

Inoculación de bacterias diazotroficas en Genotipos de Maíz Forrajero

Marco Puente Flores¹, Sergio Rodríguez Herