellas personas que durante este año estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

AGRADECIMIENTO

Mi Asesora y profesora Dra. **Carmen Carreño Farfán** quien me dió la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

El jurado integrado por el **Dr. Luis Chicoma Chaqui, Dra. Carmen Calderón Arias y Dra. Marlene Cardoso Quinteros**; por sus correcciones oportunas y completas disposición en la evaluación del trabajo.

Los profesores, por la orientación en la parte investigativa, y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación de postgrado.

Mis amigos y colegas, quienes sin estar involucrados directamente, me dieron su apoyo para seguir adelante.

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays*, en condiciones de invernadero. Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo, a 30°C por 24 horas y con ellas se obtuvo una suspensión de células en solución salina esterilizada, cuya concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría. Con las bacterias se determinó por colorimetría la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y la producción de índoles. El inóculo bacteriano se aplicó en las semillas (307,69 mLKg⁻¹) antes de la siembra y en la rizósfera (4mL plántula⁻¹) a la emergencia de maíz amarillo duro. A los 30, 60 y 90 días se midió la altura de las plantas y se determinó el peso de la biomasa. El análisis de varianza determinó las diferencias entre tratamientos y la prueba múltiple de Tukey la significancia entre ellos. Las bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizaron fosfato tricálcico y produjeron de índoles, cuantificándose 10,55 a 33,17 ppm de amonio; 2,98 a 5,35 ppm de fósforo soluble y 13,88 a 38,75 ppm de índoles. Los cultivos de *Azospirillum* spp. inoculados antes de la siembra y a la emergencia de maíz incrementaron el desarrollo vegetativo, alcanzándose los mayores índices de efectividad en la altura (IE máximo=23,01%), biomasa aérea (IE máximo= 57,14%) y radicular (IE máximo=97,07%), con la inoculación de las bacterias en las semillas antes de la siembra. Se demostró el potencial de *Azospirillum* spp. como promotores del desarrollo vegetativo de maíz.

Palabras claves: Azospirillum, Zea mays, desarrollo vegetativo, inoculación.

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of determining the effect of two inoculation times of *Azospirillum* spp. native to the vegetative development of *Zea mays* under greenhouse conditions. The bacteria were cultured on nutrient agar at 30 ° C for 24 hours and with them a cell suspension was obtained in sterilized saline, the concentration of which was standardized at 9×10^8 cell mL⁻¹ by turbidimetry. Nitrogen fixation, phosphate solubilisation and the production of indoles were determined by colorimetry. The inoculum bacterial was applied to seeds (307.69 mL kg⁻¹) before sowing and in the rhizosphere (4mL seedling⁻¹) to the emergence of hard yellow corn. At 30, 60 and 90 days the height of the plants was measured and the weight of the biomass was determined. The analysis of variance determined the differences between treatments and the Tukey multiple test the significance between them. Nitrogen binding bacteria solubilized tricalcium phosphate and produced indium, with a value of 10.55 to 33.17 ppm ammonium; 2.98 to 5.35 ppm of soluble phosphorus and 13.88 to 38.75 ppm of indoles. Cultures of *Azospirillum* spp. inoculated before planting and the emergence of maize increased the vegetative development, reaching the highest levels of effectiveness in height (maximum IE = 23.01%), aerial biomass (maximum IE = 57.14%) and root biomass = 97.07%), with inoculation of the bacteria in the seeds before sowing. The potential of *Azospirillum* spp. as promoters of the vegetative development of maize.

Keywords: Azospirillum, Zea mays, vegetative development, inoculation.

CONTENIDO

DEDICATORIA _____	III
AGRADECIMIENTOS _____	IV
RESUMEN _____	V
ABSTRACT _____	VI
INTRODUCCION _____	1
CAPITULO I. MARCO TEORICO	
1.1 Base teórica _____	5
1.2 Antecedentes bibliográficos _____	10
CAPITULO II. DISEÑO METODOLOGICO _____	15
2.1 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis _____	15
2.2 Población y muestra de estudio _____	15
2.2.1 Materiales _____	17
2.3 Variables en estudio _____	17
2.3.1 Variables independientes _____	17
2.3.2 Variable dependiente _____	17
2.4 Métodos y procedimientos para la recolección de datos _____	17
2.4.1 Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos _____	17
2.4.2 Segunda fase: Efecto de dos momentos de inoculación De <i>Azospirillum</i> spp. nativas en el desarrollo vegetativo de maíz _____	21
2.4.3 Análisis estadístico de los datos _____	30

CAPITULO III. RESULTADOS _____	32
3.1 Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por <i>Azospirillum</i> spp _____	32
3.2 Efecto de dos momentos de inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. en el desarrollo vegetativo de maíz _____	32
CAPITULO IV. DISCUSIÓN _____	55
CAPITULO V. CONCLUSIONES _____	60
CAPITULO VI. RECOMENDACIONES _____	61
CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS _____	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis Físico - químico del suelo experimental en Lambayeque, 2015 _____	24
Tabla 2.	Valores promedios de temperatura (°C) en Lambayeque enero-marzo de 2015, en Lambayeque _____	24
Tabla 3.	Nitrógeno fijado como amonio, fosforo soluble e índoles producidos por <i>Azospirillum</i> spp _____	33
Tabla 4.	Altura (cm) de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas antes la siembra, 2015 _____	37
Tabla 5.	Índices de efectividad (%) en la altura de <i>Zea mays</i> L. amarilla duro por <i>Azospirillum</i> spp. nativas inoculadas antes de la siembra, 2015 _____	37
Tabla 6.	Biomasa (g) aérea y radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculados con <i>Azospirillum</i> spp. nativas antes de la siembra, 2015 _____	38
Tabla 7.	Índices de efectividad (%) en la biomasa aérea y radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, antes de la siembra, 2015 _____	38
Tabla 8.	Altura (cm) de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015 _____	39
Tabla 9.	Índices de efectividad (%) en la altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro por <i>Azospirillum</i> spp. nativas inoculadas, durante la emergencia, 2015 _____	39
Tabla 10.	Biomasa (g) aérea y radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015 _____	40
Tabla 11.	Índices de efectividad (%) en la biomasa aérea y radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015 _____	40
Tabla 12.	Análisis de varianza de los valores promedios de altura de <i>Zea</i>	

	<i>mays</i> L. amarillo duro, de 30 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> sp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015 _____	42
Tabla 13.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 30 días, inoculados en la siembra y emergencia, 2015 _____	42
Tabla 14.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 30 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, 2015 _____	43
Tabla 15.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 30 días, inoculado <i>Azospirillum</i> spp. nativas en la siembra y emergencia, 2015 _____	44
Tabla 16.	Análisis de varianza de los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 60 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015 _____	45
Tabla 17.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 60 días, inoculado <i>Azospirillum</i> spp. nativas, 2015 _____	46
Tabla 18.	Análisis de varianza de los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015 _____	47
Tabla 19.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado <i>Azospirillum</i> spp. nativas, 2015 _____	48
Tabla 20.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado <i>Azospirillum</i> spp. nativas en la siembra y emergencia, 2015 _____	49

Tabla 21.	Análisis de varianza de los valores promedios de biomasa aérea de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, 90 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015 _____	51
Tabla 22.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado durante la siembra y emergencia, 2015 _____	51
Tabla 23.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa aérea de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado <i>Azospirillum</i> spp. nativas, 2015 _____	52
Tabla 24.	Análisis de varianza de los valores promedios de biomasa radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, 90 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015 _____	53
Tabla 25.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado durante la siembra y emergencia, 2015 _____	53
Tabla 26.	Prueba discriminación de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa radicular de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con <i>Azospirillum</i> spp. nativas, 2015 _____	54

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento para la determinar el efecto de dos momentos de inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. en el desarrollo vegetativo de <i>Zea mays</i> L. _____	16
Figura 2. Caldo extracto de suelo cultivado con <i>Azospirillum</i> spp _____	18
Figura 3. Caldo National Botanical Research Institute's Phosphate cultivado con <i>Azospirillum</i> spp. _____	20
Figura 4. Caldo Tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con <i>Azospirillum</i> spp. _____	20
Figura 5. Ubicación geográfica del invernadero en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Región Lambayeque, enero 2016 (https://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=wl). _____	22
Figura 6. Prueba de germinación de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro híbrido simple. _____	25
Figura 7. Obtención del inóculo bacteriana. _____	25
Figura 8. Homogenizado del insecticida con las semillas de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro. _____	27
Figura 9. Inoculación de <i>Azospirillum</i> sp. nativas en las semillas de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro. _____	27
Figura 10. Semillas de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculadas con <i>Azospirillum</i> spp. nativas. _____	28
Figura 11. Siembra se semillas de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro inoculadas con <i>Azospirillum</i> spp. nativas. _____	28
Figura 12. Inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas en la rizósfera de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro. _____	29
Figura 13. Altura de <i>Zea mays</i> L. amarillo duro, 30 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas durante la siembra, 2015 _	34

Figura 14. Altura de Zea mays L. amarillo duro, 30 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015. _____	34
Figura 15. Altura de Zea mays L. amarillo duro, 60 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015. _____	35
Figura 16. Altura de Zea mays L. amarillo duro, 90 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015. _____	35
Figura 17. Altura de Zea mays L. amarillo duro, 90 días después de la inoculación de <i>Azospirillum</i> spp. nativas, durante la emergencia, 2015. _____	36

INTRODUCCIÓN

El alimento del mundo en su mayoría proviene de siete especies de gramíneas: *Triticum aestivum* L. “trigo”, *Oryza sativa* L. “arroz”, *Secale cereale* L. “centeno”, *Avena sativa* L. “avena”, *Hordeum vulgare* L. “cebada”, *Sorghum* spp. “sorgo” y *Zea mays* L. “maíz”. En el Perú, región Lambayeque; el rendimiento promedio de maíz en el año 2016 fue de 6,3 tha^{-1} ; sin embargo, en Piura fue de 4,8 tha^{-1} y en Pasco con 1,8 tha^{-1} (MINAGRI, 2016). De esta manera, a nivel nacional la oferta no satisface la demanda por lo que se requiere de la importación (INEI, 2015).

Para incrementar el rendimiento de los cultivos agrícolas como el maíz se utilizan fertilizantes sintéticos; sin embargo, cada año aumenta la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor eficiencia de adsorción en el suelo y absorción por la planta. Según la Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes entre 1996 a 2008, el consumo se incrementó en 31% en el mundo y 56% en los países en vías de desarrollo, así como también, el precio de algunos fertilizantes se triplicó, disminuyendo la rentabilidad del cultivo (Nicolalde y Quintana, 2010). La eficacia de recuperación o porcentaje de nutrientes del fertilizante aplicado que es absorbido por la planta, es en promedio 30% para el nitrógeno (N), 50% fosforo (P) y 60 % potasio (K), (SAGARPA, 2010). Los fertilizantes nitrogenados, por su solubilidad y carga negativa se pierden por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión (Pedraza *et al.*, 2010; Salhia, 2010).

Como alternativa a los fertilizantes químicos, se propone el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), capaces de estimular el desarrollo de las plantas con mecanismos directos e indirectos (Aguado, 2012). Con los mecanismos directos, los metabolitos producidos por las bacterias, estimulan el crecimiento vegetal, independientemente del soporte edáfico, considerándose la fijación de nitrógeno, producción de reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas, giberelinas, inhibición de la síntesis de etileno y el aumento de la permeabilidad de la raíz. El efecto de estos mecanismos se visualizan como incremento en el contenido de nitrógeno, biomasa de parte aérea y radical, ramificación de raíces y floración, longitud radical y aumento de la captación de nutrientes (García *et al.*, 2010). Por su parte, con los mecanismos indirectos o de biocontrol las bacterias liberan algún metabolito que afecta los fitopatógenos y que a su vez revierte en una mejora o estimulación en el crecimiento de la plantas (Carmelo *et al.*, 2011; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Entre las PGPR, destacan las especies de *Azospirillum*, cosmopolitas en regiones templadas y tropicales, reconocidas mayoritariamente por la fijación de nitrógeno (Altamirano y Plasencia, 2014) y producción de reguladores del crecimiento vegetal (Aguilar *et al.*, 2008). Además, en condiciones adversas, utilizan los gránulos de reserva del tipo polihidroxicanoatos, producidos y acumulados, sobreviven formando quistes o formas "C", que conducen a la agregación celular (Baca *et al.*, 2010). Estas características hacen de *Azospirillum* una bacteria promisoría como biofertilizante en la agricultura amigable con el ambiente (Gonzales

et al., 2011; Villa *et al.*, 2014).

El estudio de las PGPR comienza con el aislamiento, identificación y caracterización para determinar su potencial, primero *in vitro* y luego *in vivo* (Carreño, 2009). En este contexto, se requiere investigar diversos factores que condicionan el éxito de la aplicación bacteriana, entre los que está al momento óptimo de inoculación. Este factor es importante y forma parte de la tecnología requerida, no solo para el establecimiento de la bacteria, sino también para aplicación práctica y rápida por el agricultor. En el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana se realizó una investigación para aislar las bacterias del género *Azospirillum* de la rizósfera de maíz y se determinó su potencial *in vitro* como promotoras de crecimiento en plantas (Lloclla, 2014); sin embargo, no se ha investigado el efecto de dos momentos de inoculación (siembra y emergencia) de *Azospirillum spp.* nativas en el desarrollo vegetativo, en condiciones de invernadero, requisito indispensable para la siguiente fase de aplicación en condiciones de campo (Carreño,2009).

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cómo es el efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum spp.* nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L. en condiciones de invernadero?. El objetivo general fue determinar el efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum spp.* nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L. en condiciones de invernadero. Los objetivos específicos fueron cuantificar el nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por diez cultivos de *Azospirillum spp.* e identificar el efecto de estas bacterias en el desarrollo vegetativo de maíz cuando son inoculadas en dos momentos diferentes:

en las semillas antes de la siembra y en la rizósfera a la emergencia. La hipótesis planteada fue: La inoculación de *Azospirillum* spp. nativas antes de la siembra o a la emergencia, incrementa el desarrollo vegetativo del cultivo de maíz.

La tesis contiene: Introducción, Marco Teórico, Marco Metodológico, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliográficas.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1. 1. Base teórica

En los suelos agrícolas existen bacterias que son benéficas o perjudiciales para la agricultura. Las benéficas pueden establecer una relación simbiótica con las plantas o ser de vida libre en el suelo, en cuyo caso se encuentran muy próximas a las raíces, en lo que constituye el suelo rizosférico. Estas bacterias son denominadas Rizobacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas, (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR), término usado por primera vez por Kloepper & Schrothen 1978, para referirse a las bacterias capaces de inducir un efecto benéfico en las plantas (Peña y Reyes, 2007).

Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluye la síntesis de reguladores del crecimiento, solubilización de minerales como los fosfatos, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistemática en las plantas (Hernández *et al.*, 2006; Bhattacharyya & Jha, 2012).

Bacterias como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* promueven el crecimiento de las plantas mayoritariamente a través de mecanismos directos, así como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* lo hacen a través de

mecanismos indirectos; no obstante, todas la PGPR presentan un mayor o menor grado de efectividad en ambos mecanismos (Doubou *et al.*, 2002; Kloepper, 2013; Idriss *et al.*, 2004; Guillen *et al.*, 2006; Franco, 2008; Karnwal, 2009; Salaheddin *et al.*, 2010). El efecto de las PGPR también se atribuye a lo que se denomina “hipótesis aditiva”, según la cual más de un mecanismo están involucrados en la asociación planta-rizobacteria, los mismos que operan simultáneamente o en asociación. La suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son cultivadas bajo condiciones ambientales propicias (Bashan *et al.*, 2013).

1.1.1. Especies de *Azospirillum* como PGPR

El género *Azospirillum* fue aislado por primera vez en 1985, por Beijerinckii, quien lo nombró inicialmente *Spirillum lipoferum*. En 1978 fue reclasificado por Tarrand *et al.*, quienes basados en estudios de homología del ADN propusieron el género *Azospirillum* con dos especies: *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Carrera *et al.*, 2012).

El género *Azospirillum* agrupa bacilos gruesos, rectos o ligeramente curvados y a menudo con extremos puntiagudos, Gram negativos en cultivos jóvenes, pudiendo ser Gram variables en cultivos envejecidos. Características útiles en su identificación son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movimiento en espiral. En medio líquido o semisólido desarrollan un flagelo polar que permite el movimiento característico tipo “sacacorchos”; sin embargo, en medio sólido algunas especies desarrollan flagelos laterales (Carrera, 2012). También presentan gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato (PHB), que pueden constituir 25 a 50% del peso seco de las células cultivadas en medio libre de nitrógeno. Son catalasa y oxidasa positivos, reducen los nitratos a nitritos, hidrolizan la urea y diversas condiciones como el envejecimiento celular y la presencia de metales provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien de morfología y tomen formas de quistes o “formas C”, conduciéndose a la agregación, con formación de grumos visibles de gran tamaño (Baca *et al.*, 2010).

No se ha definido el mecanismo por el cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal; sin embargo, se han propuesto: I) la fijación de nitrógeno, II)

efectos hormonales, III) incremento en el crecimiento del sistema radicular y IV) alteración de todos los mecanismos mencionados (Bashan *et al.*, 2013). Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico ya sea como bacterias libres o en asociación con las plantas, por lo que se les considera diazótrofas endofíticas facultativas de vida libre (Schoebitz, 2006).

Las bacterias del género *Azospirillum*, destacan por la producción y liberación de auxinas, giberelinas y citoquinas, así como por la síntesis de enzimas pectinolíticas que alteran la funcionalidad de las células de las raíces y por el incremento en la producción de exudados, que promueven el crecimiento de otros organismos rizosféricos. También, se considera que la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, conduce a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radiculares, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueven la captación de agua y minerales (Aguilar *et al.*, 2008).

Las especies de *Azospirillum* cultivadas en medios líquidos producen diversos reguladores del crecimiento vegetal. Uno de los principales es el ácido indol-3-acético (AIA). Otros reguladores detectados en niveles bajos, pero biológicamente significativos son el indol-3-láctico, ácido indol-3-butírico, indol-3-etanol e indol-3-metanol. También se han identificado giberelinas, ácido abscísico y citoquinas. En laboratorio se ha cuantificado el AIA, obteniendo 20-40 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ con *A. brasilense*; 16-32 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ con *A. lipoferum* y 35 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ con *A. paspali*. Estudios sobre la aplicación de estos compuestos bacterianos en plántulas demostraron efectos positivos, similares a los que se observan con *Azospirillum* spp. e incluyen cambios en el desarrollo y morfología radicular e incremento en la longitud de las raíces, número y ramificaciones de los pelos radiculares (Vicentini, 2006).

1. 1. 2. Cultivo de *Zea mays* L.

La taxonomía del maíz mencionada por Llatas (2006) es:

Dominio	:	Eukarya
Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Liliopsida
Subclase	:	Liliidae
Orden	:	Poales
Familia	:	Poaceae
Subfamilia	:	Panicoideae
Tribu	:	Andropogoneae
Género	:	Zea
Especie	:	<i>Zea mays</i> L.

El centro de origen del maíz comprende la región de Mesoamérica, localizada entre el centro y sur de México hasta América Central. Los restos arqueobotánicos descubiertos en las cuevas del valle de Tehuacán en Puebla, tiene una antigüedad de 4500-7000 años. Con base a estos restos y otros hallazgos, como cerámica y lítica, así como el estudio de sedimentos y depósitos de restos vegetales en contextos arqueológicos, se cree que el maíz fue domesticado hace aproximadamente 8000 años. Su evolución es producto de la interacción de los procesos biológicos y factores ecológicos con la dinámica cultural y los intereses del hombre. En la actualidad la mayor información sobre las razas de maíz se encuentra en la base de datos del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP (Acosta, 2009; SAGARPA, 2010).

El maíz y sus parientes silvestres, los teocintles, se clasifican en el género *Zea*, perteneciente a la familia Poaceae, que incluye también al trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y caña de azúcar. Con base a los caracteres de la espiga o inflorescencia masculina, el género *Zea* se ha dividido en dos secciones. La sección Luxuriantes que agrupa cuatro especies: los teocintles perennes (*Z. diploperennis* y *Z. perennis*) y los anuales *Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis*. La sección *Zea* se

circunscribe a una sola especie (*Z. mays*). A su vez, ésta se divide en cuatro subespecies: el maíz (*Z. mays* ssp. *mays*) y los teocintles anuales *Z. mays* ssp. *mexicana*, *Z. mays* ssp. *parviglumis* y *Z. mays* ssp. *Huehuetenanguensis*. A excepción de *Z. nicaraguenis* y *Z. mays* ssp. *Huehuetenanguensis*, los teocintles son endémicos en México (SAGARPA, 2010).

El maíz es una planta de porte robusto y hábito anual. Las raíces primarias son fibrosas, presentando además raíces adventicias que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo; las hojas son largas, grandes, lanceoladas, alternadas, paralelinervias, se encuentran rodeando al tallo y por el haz presentan vellosidades; el tallo es simple, erecto, robusto, sin ramificaciones y no presenta entrenudos. Las inflorescencias son monoicas, las masculinas y las femeninas están separadas en la misma planta, las masculinas presentan una panícula y las femeninas tienen una estructura vegetativa denominada espádice (Delgado, 2011).

El maíz necesita climas relativamente cálidos. La temperatura requerida depende del estado de desarrollo, siendo la óptima 20-25°C en la germinación, 20-30°C durante el crecimiento vegetativo y 21-30°C en la floración. En cuanto al suelo, se prefieren los de textura franca pH con 6 - 7,5 y humedad en el estado de capacidad de campo, con un requerimiento de 7000 m³ ha⁻¹ en riego por profundidad y 3000-3500 m³ha⁻¹ en sistema tecnificado de riego por goteo. La preparación del terreno se hace en seco y con subsolador o un disco. Después, se aplica un riego de machaco o riego pesado y cuando el terreno está en capacidad de campo se usa una rastra ligera y posteriormente se nivela el terreno. Por lo general, en el Perú se usan la labranza convencional y la labranza mínima. Ésta última es la más indicada en verano en los valles de costa, con climas templados (Feijóo, 2005; Infante y Joyo, 2010; Delgado, 2011).

En la costa peruana, principalmente se cultiva maíz amarillo duro y semiduro, destinados a la preparación de alimentos balanceados para animales y obtención de derivados. En la sierra se cultivan maíces blancos amiláceos, en su mayoría para la

alimentación humana (Blanco, 2007). En la costa norte del Perú, el maíz amarillo duro se puede sembrar todo el año, pero las mayores siembras son las que se realizan entre enero a julio, en invierno y entre octubre a diciembre, en verano. En la siembra de verano la floración, aparición de la panoja y el llenado de fruto, se dan en plena estación (enero-marzo) y en la siembra de invierno, la floración se observa en plena estación fría (Serquén, 2004; Infante y Joyo, 2010).

En la mayoría de regiones, el maíz en cultivo tecnificado en suelos de buenas condiciones, con buen manejo y una humedad adecuada responde a los niveles de fertilización de 120 a 180 Kg ha⁻¹ de nitrógeno, 50 a 90 kg ha⁻¹ de fósforo y 60 a 100 kg ha⁻¹ de potasio. En el caso del nitrógeno se recomienda aplicarlo en dos o tres etapas: 50% al momento de la siembra (estado VO) y 50% cuando el maíz tenga seis hojas completamente abiertas (V6), o el 20% en la siembra, 40% en el estado de seis hojas y 40% cuando el maíz tenga diez hojas completamente expandidas (V10). Por su parte, el fósforo y potasio se deben aplicar incorporándose al momento de la siembra, lo mismo que otros elementos necesarios como el azufre, magnesio y elementos menores (FENALCE, 2010).

El grano maduro de maíz es un cariósipide constituido por el pedicelo, pericarpio, endospermo y embrión. El pedicelo es la estructura mediante la cual el grano se encuentra unido al olote y constituye 0,8% del peso del grano. El pericarpio contiene en su mayoría fibra (hemicelulosa, celulosa y lignina) y representa 53% del peso en grano. El endospermo representa 80-85% del peso en grano y está compuesto por 90% de almidón, 7% de proteína y un contenido mínimo de aceites y minerales. A su vez, el embrión o germen aporta 9,5-12% del peso del grano constituido por 35-40% de lípidos, 20% de proteínas y 10,5% de minerales. En general, la composición química del grano de maíz varía, pero en promedio presenta 62,6% de almidón, 12,5% de agua, 9,2 % de proteína, 23,8% de lípidos, 2,2% de fibra cruda, 1,3% de minerales y 8,4% de otros carbohidratos (Tovar, 2008).

2. 2. Antecedentes bibliográficos

En el cultivo de *Capsicum annum* L. “pimiento pimentonero” se investigó el efecto de *A. brasilense* en la germinación, emergencia y desarrollo de las plantas.

Para el ensayo de germinación se investigaron *A. brasilense* Pi3 (T1), *A. brasilense* Op8 (T2); KNO₃ al 0,2 % (T3) y testigo con agua destilada (T4). Las semillas se depositaron en placas de Petri y se mantuvieron a 28°C. Para el bioensayo de emergencia, los tratamientos fueron: inoculación a la siembra (T1), a la siembra y a los 7 días (T2), a los 7 días (T3) y testigo no inoculado (T4). A los 7 días, se determinó 12 % de incremento en las semillas germinadas con T2, en comparación con KNO₃. A los 14 días, se alcanzaron 13,5 y 7,0 % de incremento con T2 y T1, respectivamente. En cuanto a las plantas emergidas, no se observaron diferencias entre los tratamientos a los 7 días, pero si a los 14 días alcanzándose 78,6% con T1; 85,6% con T2; 81,6 % con T3 y 76, 3 % con el testigo. La altura de las plantas, a los 40 días fue de 11,7cm con T2; diferenciándose significativamente de T3 (8,40cm), T1(9,40cm) y el testigo con 9,32cm (Di Barbaro *et al.* ,2005).

Durante 4 años se investigó la actividad promotora de crecimiento en plantas por tres cultivos de *Azospirillum brasilense*, en condiciones de laboratorio, invernadero y campo. La cepa CBG – 497 produjo *in vitro* más concentración de ácido indolacético, que 180 y CBG–181. Para su aplicación en invernadero, las bacterias cultivadas en caldo PV (peptona–extracto de levaduras-cloruro de calcio), durante 48 horas, a 32 ° C, en agitación constante (250 rpm) y con una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹, se inocularon en las semillas del híbrido comercial de sorgo Dekalb54. Para la aplicación en campo, las bacterias se mezclaron con 500g de turba esterilizada (pH 6,8) y se incubaron a 32°C, por 7días. Antes de la siembra a la semilla se le aplicó 1 kg de inóculo por 14 kg de semilla (6 x 10⁷UFC por semilla) y se agregó una solución al 20% de goma arábica (40 mL kg⁻¹de semilla) como adherente. En invernadero a los 23 días se registró incremento de la biomasa en 50, 12 y 22% respectivamente. En campo, las plantas inoculadas alcanzaron un rendimiento promedio de 13 a 17 %, mayor que el testigo (García *et al.*, 2006).

En maíz se determinó el efecto de *Azospirillum brasilense* CB6 - 497, caracterizada en laboratorio como productora de ácido indolacético. Las bacterias fueron aplicadas en las semillas de los híbridos comerciales Asgrow–Tigre, Dekalb–

2003 y Garst 8222. En invernadero se cuantificó el peso de la biomasa área a los 9, 15, 20 y 26 días después de la siembra, observándose que la cepa CB6 – 497 incrementó significativamente (20 - 90%) la biomasa de los tres híbridos, en comparación con el testigo no inoculado. En campo, esta bacteria aumentó el rendimiento de grano en 0.3 a 1,3 tha^{-1} . Por su parte, el forraje seco se incrementó no significativamente en 0,2 a 0,3 tha^{-1} para Garst 8 222 y Asgrow – Tigre; sin embargo, disminuyó 0,6 tha^{-1} en Dekalb 2003. Debido a que la aplicación de *A. brasilense* incrementó hasta 36%, la relación beneficio/costo, se concluyó que es una opción válida para mejorar la rentabilidad del cultivo (García *et al.*, 2007).

El efecto de *A. brasilense* se investigó en la germinación, desarrollo y componentes del rendimiento de *Setaria lachnea*. Los tratamientos fueron: testigo(T) e inoculante comercial *A. brasilense*. Las semillas *previamente* desinfectadas con hipoclorito de sodio 0,5 % v/v fueron inoculadas con 1 mL del inoculante semi-líquido por gramo de semilla y fueron colocadas en estufa a 25 °C, considerándose inicio de germinación la extrusión de la radícula con un largo mínimo de 2 mm. Las semillas pre – geminadas se sembraron en macetas y en el tratamiento correspondientes se aplicó 1mL del inoculante. Las plantas permanecieron en cámara de crecimiento, a 28°C, durante 60 días. Se determinó que el poder germinativo de las semillas fue 14,8 y 14, 6 % para los tratamientos testigo e inoculado, respectivamente, desde el día 3 hasta el 14; no obstante, las raíces de las plantas inoculadas mostraron mayor proliferación de pelos absorbentes y a la floración se determinó incremento de la materia seca de raíces, hojas, inflorescencias, longitud radicular, área foliar y contenido de nitrógeno en hojas y raíces (Toniutti y Fornasero, 2008).

Existen reportes científicos de los beneficios en el crecimiento y rendimiento de diferentes cultivos agrícolas, observados con la aplicación de *Azospirillum spp.*; sin embargo, su uso extensivo es limitado por la inconsistencia de los resultados. El efecto de *A. brasilense* Az-39 en formulación líquida 10^9 UFC mL^{-1} aplicada en semillas de maíz se investigó durante las campañas 2002 – 2003 y 2006 – 2007 en Argentina. Los rendimientos en 151 campos agrícolas inoculados oscilaron entre

3361 y 1545 kg ha⁻¹, con una respuesta media de 503 kg ha⁻¹, equivalentes a 6,5 % de mejora sobre el control. Se observó un mayor desarrollo inicial de las plantas, alcanzando en los estadios vegetativos tempranos (V4 – V6) una mayor acumulación de biomasa aérea (54%) y de raíces (28%). Asimismo, las plantas de maíz inoculadas mostraron mayor concentración de nitrógeno en las hojas, mayor longitud de raíces y producción de biomasa, principalmente entre 2-3 semanas después de la siembra (Díaz *et al.*, 2008).

El efecto de una especie de *Azospirillum*, tres de *Pseudomonas*, tres de *Streptomyces* y ocho de *Bacillus* se investigó en el desarrollo vegetativo de maíz. Las bacterias (10⁸ UFC mL⁻¹) se inocularon junto a dos semillas por golpe, a 5cm de profundidad y se determinó la altura, número de hojas, biomasa de raíces y follaje. El dendograma mostró tres grupos de bacterias con 76,3 % de similitud en el efecto. El grupo G1 con *A. lipoferum* y *P. fluorescens* presentó el mayor efecto, seguido del grupo G2 con *P. aeruginosa*, *B. coagulans*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. polymixa*, *B. lentus*, *B. circulans* y *B. fimosis*. Por su parte, G3 con *B. licheniformis*, *S. hygroscopicus*, *S. rimosus* y *S. fasciculatus* mostraron efecto reducido o no significativo, comparado con el control, que también estuvo en este grupo. En cuanto al número de hojas, el efecto fue no significativo. Respecto al peso de raíces, con *P. fluorescens*, *A. lipoferum* y *P. putida* se alcanzaron 65,5 a 86 g, frente a 60,25g con el control y en cuanto al peso del follaje se alcanzaron 345 a 562, 5 g, frente a 352 g en el control. Se concluyó que estas bacterias son promisorias para incrementar el desarrollo y rendimiento del cultivo de maíz (Adjanohoum *et al.*, 2011).

El efecto de *Azospirillum* spp., en el desarrollo vegetativo y rendimiento del maíz se investigó en condiciones de invernadero. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de las raíces se enriquecieron en agar NFb semisólido, donde se reconocieron por la formación de una película blanquecina subsuperficial y se aislaron en agar rojo congo con ácido málico como fuente de carbono. El género *Azospirillum* se identificó fenotípicamente y mediante métodos de colorimétricos y se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio y los índoles producidos. Las bacterias que alcanzaron los mayores valores se inocularon en las rizósfera de las plantas de

maíz, en un ensayo con un diseño completamente aleatorio. Se obtuvieron 106 cultivos de *Azospirillum* spp., con los que se cuantificaron 1,11 a 20,48 ppm de amonio y 3,00 a 23,25 ppm de indoles. *Azospirillum* spp. M21B1 Y M17C1 incrementaron la altura de las plantas, disminuyeron los días al inicio de la floración e incrementaron el rendimiento, con índices de efectividad de hasta 23,72% frente al testigo absoluto. Se demostró el potencial de *Azospirillum* spp., para incrementar el desarrollo de maíz (Muñoz y Vásquez, 2012).

CAPITULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo de investigación y diseño de investigación

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases. La primera fase fue descriptiva y con el diseño “Solo Después” (Alvitres, 2000) se cuantificó el nitrógeno fijado como amonio, el fósforo soluble producto de solubilización de fosfato y los índoles producidos por *Azospirillum* spp. En la segunda fase explicativa, bajo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA), con arreglo factorial $A \times B + 2$, se investigó el efecto de *Azospirillum* spp. en el desarrollo vegetativo de maíz. El factor A correspondió al momento de inoculación, con dos niveles: siembra y emergencia. El factor B fue *Azospirillum* spp, con diez niveles: *Azospirillum* spp. EDAL20, EDAL25, EDAsp9, EDAB3, EDAB4, EDH11, EDAL1, EDAL24, EDAL16 y EDAH10. Se incluyeron dos testigos: 100% de fertilizante químico y testigo absoluto. Los tratamientos fueron 24, con tres repeticiones cada uno, totalizando 72 unidades experimentales (Figura1).

2.2. Población y muestra de estudio

La población universal fueron las bacterias del género *Azospirillum*, la población muestral *Azospirillum* spp. aisladas de maíz durante diciembre de 2015 y la unidad muestral diez cultivos de *Azospirillum* spp: EDAL20, EDAL25, EDAsp9, EDAB3, EDAB4, EDH11, EDAL1, EDAL24, EDAL16 y EDAH10.

Tratamientos	Momentos de inoculación					
	Siembra			Emergencia		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3
Testigo absoluto	X	X	X	X	X	X
Testigo químico	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAsp9	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	X	X	X	X	X	X

Figura 1. Tratamientos para determinar el efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum* spp. en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L.

2.2.1. Materiales

El material biológico estuvo constituido por semillas de maíz amarillo duro y diez cultivos de *Azospirillum* spp. aislados de la rizósfera de maíz y proporcionados por la sección de Biotecnología Microbiana del Laboratorio de Microbiología y parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

2.3 Variables en estudio

2.3.1. Variables independientes

Momentos de inoculación: Siembra y emergencia

Azospirillum spp: EDAL20, EDAL25, EDAsp9, EDAB3, EDAB4, EDH11, EDAL1, EDAL 24, EDAL 16 y EDAH 10.

2.3.2. Variable dependiente

Desarrollo vegetativo del maíz (altura, peso de biomasa radicular y aérea).

2.4. Métodos y procedimientos para la recolección de datos

2.4.1. Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e indoles producidos.

Con las bacterias del género *Azospirillum* se cuantificó el amonio producto de la fijación de nitrógeno, fósforo soluble producto de la solubilización de fosfatos y los indoles producidos. Para la obtención del inóculo cada bacteria se cultivó en 5 mL de caldo nutritivo a 30°C, durante 24 horas (Córdova, 2016). Posteriormente, el caldo se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó con solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v) y su concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc. Farland).

a. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico: Técnica de Berthelot o fenol hipoclorito (Cadena y Martínez, 2011). El inóculo (5%: 0,15 mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en tubos de 15x150 mL conteniendo 3 mL de caldo extracto de suelo 10% (Figura 2) y se incubaron a 30°C por 72 horas, con agitación constante (150 rpm).

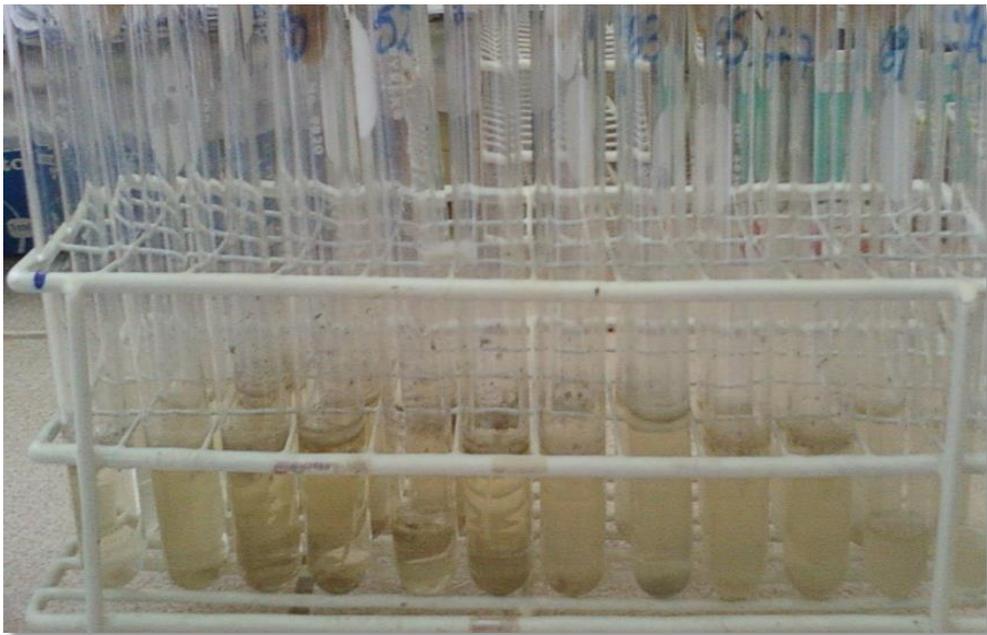


Figura 2. Caldo extracto de suelo cultivado con *Azospirillum* spp.
Fuente: Elaboración propia.

Después de la incubación, se agregaron 9 mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10 mL de sobrenadante y centrifugarlos (3000 rpm) durante 5 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron a 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional. La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Las concentraciones de amonio se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio.

b. Cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fosfato solubilizado *in vitro* por las bacterias investigadas se realizó con el método colorimétrico de molibdato (Alvarado y Valderrama, 2014). El inóculo (5%: 0,25 mL) de cada cultivo bacteriano se sembró por triplicado en 5 mL de caldo National Botanical Research Institute' s phosphate, NBRIP (Figura 3) y se incubaron a 30°C, con agitación (150 rpm), por 96 horas. Después los caldos fueron centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble (Rodier y Rodi, 2005), considerándose una coloración azul positiva a la solubilización del fosfato. La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro de luz visible a 690 nm y las concentraciones de fósforo soluble se calcularon con la ecuación de la curva de calibración, obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 10 ppm de fosforo.

c. Cuantificación de índoles producidos *in vitro*

La cuantificación de índoles producidos *in vitro* se realizó con el método colorimétrico: Reacción de Salkowski (Mantilla, 2007; García y Muñoz, 2010). El inóculo (5%: 0,25 mL) de cada cultivo bacteriano fue sembrado por triplicado en 5 mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Figura 4). Después de la inoculación a 30°C, por 72 horas, en agitación (150 rpm), los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm, durante 5 minutos.



Figura 3. Caldo National Botanical Research Institute's Phosphate cultivado con *Azospirillum* spp.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 4. Caldo tripticasa soya suplementado con triptófano cultivado con *Azospirillum* spp.
Fuente: Elaboración propia.

Después de la centrifugación, 0,4 mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de índoles por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530 nm. Las concentraciones de índoles se calcularon con la ecuación de la curva de calibración obtenida previamente con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de ácido indolacético.

2.4.2 Segunda fase: Efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum spp.* nativas en el desarrollo vegetativo de maíz

Para determinar el efecto de *Azospirillum spp.* nativas en el desarrollo vegetativo de maíz (Carreño, 2009), las bacterias se inocularon en las semillas antes de la siembra y rizósfera a la emergencia, determinándose las características del desarrollo vegetativo en condiciones de invernadero.

a. Ubicación del experimento e instalación del cultivo

El cultivo del maíz amarillo duro híbrido simple “Súper maíz” y la inoculación de diez cultivos de *Azospirillum* nativos, se realizó entre el 1 de enero al 30 de marzo de 2015, en el invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque (Figura 5).

El maíz amarillo duro “Súper maíz”, es un híbrido simple obtenido en la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, en Lambayeque (Puicón, 2014). El híbrido simple “Súper Maíz” es tolerante a *Erwinia chrysanthemi* causante de la pudrición bacteriana y *Fusarium sp.*, que afecta la mazorca y produce la aflatoxina B. La floración masculina (50%) requiere 92 días y la floración femenina (50%) 96 días. El periodo de cultivo es 142 días, con un rendimiento promedio 12,22 tha^{-1} (Córdova, 2016).

El suelo experimental estuvo constituido por 108 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5: 2,0: 0,5 que se solarizó durante 30 días (Córdova, 2016).



Figura 5. Ubicación geográfica del invernadero en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Región Lambayeque, enero 2016 (<https://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=wl>).

El suelo experimental se distribuyó en bolsas de polietileno negro de 16,5 x 23,5 cm, a razón de 1,5 kg por bolsa, totalizando 72 bolsas. En simultáneo se tomó una muestra representativa de 1 Kg de suelo para realizar el análisis físico – químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo (Tabla, 1), determinándose una textura franco arenosa, pH ligeramente ácido (6,13), suelo moderadamente salino ($CE=6,1dSm^{-1}$) con un bajo contenido de materia orgánica (1,41%) y fósforo disponible (6,75 ppm) y alto contenido de potasio (2,99 ppm). Durante el periodo de cultivo de maíz, se registraron la temperatura máxima, mínima y media, datos obtenidos por la Estación Meteorológica en la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, ubicada en el fundo “El Ciénago” en Lambayeque. La temperatura media mínima fue 19,3°C en marzo y la máxima 23°C en enero (Tabla 2).

El porcentaje de germinación de las semillas de maíz, se determinó en cinco bandejas de tecnopor de 20 x14 cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas, se depositaron 20 semillas de maíz por bandeja, distribuidas en dos hileras, a razón de diez por hilera (Córdova, 2016). Las bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28 °C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta observar el máximo de germinación (Figura 6), que fue 98%, a los 7 días.

b. Obtención de inóculo bacteriano

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo a 30°C, 150 rpm durante 48 horas. A continuación, fueron sembradas mediante la técnica de estría en agar nutritivo, se seleccionaron cinco colonias características de *Azospirillum* spp. y se sembraron nuevamente en agar nutritivo, durante 48 horas, constituyendo los cultivos de trabajo, que se incrementaron según los requerimientos y se guardaron en refrigeración (8°C). El inóculo fue obtenido con bacterias cultivadas en caldo nutritivo, a 30°C, durante 24 horas y después de la centrifugación (3500 rpm por 5 minutos) se obtuvieron 13 mL de cada cultivo bacteriano (Figura 7), en solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v), cuya concentración se estandarizó a 9×10^8 cel mL⁻¹ por turbidimetría (tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland).

Tabla 1. Análisis Físico – químico del suelo experimental en Lambayeque, 2015

pH	CE	MO	P	K	Calcáreo	Textura (%)			de suelo
	(dSm ⁻¹)	Tipo (%)	(ppm)	(ppm)		Ao	Lo	Ar	
6,13	6,10	1,41	6,75	299	0,78	64	16	21	FoAo

* Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria. Estación Experimental Vista Florida – Chiclayo,2015.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Valores promedios de temperatura (°C) en Lambayeque enero-marzo de 2015, en Lambayeque

Meses	Temperatura (°C)		
	Máxima	Mínima	Media
Enero	27,5	19,6	23,6
Febrero	24,5	17,6	21,1
Marzo	22,4	16,2	19,3

* Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 6. Prueba de germinación de *Zea mays* L. amarillo duro híbrido simple.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 7. Obtención del inóculo bacteriano
Fuente: Elaboración propia.

c. Tratamiento de la semilla

Las semillas de maíz se depositaron en una bolsa de polietileno, donde se agregó el insecticida en polvo soluble (Figura 8): Acephato O, S-dimethyl acetyl phoramidothioate (Orthene 75 PS), en la dosis de $4,8\text{g kg}^{-1}$ de semilla (Córdova, 2016).

d. Aplicación de las bacterias en las semillas antes de la siembra

En 36 bolsas de polietileno transparente de $2,5 \times 8,0$ cm se depositaron tres semillas de maíz amarillo. A continuación, en 30 bolsas, se inocularon $0,5$ mL de la suspensión bacteriana correspondiente por bolsa equivalente a $307,69 \text{ mLkg}^{-1}$ de semillas (Figura 9) y en seis bolsas se aplicó agua destilada. El contenido fue homogenizado para que las bacterias se distribuyan uniformemente en las semillas y después, éstas fueron extendidas en la bolsa y llevadas en una bandeja hacia la estufa a 30°C (Figura 10) por 30 minutos, para disminuir el exceso de humedad. Posteriormente, con una pinza, las semillas de maíz previamente inoculadas se sembraron en el suelo experimental contenido en bolsas plásticas de polietileno negro, a razón de tres semillas por bolsa (Figura 11) y se realizaron los riegos correspondientes según los requerimientos de las plantas. Después de 10 días de la siembra, se eliminaron las plántulas menos vigorosas, quedando dos por tratamiento.

e. Aplicación de las bacterias en la rizósfera a la emergencia

En 36 bolsas de polietileno negro conteniendo el suelo experimental se sembraron dos semillas de maíz amarillo por bolsa y después de 7 días se inocularon las bacterias nativas en la rizósfera (Figura12). Previamente, en ambos lados de las plántulas se realizaron dos surcos a 5 cm del tallo y con una profundidad de 3 cm, donde se depositaron respectivamente 6 mL del inóculo bacteriano, totalizando 8 mL, a razón de $4 \text{ mL plántula}^{-1}$ (Córdova, 2016).

Al testigo químico se le aplicó fertilizante químico: $240\text{N}: 80\text{P}: 80\text{K}$, correspondiente a $0,5\text{g}$ de urea ($46\% \text{ N}$); $0,2\text{g}$ de fosfato diamónico ($46\% \text{ P}$) y $0,2\text{g}$ de sulfato de potasio ($50\% \text{ K}$) por bolsas. La urea se aplicó fraccionada, 50% a la siembra y 50% después de 38 días. El fosfato diamónico y sulfato de potasio se

aplicaron a la siembra. También se incluyó un testigo sin bacteria y sin fertilizante químico al que se le aplicó agua destilada.



Figura 8. Homogenizado del insecticida con las semillas de *Zea mays* L. amarillo duro.

Fuente: Elaboración propia.

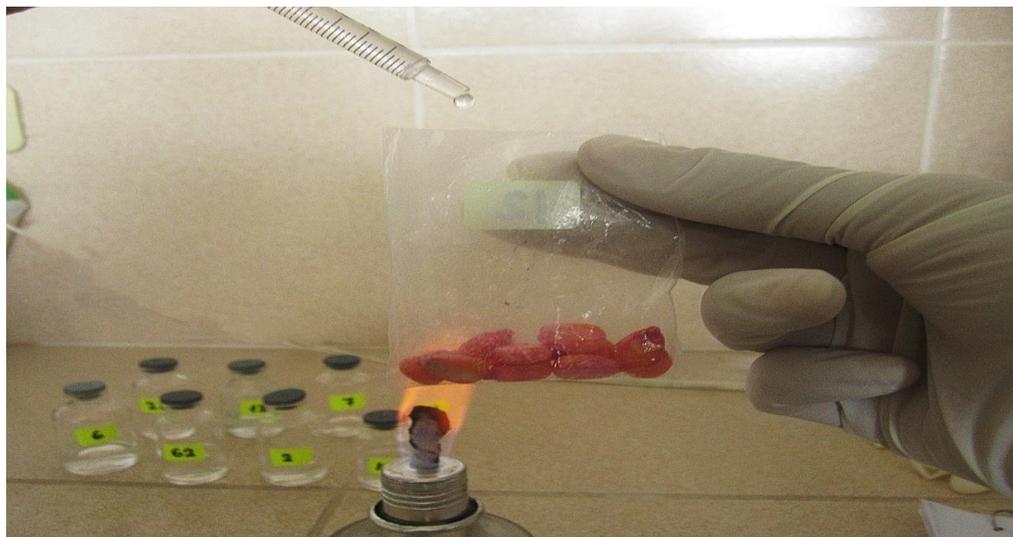


Figura 9. Inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en las semillas de *Zea mays* L. amarillo duro.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 10. Semillas de *Zea mays* L. amarillo duro inoculadas con *Azospirillum* spp. nativas.
Fuente: Elaboración propia.



Figura 11. Siembra de semillas de *Zea mays* L. amarillo duro inoculadas con *Azospirillum* spp. nativas.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 12. Inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera de *Zea mays* L. amarillo duro.

Fuente: Elaboración propia.

f. Monitoreo

A los 30, 60 y 90 días se midió la altura de las plantas. A los 90 días se extrajeron las plantas y se determinó el peso de la biomasa seca de la parte radicular y aérea (Puicón, 2014). La altura de planta se expresó en cm, considerando desde la base, hasta el extremo final de la hoja bandera. A continuación, se cortó la parte aérea de cada una de las plantas al ras del suelo y junto con la raíz y suelo adherido, se depositaron en bandejas de plástico. Para determinar el peso de la materia seca, tanto la raíz previamente lavada como la biomasa aérea se deshidrataron en el horno a 70°C, hasta alcanzar peso constante (Río y Zuñiga, 2012). Después, el peso se determinó con una balanza de precisión y con los valores obtenidos se calcularon los índices de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula utilizada por Carreño (2009):

$$\text{IEI \%} = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

2.3.3. Análisis estadístico de los datos

Los valores de altura y biomasa fueron ordenados en tablas para realizar las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, que son las asunciones principales en la aplicación de la estadística paramétrica, tal que los resultados tengan validez estadística y se puede llevar a cabo el proceso de inferencia a partir de la muestra. El análisis de varianzas determinó las diferencias entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey, la significancia entre ellos (Hernández *et al.*, 2014).

Las hipótesis para el factorial 2x12+3 fueron:

Factor momento de inoculación(A)

$$H_0 = \mu_{A_1} = \mu_{A_2}$$

$$H_0 = \mu_{A_1} \neq \mu_{A_2}$$

Factor *Azospirillum* spp. (B)

$$H_0 = \mu_{B_1} = \mu_{B_2} = \mu_{B_3}$$

$$= \dots = \mu_{B_{12}} \quad H_a = \mu_{B_1} \neq \mu_{B_2}$$

$$\neq \mu_{B_3} \neq \dots \neq \mu_{B_{12}}$$

Interacción momento de inoculación vs *Azospirillum* spp. (AxB)

H_a = Al menos una media es diferente

En el presente estudio se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2007 y Minitab 15.

CAPÍTULOS III

RESULTADOS

3.1. Nitrógeno fijado, fosfato solubilizado e índoles producidos por *Azospirillum* spp.

El 100% de *Azospirillum* spp. fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato y produjeron índoles *in vitro*, cuantificándose 10,55 a 33,17ppm de amonio; 2,98 a 5,35ppm de fósforo soluble y 13,88 a 38,75ppm de índoles, respectivamente (Tabla3).

3.2. Efecto de dos momentos de inoculación de *Azospirillum* spp. en el desarrollo vegetativo de maíz

La inoculación de *Azospirillum* spp. nativas a las semillas antes de la siembra y en la rizósfera durante la emergencia, incrementó la altura a los 30, 60 y 90 días (Figuras 13 a 17), así como también la biomasa aérea y radicular de las plantas de maíz a los 90 días. Los rangos del índice de efectividad de las bacterias inoculadas antes de la siembra fueron de 1,37 a 23,01% en la altura; 5,88 a 57,14% en la biomasa aérea y 16,91 a 97,01% en la biomasa radicular (Tablas 4 a 7). Los rangos del índice de efectividad de las bacterias inoculadas a la emergencia fueron de 0,93 a 19,91% en la altura; 4,58 a 36,14% en la biomasa aérea y 23,08 a 94,62% en la biomasa radicular (Tablas 8 a 11).

El análisis estadístico del factorial 2 X 12 demostró que el momento de inoculación de *Azospirillum* spp. influye en el efecto observado en el desarrollo vegetativo de maíz, observándose que con la inoculación de las bacterias en las semillas antes de la siembra se alcanzaron los mayores valores en la altura y biomasa.

Tabla 3. Nitrógeno fijado como amonio, fósforo soluble e índoles producidos por *Azospirillum* spp.

<i>Azospirillum</i> spp. Código	Amonio (ppm)	Fósforo soluble (ppm)	Índoles (ppm)
EDAL20	12,60	5,12	16,33
EDAL25	10,55	4,98	33,88
EDAsp9	20,37	5,13	24,14
EDAB3	26,94	3,14	21,76
EDAB4	26,87	2,98	19,34
EDH11	14,34	4,56	25,33
EDAL1	33,17	5,21	37,13
EDAL24	10,74	2,99	15,54
EDAL16	13,86	3,12	14,12
EDAH10	27,33	5,35	38,75

Fuente: Elaboración propia.

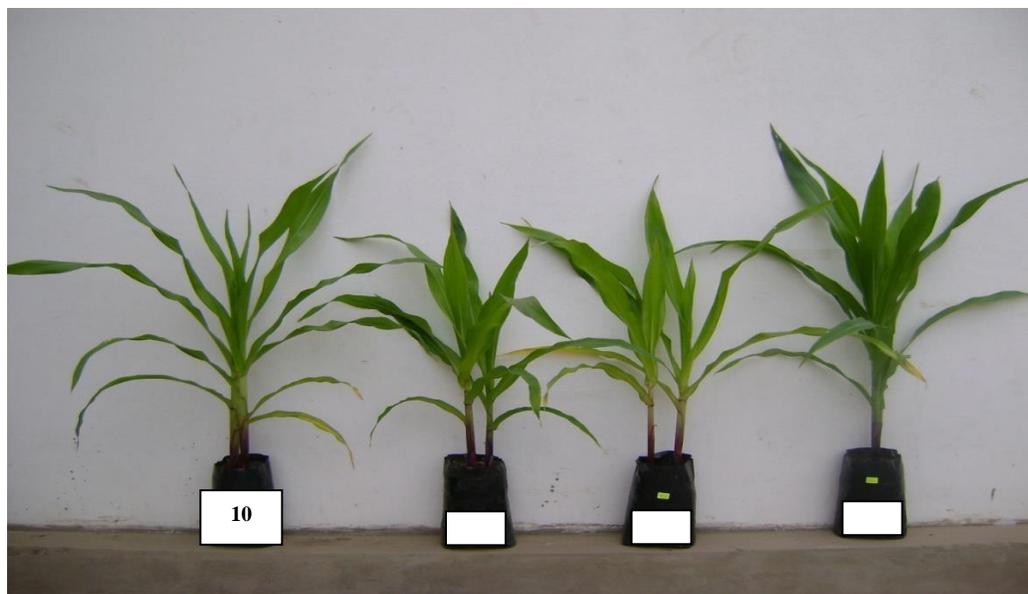


Figura 13. Altura de *Zea mays* L. amarillo duro, 30 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra, 2015.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 14. Altura de *Zea mays* L. amarillo duro, 30 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas, durante la emergencia, 2015.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 15. Altura de *Zea mays* L. amarillo duro, 60 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra, 2015.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 16. Altura de *Zea mays* L. amarillo duro, 90 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra, 2015.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 17. Altura de *Zea mays* L. amarillo duro, 90 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas, durante la emergencia, 2015.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Altura (cm) de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas antes de la siembra 2015

Tratamientos	cm/días		
	30	60	90
Testigo absoluto	37,39	61,43	89,44
Testigo químico	42,53	66,44	93,14
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	38,39	56,66	81,08
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	40,52	65,39	89,00
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	40,53	63,43	91,37
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	41,63	61,30	92,99
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	39,20	57,98	84,02
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	39,42	56,22	87,99
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	40,62	68,37	95,33
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	42,01	63,66	90,66
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	45,99	60,15	90,10
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	44,29	65,75	93,64

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Índices de efectividad (%) en la altura de *Zea mays* L. amarillo duro por *Azospirillum* spp. nativas inoculadas antes de la siembra, 2015

Tratamientos	IE/días		
	30	60	90
Testigo químico	13,74	8,15	4,14
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	2,66	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	8,36	6,45	0
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	8,39	3,26	2,16
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	11,35	0	3,97
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	4,83	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	5,43	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	8,65	11,29	6,59
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	12,35	3,63	1,37
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	23,01	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	18,46	7,04	4,70

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 6. Biomasa (g) aérea y radicular de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, antes de la siembra, 2015

Tratamientos.	Biomasa (g)	
	Aérea	Radicular
Testigo absoluto	28,03	1,94
Testigo químico	36,03	2,39
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	29,68	3,48
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	42,36	3,29
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	44,05	2,40
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	36,31	2,28
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	37,41	3,13
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	32,18	3,82
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	36,57	3,40
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	36,99	2,27
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	33,28	2,87
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	40,34	2,43

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Índices de efectividad (%) en la biomasa aérea y radicular de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, antes de la siembra, 2015

Tratamientos	IE/Biomasa	
	Aérea	Radicular
Testigo químico	28,55	23,02
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	5,88	79,24
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	51,11	69,42
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	57,14	23,75
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	29,54	17,32
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	33,46	61,55
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	14,81	97,01
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	30,47	75,43
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	31,95	16,91
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	18,72	47,77
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	43,91	25,05

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Altura (cm) de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, durante la emergencia, 2015

Tratamientos	cm/días		
	30	60	90
Testigo absoluto	35,14	60,09	86,60
Testigo químico	43,06	68,16	92,20
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	38,36	56,68	88,53
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	40,14	64,29	91,05
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	39,56	65,09	89,61
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	36,67	62,42	90,45
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	42,14	58,16	87,74
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	39,94	56,36	85,71
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	40,98	65,10	90,51
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	40,35	64,15	90,37
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	39,07	59,68	88,25
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	42,04	65,66	91,13

Fuente: Elaboración propia.

Tabla9. Índices de efectividad (%) en la altura de *Zea mays* L. amarillo duro por *Azospirillum* spp. nativas inoculadas, durante la emergencia, 2015

Tratamientos	IE/Días		
	30	60	90
Testigo químico	22,53	13,42	6,47
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	9,17	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	14,23	7,00	2,85
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	12,57	8,32	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	4,36	3,87	0,93
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	19,91	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	13,66	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	16,62	8,34	5,60
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	14,84	6,75	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	11,18	0	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	19,63	9,26	3,27

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Biomasa (g) aérea y radicular de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, durante la emergencia, 2015

Tratamientos	Biomasa (g)	
	Aérea	Radicular
Testigo absoluto	30,08	1,86
Testigo químico	35,50	2,61
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	34,48	1,54
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	33,45	3,32
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	37,52	3,41
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	37,49	2,32
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	31,46	2,29
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	29,01	2,80
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	35,45	3,62
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	28,47	2,80
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	40,95	2,56
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	36,25	2,46

Fuente: Elaboración propia.

Tabla11. Índices de efectividad (%) en la biomasa aérea y radicular de *Zea mays* L. amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, durante la emergencia, 2015

Tratamientos	IE/ Biomasa	
	Aérea	Radicular
Testigo químico	18,02	40,43
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	14,62	0
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	11,20	78,49
<i>Azospirillum</i> sp. FDAsp9	24,73	83,58
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	24,03	24,91
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	4,58	23,08
<i>Azospirillum</i> sp. EDH11	0	50,54
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	17,86	94,62
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	0	50,39
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	36,14	37,46
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	20,52	32,40

Fuente: Elaboración propia.

La prueba F del análisis de varianza de los valores promedios de la altura a los 30 días en el factorial 2x12 (Tabla12), evidenció alta significancia para los tratamientos, momentos de inoculación, *Azospirillum* spp. e interacción A x B, demostrándose que existió efecto de las variables en estudio en la altura. La prueba múltiple de Tukey ($\alpha= 0,05$), demostró que los mayores valores de altura se alcanzaron con la inoculación antes de la siembra, diferenciándose significativamente de la emergencia (Tabla 13). En cuanto a *Azospirillum* spp., los mayores valores correspondieron a *Azospirillum* spp. EDAH10 y EDAL16 y el testigo químico, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí con los demás tratamientos (Tabla14). En la interacción, el mayor valor correspondió a Siembra – *Azospirillum* sp. EDAL16, no diferenciándose significativamente de Siembra – *Azospirillum* sp. EDAH10, pero sí de los demás tratamientos (Tabla15).

La prueba F del análisis de varianza de los valores promedios de la altura los 60 días, en el factorial 2 x 12 (Tabla 16), evidenció alta significancia para los tratamientos y *Azospirillum* spp., pero no existió significancia en el momento de inoculación e interacción A x B. La prueba múltiple de Tukey ($\alpha= 0,05$), demostró que los mayores valores de altura se alcanzaron con el testigo químico, *Azospirillum* spp. EDAL1, EDAH10 y EDAL25, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí con los demás tratamientos (Tabla 17).

La prueba F del análisis de varianza de los valores promedios de la altura a los 90 días en el factorial 2 x 12 (Tabla 18), evidenció alta significancia para los tratamientos, *Azospirillum* spp. e interacción A x B, pero no para el momento de inoculación. La prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0,05$), demostró que los mayores valores de altura se alcanzaron con *Azospirillum* sp. EDAL1, no diferenciándose significativamente de EDAH10, EDAB3, EDAL24 y el testigo químico, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 19). En la interacción A x B los mayores valores en la altura de planta correspondieron a Siembra-*Azospirillum* spp. EDAL1, EDAH10, EDAB3 y los testigos químicos, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí de los demás tratamientos (Tabla 20).

Tabla 12. Análisis de varianza de los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 30 días, inoculado con *Azospirillum* sp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$ (Momentos de inoculación)

$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3 \dots \dots \mu B_{12}$

(*Azospirillum* spp.) $H_0 =$ No hay efecto de la interacción A x B

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	23	661,28	28,75	28,17	<0,0001	**	Rechaza H_0
Momentos (A)	1	47,30	47,30	46,35	<0,0001	**	Rechaza H_0
<i>Azospirillum</i> spp.(B)	11	421,64	38,33	37,56	<0,0001	**	Rechaza H_0
A x B	11	192,34	17,49	17,13	<0,0001	**	Rechaza H_0
Error	96	97,98	1,02				
Total	119	759,26					

CV = 2,50%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla13. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 30 días, inoculado en la siembra y emergencia,2015

Momentos de inoculación	Altura (cm)	Significancia
Siembra	41,04	a
Emergencia	39,79	b

Fuente: Elaboración propia.

Tabla14. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 30 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, 2015

<i>Azospirillum</i> spp.	Altura (cm)	Significancia
Azospirillum sp. EDAL10	43,17	a
Testigo químico	42,79	a
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL16	42,53	a b
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	41,18	b c
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	40,80	c
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	40,67	c
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL25	40,33	c d
<i>Azospirillum</i> sp. EDAsp9	40,04	c d
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL11	39,68	c d e
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	39,15	d e
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	38,37	e
Testigo absoluto	36,26	f

Fuente: Elaboración propia.

Tabla15. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 30 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la siembra y emergencia,2015

Momento de inoculación	<i>Azospirillum</i> spp.	Altura (cm)	Significancia
Siembra	EDAL16	45,99	a
Siembra	EDAH10	44,29	a b
Emergencia	Testigo químico	43,06	b c
Siembra	Testigo químico	42,53	b c d
Emergencia	EDAB4	42,14	b c d e
Emergencia	EDAH10	42,04	b c d e
Siembra	EDAL24	42,01	b c d e
Siembra	EDAB3	41,63	c d e f
Emergencia	EDAL1	40,98	c d e f g
Siembra	EDAL1	40,62	d e f g h
Siembra	EDAsp9	40,53	d e f g h
Siembra	EDAL25	40,52	d e f g h
Emergencia	EDAL24	40,35	d e f g h
Emergencia	EDAL25	40,14	d e f g h
Emergencia	EDAH11	39,94	e f g h
Emergencia	EDAsp9	39,56	f g h i
Siembra	EDAH11	39,42	g h i
Siembra	EDAB4	39,20	g h i
Emergencia	EDAL16	39,07	h i j
Siembra	EDAL20	38,39	h i j
Emergencia	EDAL20	38,36	i j k
Siembra	Testigo absoluto	37,39	j k
Emergencia	EDAB3	36,67	j k
Emergencia	Testigo absoluto	35,14	k

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 16. Análisis de varianza de los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 60 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$ (Momentos de inoculación)

$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3 \dots \mu B_{12}$ (*Azospirillum* spp.)

$H_0 =$ No hay efecto de la interacción A x B

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	23	1682,63	73,16	26,42	<0,0001	**	Rechaza H_0
Momentos (A)	1	0,19	0,19	0,07	0,7923	NS	Acepta H_0
<i>Azospirillum</i> spp.(B)	11	1629,88	148,17	53,50	<0,0001	**	Rechaza H_0
A x B	11	52,56	4,78	1,73	0,0791	NS	Acepta H_0
Error	96	265,85	2,77				
Total	119	1948,49					

CV= 2,68

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha= 0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 60 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, 2015

<i>Azospirillum</i> spp.	Altura (cm)	Significancia
Testigo químico	67,30	a
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL1	66,74	a b
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH10	65,70	a b c
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL25	64,84	a b c
<i>Azospirillum</i> sp. EDAsp9	64,26	b cd
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL24	63,91	c d
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB3	61,86	d e
Testigo absoluto	60,76	e
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL16	59,92	e f
<i>Azospirillum</i> sp. EDAB4	58,07	f g
<i>Azospirillum</i> sp. EDAL20	56,67	g
<i>Azospirillum</i> sp. EDAH11	56,29	g

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 18. Análisis de varianza de los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$ (Momentos de inoculación)

$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3 \dots \dots \dots \mu B_{12}$ (*Azospirillum* spp.)

$H_0 =$ No hay efecto de la interacción A x B

Fuentes de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	23	1141,78	49,64	19,13	<0,0001	**	Rechaza H_0
Momentos (A)	1	9,17	9,17	3,54	0,0631	NS	Acepta H_0
<i>Azospirillum</i> spp.(B)	11	815,84	74,17	28,58	<0,0001	**	Rechaza H_0
A x B	11	316,76	74,17	28,58	<0,0001	**	Rechaza H_0
Error	96	249,11	2,59				
Total	119	1390,89					

CV= 1,80%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 19. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, 2015

<i>Azospirillum</i> spp.	Altura (cm)	Significancia
<i>Azospirillum</i> spp.EDAL1	92,92	a
Testigo químico	92,67	a b
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH10	92,39	a b c
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB3	91,72	a b c
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL24	90,52	a b c d
<i>Azospirillum</i> sp.EDAsp9	90,49	b cd
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL25	90,03	c de
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL16	89,17	d ef
Testigo absoluto	88,02	e f g
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH11	86,85	f gh
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB4	85,88	g h
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL20	84,80	h

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 20. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de altura de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la siembra y emergencia, 2015

Momentos de inoculación	<i>Azospirillum</i> spp.	Altura (cm)	Significancia
Siembra	EDAL1	95,33	a
Siembra	EDAH10	93,64	a b
Siembra	Testigo químico	93,14	a b c
Siembra	EDAB3	92,99	a b c
Emergencia	Testigo químico	92,20	a b c d
Siembra	EDAsp9	91,37	b c d e
Emergencia	EDAH10	91,13	b c d e
Emergencia	EDAL25	91,05	b c d e
Siembra	EDAL24	90,66	b c d e
Emergencia	EDAL1	90,51	b c d e
Emergencia	EDAB3	90,45	b c d e
Emergencia	EDAL24	90,37	b c d e f
Siembra	EDAL16	90,10	b c d e f
Emergencia	EDAsp9	89,61	c d e f
Siembra	Testigo absoluto	89,44	c d e f g
Siembra	EDAL25	89,00	d e f g
Emergencia	EDAL20	88,53	e f g
Emergencia	EDAL16	88,25	e f g
Siembra	EDAH11	87,99	e f g h
Emergencia	EDAB4	87,74	f g h
Emergencia	Testigo absoluto	86,60	g h
Emergencia	EDAH11	85,71	hi
Siembra	EDAB4	84,02	i
Siembra	EDAL20	81,08	i

Fuente: Elaboración propia.

La prueba F del análisis de varianza de los valores promedios de la biomasa aérea a los 90 días, en el factorial 2 x 12 (Tabla 21), evidenció alta significancia para los tratamientos, momentos de inoculación y *Azospirillum* spp., pero no para la interacción A x B. La prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0,05$), demostró que los mayores valores en la biomasa aérea se alcanzaron con la inoculación antes de la siembra, diferenciándose significativamente de la emergencia (Tabla 22). En cuanto a *Azospirillum* spp., EDAsp9, superó significativamente a los demás tratamientos (Tabla23).

La prueba F del análisis de varianza de los valores promedios de la biomasa radicular a los 90 días en el factorial 2 x 12 (Tabla 24), demostró alta significancia para los tratamientos, momentos de inoculación y *Azospirillum* spp., pero no para la interacción A x B. La prueba múltiple de Tukey ($\alpha= 0,05$), demostró que los mayores valores en la biomasa radicular se alcanzaron con la inoculación a la siembra, diferenciándose significativamente de la emergencia (Tabla 25). En cuanto a *Azospirillum* spp., EDAL1, superó significativamente a los demás tratamientos (Tabla26).

Tabla 21. Análisis de varianza de los valores promedios de biomasa aérea de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$ (Momentos de inoculación)

$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3 \dots \mu B_{12}$ (*Azospirillum* spp.)

$H_0 =$ No hay efecto de la interacción A x B

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decision
Tratamientos	23	2172,84	94,47		<0,0001	**	Rechaza H_0
Momentos (A)	1	111,10	111,10		<0,0001	**	Rechaza H_0
<i>Azospirillum</i> spp. (B)	11	1308,98	119,00		<0,0001	**	Rechaza H_0
A x B	11	752,76	68,64		<0,6001	NS	Acepta H_0
Error	96	166,43	39,47				
Total	119	2339,26					

CV= 3,75%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 22. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa aérea de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado durante la siembra y emergencia, 2015

Momento de inoculación	Biomasa (g)	Significancia
Siembra	36,10	a
Emergencia	34,18	b

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 23. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa aérea de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, 2015

<i>Azospirillum</i> spp.	Biomasa (g)	Significancia
<i>Azospirillum</i> sp.EDAsp9	40,78	a
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH10	38,30	b
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL25	37,90	b c
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL16	37,12	b c d
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB3	36,90	b c d
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL1	36,01	c d e
Testigo químico	35,77	d e
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB4	34,43	e f
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL24	32,73	f g
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL20	32,08	g h
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH11	30,60	h i
Testigo absoluto	29,06	i

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 24. Análisis de varianza de los valores promedios de biomasa radicular de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas durante la siembra y emergencia, 2015

$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$ (Momentos de inoculación)

$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2 = \mu B_3 \dots \dots \dots \mu B_{12}$ (*Azospirillum* spp.)

$H_0 =$ No hay efecto de la interacción A x B

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	23	43,44	1,89		<0,0001	**	Rechaza H_0
Momentos (A)	1	0,75	0,75		<0,0001	**	Rechaza H_0
<i>Azospirillum</i> spp.(B)	11	25,59	2,33		<0,0001	**	Rechaza H_0
A x B	11	17,10	1,55		<0,0501	NS	Acepta H_0
Error	96	1,40	0,01				
Total	119	44,84					

CV= 4,43%

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 25. Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa radicular de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado durante la siembra y emergencia, 2015

Momento de inoculación	Biomasa (g)	Significancia
Siembra	2,81	a
Emergencia	2,65	b

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 26. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) para los valores promedios de biomasa radicular de *Zea mays* L. amarillo duro, de 90 días, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas, 2015

<i>Azospirillum</i> spp.	Biomasa (g)	Significancia
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL1	3,61	a
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH11	3,31	b
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL25	3,30	b
<i>Azospirillum</i> sp.EDAsp9	2,91	c
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB4	2,71	d
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL16	2,71	d
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL24	2,53	d e
<i>Azospirillum</i> sp.EDAL20	2,51	e
Testigo químico	2,50	e
<i>Azospirillum</i> sp.EDAH10	2,44	e f
<i>Azospirillum</i> sp.EDAB3	2,30	f
Testigo absoluto	1,90	g

Fuente: Elaboración propia.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

La fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y producción de índoles *in vitro*, por las bacterias de género *Azospirillum* investigadas demostraron *in vitro* su potencial como promotoras de crecimiento en plantas, PGPR (Bashan *et al.*, 2007; Casos y Santiago, 2013). La fijación de nitrógeno y producción de índoles son características frecuentemente utilizadas para seleccionar estas bacterias y posteriormente determinar su efecto *in vivo*, en condiciones de invernadero y campo (Cárdenas *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2012); no obstante, también se consideran como criterios de selección la solubilización de fosfatos (Córdova, 2016) y el efecto en la germinación de las semillas (Reyes *et al.*, 2008). Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas mediante mecanismos directos e indirectos (Kloepper *et al.*, 2004; Bhattacharyya & Jha, 2012). Las especies de *Azospirillum* destacan por los mecanismos directos fijación de nitrógeno y producción de índoles (Lara *et al.*, 2011; Aguado, 2012; Altamirano *et al.*, 2014).

Todas la bacterias fijaron nitrógeno *in vitro*, capacidad reportada en el género *Azospirillum* por Garrido (2007), Jha *et al.* (2009), García *et al.* (2010), Rangel *et al.* (2011), Guzmán *et al.* (2012) y Córdova (2016). En la fijación biológica de nitrógeno o diazotrofia el complejo nitrogenasa cataliza la reducción de una molécula de nitrógeno a dos de amoníaco, que rápidamente se ionizan a amonio, fácilmente utilizado por las plantas (Menezes, 2009; Altamirano *et al.*, 2014).

El amonio fue cuantificado por el método indirecto de valoración del ion amonio, utilizando la técnica colorimétrica de Berthelot, coincidiendo con García *et al.* (2010) y Córdova (2016). La nitrogenasa además del nitrógeno molecular reduce

otros compuestos como el acetileno, capacidad que también es utilizada para cuantificar el nitrógeno fijado en la prueba de reducción del acetileno: ARA (Guzmán *et al.*, 2012) y la confirmación del carácter diazotrofo se realiza evidenciando la presencia del gen *nifH* en las bacterias (Menezes, 2009; Lloclla, 2014; Altamirano *et al.*, 2014). Se cuantificaron hasta 33,17 ppm de amonio superando el rango 20-32,10 ppm, reportado por García *et al.* (2010), Baiocchi y Saavedra (2011) y Delgado y Suyón (2017), para aislados de arroz, tomate y espárrago, respectivamente.

La producción de índoles *in vitro* por *Azospirillum* spp. es una característica, reportada previamente por García *et al.* (2010), Lara *et al.* (2011), Guzmán *et al.* (2012), Lloclla (2014) y Delgado y Suyón (2017). Van de Brock *et al.* (1999), mencionados por García *et al.* (2007) concluyeron que considerando que estos reguladores promueven el crecimiento vegetal, la síntesis de auxinas se considera un parámetro determinante en la selección de cepas de *Azospirillum* spp., para la producción de biofertilizantes.

Los índoles fueron cuantificados por el método colorimétrico mediante la reacción Salkowski, con la que observa una coloración grosella, cuya intensidad es proporcional a la concentración de índoles (Mantilla, 2007; Celis y Gallardo, 2008). La reacción es altamente específica para índoles que incluyen al ácido indol acético, con un límite de detección de 0,5 ppm (Celis y Gallardo, 2008). Se cuantificaron hasta 38,75 ppm de índoles, valor que está en el rango 35 - 70 ppm reportado por García *et al.* (2007), Baiocchi y Saavedra (2011), Guzmán *et al.* (2012) y Delgado y Suyón (2017) para aislados de maíz, tomate, algodón y espárrago. La producción de AIA depende de la cepa bacteriana, condiciones de cultivo, concentración de triptófano, pH, oxigenación y fase de crecimiento, considerándose óptimos, un pH 5,5 y el inicio de la fase estacionaria (Aguilar *et al.*, 2008).

La solubilización de fosfatos por *Azospirillum* spp. no es una característica distintiva de las especies de este género, pero si ha sido previamente reportada por Córdova (2016) y Delgado y Suyón (2017) con aislados de maíz y espárrago. La solubilización de fosfatos precipitados consiste en la liberación de fósforo inorgánico

soluble a partir de fosfatos insolubles, mediante mecanismos como la producción de ácidos orgánicos y excreción de protones, acompañada de la asimilación de ion amonio, entre otros (Vásquez *et al.*, 2000; Carreño, 2009). El fósforo soluble producto de la solubilización se cuantificó con el método colorimétrico del molibdato, observándose una coloración azul, producto de la reacción entre los iones de fosfato liberados y los demás reactivos (Córdova, 2016). Se cuantificaron hasta 5,35 ppm de fósforo soluble, superando 2,57 ppm reportadas con aislados de malezas, por Casos y Santiago (2013).

El éxito en la aplicación de la PGPR en condiciones de invernadero o campo depende del propio potencial de las bacterias (García *et al.*, 2006), pero también de otros factores como el momento de inoculación. Investigaciones al respecto, validan la inoculación en las semillas antes de la siembra (Lara *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012), en la rizósfera durante la emergencia (Córdova, 2016), en las raíces al trasplante (Germán, 2015) o en doble aplicación en las semillas y rizósfera (Vélez y Orellana, 2010). En este contexto, las bacterias investigadas se inocularon en las semillas de maíz, al igual que Ashrafi & Seieidi (2011), Sharifi *et al.* (2011) y García *et al.* (2012).

La inoculación de *Azospirillum* spp. incrementó el desarrollo vegetativo de maíz coincidiendo con Ashrafi & Seieidi, 2011 (inoculación durante la siembra) y Córdova, 2016 (emergencia). El efecto promotor de crecimiento en plantas por especies de *Azospirillum* se atribuye a la fijación de nitrógeno (de Bashan *et al.*, 2007), producción de reguladores del crecimiento como las auxinas, que favorecen a las raíces, con incremento de la absorción de agua y minerales (Aguilar *et al.*, 2008; Adjanooum *et al.*, 2011) y según la “hipótesis aditiva” a la interacción de varios mecanismos (de Bashan *et al.*, 2007). Como consecuencia, *Azospirillum* spp. ejerce en las plantas un efecto multiparamétrico, observándose incremento en la germinación (Reyes *et al.*, 2008), desarrollo y número de raíces (Adjanooum *et al.*, 2011), altura (Ashrafi & Seieidi, 2011), precocidad a la floración (Córdova, 2016), aumento de la biomasa (García *et al.*, 2007; Córdova y Manayay, 2013) y

rendimiento (Sharifi *et al.*,2011; García *et al.*, 2012; Piscoya y Ugaz,2016).

El incremento de la altura de las plantas fue reportado previamente con la inoculación de *Azospirillum* spp. en maíz (Ashrafi & Seieidi, 2011; González *et al.*, 2011; Córdova, 2016), tomate (Baiocchi y Saavedra, 2011), arroz (García *et al.*, 2010) y espárrago (Delgado y Suyón, 2017). Las especies de *Azospirillum* producen auxinas, giberelinas, ácido acético y citoquininas (Vicentini *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2008). Entre las auxinas destaca el ácido indol-3-acético, AIA (Celis y Gallardo, 2008), que induce el crecimiento en longitud de la planta, floración, maduración de los frutos, senectud y geotropismo (García *et al.*, 2010).

El índice de efectividad máximo (104,73%) en la biomasa radicular superó al de la biomasa aérea (57,14%), superioridad que también fue observada por Córdova (2016) en maíz inoculado con *Azospirillum* spp., registrando IE de 63,31% en la biomasa radicular y 23,34% en la biomasa aérea. La modificación del sistema radicular por *Azospirillum* spp. es atribuida en parte a la producción de reguladores, que incrementan el número de raíces laterales y pelos radiculares, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz (Aguilar *et al.*, 2008). Los reguladores producidos por los cultivos de *Azospirillum* spp. cuando son aplicados en las plantas, producen efectos similares a la que se observan con *Azospirillum* e incluyen cambios en el desarrollo y morfología radicular e incremento en la longitud de las raíces, número y ramificaciones de los pelos radiculares (Vicentini *et al.*, 2006).

El análisis estadístico determinó que con la inoculación de *Azospirillum* spp. en las semillas, antes de la siembra, se alcanzaron los mayores IE, superando significativamente a la inoculación en la rizósfera, durante la emergencia. De igual manera, Hernández y Velásquez (2014) y Julón (2014) alcanzaron las mayores IE en la altura y biomasa con la inoculación de enterobacterias y actinomicetos en las semillas de maíz, durante la siembra. La inoculación de *Azospirillum* spp. en las semillas de maíz , durante la siembra, también fue utilizada por Ashrafi & Seieidi

(2011), Sharifi *et al.* (2011) y García *et al.* (2012); no obstante, también se encuentran reportes a favor de la inoculación de las PGPR en la rizósfera, durante la emergencia (Córdova y Manayay, 2013; Córdova, 2016) y tanto a la siembra como a la emergencia (Vélez y Orellana, 2010).

La capacidad de las bacterias para promover el crecimiento de las plantas, no sólo depende de su abundancia, sino también de su proliferación en la raíz. En general, las bacterias inoculadas en las semillas, colonizan solo el primer tercio del sistema radicular; no obstante, las especies de *Azospirillum* se mueven y distribuyen en toda la raíz (Bashan & Levanony, 1991; mencionados por Loredó *et al.*, 2004), concentrándose en los sitios laterales de emergencia de la cápsula de la raíz, pelos radiculares y principalmente en la punta de la raíz, por donde inician la colonización interna (Caiola *et al.*, 2004). Como consecuencia, aumenta el área de suelo explorada por la raíz, la tasa de adquisición de nutrientes y la biomasa aérea (Córdova, 2016).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 5.1. La inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en las semillas antes de la siembra presento mayor efecto en el desarrollo vegetativo del cultivo de maíz, en condiciones de invernadero.
- 5.2. Los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas fijaron nitrógeno, solubilizaron fosfato tricálcico y produjeron índoles, cuantificándose 10,55 a 33,17 ppm de amonio; 2,98 a 5,35 ppm de fósforo soluble y 13, 88 a 38, 75 ppm de índoles. Obteniéndose con los cultivos de *Azospirillum* spp. EDAL1, EDASP9 y EDAL 25 inoculadas antes de la siembra y emergencia, los mayores valores en la concentración de amonio, fosfato soluble, índoles e índices de efectividad de la altura, biomasa área y radicular de las plantas de maíz.
- 5.3 Los diez cultivos de *Azospirillum* spp. inoculados antes de la siembra y a la emergencia de maíz incrementaron el desarrollo vegetativo, alcanzándose los mayores índices de efectividad en la altura (IE=23,01%), biomasa aérea (IE=57,14%) y radicular (IE=97,01%) con la inoculación de las bacterias en las semillas antes de la siembra.

CAPITULOS VI

RECOMENDACIONES

- 6.1 Identificar el efecto de *Azospirillum* spp. EDAL1, EDASP9 y EDAL 25 en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz amarillo duro, en condiciones decampo.
- 6.2 Identificar sustratos económicos y disponibles en la región Lambayeque, para el incremento masivo de *Azospirillum* spp. EDAL1, EDASP9 y EDAL 25.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R. (2009). *El cultivo de maíz, su origen y clasificación*. El maíz en Cuba. *Cultivo Tropicales*, 30 (2), 113-120.
- Adesemoye, A., Torbert, H. & Kloepper, J. (2009). Plant growth – promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizer. *Microbial Ecology*, 58, 921-929.
- Adjanohoun, A., Allagbe, M., Naumauro, P., Gotoechean, H., Sikirou, R., Dossa, K., Gleekakai, R., Kotchoni, S. & Baba, L. (2011). *Effect of plant growth promoting rhizobacteria on field grown maize*. *Journal of Animal & Plant Science*, 11(3), 1457-1465.
- Aguado, S. (Ed.). (2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP/ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA.
- Aguilar, J., Xiqui, M., García, S. y Baca, E. (2008). *Producción del Ácido Indol-3-acético en Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 29 – 37.
- Altamirano, C. y Plasencia, R. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Zea mays L. en Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. y Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

- Alvarado, P y Valderrama, M. (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque*, marzo-mayo, 2014. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Ashrafi, V. & Seiedi, M. (2011). *Influence of different plant densities and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of corn (Zea mays L.)*. *Recent Research in Science and Technology*, 3(1). 63-66.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la investigación*. (2^{da} ed.) Lambayeque, Perú: Editorial Ciencia.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C. y Mendoza, G. (2010). *Polihidroxicanoatos de cepas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" y Oryza sativa L. "arroz" en Lambayeque*. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213-224.
- Baiocchi, A. y Saavedra, A. (2011). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Blanco, H. (2007). *Comparativo de rendimiento de 6 híbridos de maíz amarillo duro (Zea mays L.) bajo condiciones agroclimáticas de la parte media del valle Chancay, Lambayeque*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Bashan, Y., Holguín, G. y Ferrera, R. (2013). *Interacción entre plantas y microorganismos beneficios*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 47 – 54.
- Bhattacharyya, P. & Jha, D. (2012). *Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- Cadena, S. y Martínez, B. (2011). *Caracterización de cepas de Pseudomonas spp. y su efecto en la germinación y emergencia de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo,

Perú.

- Caiola, M., Al - Bolta, A. & Del Gallo, M. (2004). *Localization of Azospirillum brasilense in inoculated tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) roots. Annual Microbiology*, 54, 365 – 380.
- Cárdenas, D., Garrido, R., Bonilla, R., y Baldini, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* spp. en pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3),1.
- Carmelo, M., Vera, S. y Bonilla, R.(2011).*Mecanismos de acción de la rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2),159-166.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumi. Lambayeque - Perú.*(Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Carrera, A. (2012). *Caracterización bioquímica molecular y funcional del banco de cepas de Azospirillum spp. del INIA aisladas de Rizósfera del cultivo de maíz (Zea mays L.) de la sierra ecuatoriana.*(Tesis de Pregrado). Universidad de Ecuador, Ecuador.
- Casos, I. y Santiago, P. (2013). *Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de Azospirillum aisladas de raíces de malezas asociadas a Zea mays L. “maíz” en Lambayeque.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Celis, H. (2007). *Comparativo de rendimiento de 6 híbridos de maíz amarillo duro (Zea mays L.) bajo condiciones agroclimáticas de la parte media del valle Chancay, Lambayeque.*(Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Celis, L. y Gallardo, I. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético, giberelinas) en cultivos microbianos.* (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

- Córdova, L. (2016). *Efecto de Azospirillum spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L “maíz “, en invernadero.* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Córdova, L. y Manayay, C. (2013). *Efecto de rizobacterias aisladas de malezas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L., maíz en condiciones de invernadero, en Lambayeque, 2013.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo.
- De Bashan, L., Holguín, G., Glick. B. y Bashan, Y. (2007). *Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales.* En Ferrera, R. y Alarcón, A. *Microbiología Agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, plata-microorganismo.* (170-224). México: Trillas.
- Delgado, Y.(2011). *Control de malezas en cultivos de maíz (Zea mays L.) utilizando tres herbicidas pre-emergentes, en la granja “Pradera” Chaltura–Imbabura.* (Tesis de Maestría). Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Delgado, J. y Suyon, J. (2017). *Bacterias endófitas y rizósfericas fijadoras de nitrógeno aisladas de Asparagus officianalis L. en Virú, región la Libertad y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Díaz, M., Micucci, F., Baiña, R. y Fernández, M. (2008). *Productividad de cultivos de maíz con tratamiento de semillas con Azospirillum brasilense.* Disponible en: http://nitragin.com.Ar/intranet/argentina/pags_internos/trabajos_publicados/evaluación_extensiva_de_azospirillum-en-maíz.pdf.
- Di Barbaro, G, Pernasetti, S. y Stegmayer, A. (2005). Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilense* en la germinación y emergencia del pimiento pimentón (*Capsicum annum* L. var. - “trompa de elefante”). *Revista del Cizas*, 6(1-2), 74 – 85.
- Doumbou, C., Hamby, M., Crawfor, D. & Stegmayer, A. (2002). *Actinomycetes promising tools to control plant diseases and to promote plant growth, Phytoprotection*, 82(3), 85-102.

- Federación Nacional de Cultivares de Cereales, FENALCE (2010). El Cerealista, 10-19. Recuperado de www.Finagro.com.co.
- Feijóo, C. (2005). *Comparativo de los cultivos de maíz chala (Zea mays L.) a tres distanciamientos en el valle de Tumbes*.(Tesis de Pregrado).Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
- Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- García, J., Moreno, V., Rodríguez, I., Mendoza, A. y Mayek, N. (2006). Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo en el norte de México (2006). *Revista Agricultura Técnica en México*, 32(2),135-141.
- García, J., Moreno, V., Rodríguez, I., Mendoza, A. y Mayek, N. (2007). Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento del grano de maíz. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 30(3), 305 –310.
- García, F. y Muñoz, H. (2010). *Caracterización de cepas nativas de Azospirillum spp. y su efecto como promotor del desarrollo vegetativo de arroz (Oryza sativa)*.(TesisdePregrado).UniversidadNacionalPedroRuizGallo,Perú.
- García, J. Mendoza, A. y Mayek, N. (2012). *Efecto de Azospirillum brasilense en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México*. Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo, 28(1), 79-84.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva granada, Colombia.
- Germán, J. (2015). *Efecto de las concentraciones de Azotobacter sp. aislado de rizósfera de suelo de Saccharum officinarum sobre el crecimiento de Lycopersicon esculentum "tomate"*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Gonzales, A., Pérez, D., Franco, O., Balbuena, A., Gutiérrez, F y Romero, H. (2011). Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *Ciencia Ergo Sun*, 18(1),

51-58.

- Guillen, R., Hernández, F. y Gallegos, G. (2006). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium spp. Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2),105-114.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D y Bonilla, P.(2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*.) *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 182-190.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, A. (2014).*Metodología de la Investigación* (6^{ta} ed.)México: Mc Graw Hill Interamericana. Editores S.A.
- Hernández, F. y Velásquez, M. (2014). *Efecto de enterobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. “maíz” en condiciones de invernadero en Lambayeque, 2014.* (Tesis de Pregrado). Universidad Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Idriss, E., Iglesias, D., Talon M. &Borriss, R. (2004). Tryptophan-dependent production of índole – 3 - acetic acid (IAA) affect level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant–Microbe Interactions (MPMI)*, 20(6), 619-626.
- Instituto Nacional de Estadística Informática, INEI. (2015). *Producción de maíz amarillo duro creció 25,2%*. Recuperado de: [https:// www.inei.gob.pe/ prensa/ noticias/ en-noviembre-2015-produccion-de-maiz-amarillo-duro-crecio-252-8826/](https://www.inei.gob.pe/prensa/noticias/en-noviembre-2015-produccion-de-maiz-amarillo-duro-crecio-252-8826/)
- Infante, P. y Joyo, G. (2010). Manejo integrado de maíz amarillo duro. Curso Taller. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M & Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45,62-72.

- Julón, W. (2014). *Desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" amarillo duro, por efecto de actinomicetos nativos inoculados en la siembra y emergencia, en invernadero, 2013.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Karnwal, A.(2009). Production of índole acetic acid by *fluorescent Pseudomonas* in the presence of L – tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 91(1),61-63.
- Kloepper, J. (2013). A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. *Revista Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- Lara, C., Villalba, M. y Oviedo, L. (2011). Bacterias fijadoras a simbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX (2), 6 –14.
- Llatas, S. (2006). *Estudio de la Poaceas Peruanas.* Lambayeque, Perú. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Lloclla, H. (2014). *Caracterización de especies de Azospirillum fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo rizosférico y raíces de Zea mays L. en Lambayeque, 2014.* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Loredo, C., López, L. y Espinoza, D. (2004). Bacterias Promotoras del crecimiento asociados con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yokoono) en periodo de enraizamiento.* (Tesis de Pregrado). Pontificia Universal Javeriana, Colombia.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotóxicas asociadas a maíz (Zea Mays) variedad PAU871.* (Tesis de Pregrado). Universidad de la República, Uruguay.
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI. (2016). *Boletín Estadístico de Producción Agrícola Pecuaria y Avícola., Perú. Dirección de Información Agraria.* Recuperado de <http://www.minagri.gob.pe/>.

- Muñoz, V. y Vásquez, R. (2012). *Caracterización de Azospirillum spp. nativas y su efecto en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz". en Lambayeque.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Nicolalde, A. y Quintana, D. (2010). Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (*Brassica oleraceae* var. *Legacy*) en Otavalo. Universidad Técnica del Norte. Ecuador.
- Pedraza, R., Bellone, C. & de Bellone, C. (2010). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of soil Biology*, 45, 36-43.
- Peña, H. y Reyes, I. (2007). *Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfato en la promoción del crecimiento de la lechuga (Lactuca sativa L.).* *Revista Venezolana Interciencia*, 32(8), 23-32.
- Piscoya, E. y Ugaz, Z. (2016). *Efecto de Azospirillum, Azotobacter y Enterobacter spp. nativas con 50% de fertilizantes químico en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L. "maíz" amarillo duro en Lambayeque, 2013.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallos, Perú.
- Puicón, H. (2014). *Efecto de Pseudomonas spp. nativas en el desarrollo vegetativo de Zea mays L. "maíz" en condiciones de invernadero, 2013.* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Rangel, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos, J., Ramírez, R. y Alvarado, E. (2011). *Afinidad y efecto de Azospirillum sp. en maíz.* *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.
- Reyes, I., Álvarez, L., El - Ayoubi, H. y Valery, A. (2008). *Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz.* *Biagro*, 20(1), 37-48.
- Ríos, P. y Zúñiga, L. (2012). *Bacillus spp. Aisladas de rizósfera de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" en Lambayeque y su potencial como promotores del crecimiento de plantas.* (Tesis de Pregrado). Universidad Pedro Ruiz Gallo,

Perú.

Rodier, J. y Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.

Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Landhalakshmi, D. & Velazhahan, R. (2010). Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Plant Protection Science*, 46(2), 41-50.

Salhia, B. (2010). *The effect of Azotobacter chroococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of Cucumis sativus*. (Degree of Master). The Islamic University, Gaza.

Sharifi, R., Khavazi, K. & Gholipouri, A. (2011). Effect of seed priming with plant growth promoting rhizobacterias (PGPR) on dry matter accumulation and yield of mays (*Zea mays* L.) hybrids. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 1(3), 76-83.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2010). *Uso de Fertilizantes*. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrollorural/documents/fichasappt/uso%20de%20fertilizantes>.

Serquén, J. (2004). *Efecto de la densidad de siembra y dosis de fertilización balannuada en el rendimiento de maíz amarillo duro en las localidades del Valle Chancay Lambayeque, 2003*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico (modelo género Azospirillum spp)*. (Tesis de Pregrado). Universidad Austral, Chile.

Toniutti, M. y Fornasero, L. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria lachnea* (Nees) kunth. *Revista FAVE – Ciencias Agrarias*, 7(1 – 2), 33 – 41.

Tovar, O. (2008). Estudio Florístico de los pastizales de la Costa Norte del Perú. *Revista Peruana Biológica*, 12 (3), 397-413.

- Vázquez, P., Holguín, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rizosphere of mangroves in semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 400 –408.
- Vélez, L. y Orellana, H. (2010). *Evaluación de cepas de Azotobacter spp. en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa var. Green Salad Bowl)*. Tumbaco, Pichinca. (Tesis de Pregrado). Universidad Central del Ecuador, Ecuador.
- Villa, L. Mayek, N., Garcia, J. y Hernández, J.(2014). *Efectos de la inoculación en maíz con cepas nativas de Azospirillum sp.* Avances en Investigación Agropecuaria. *Revista de Investigación y Difusión Científica Agropecuaria*, 18(1), 33-38.
- Vicentini, A. (2006). *Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivares de arroz irrigado*. (Tesis de Doctorado).Universidad Federal de Santa María, Brasil.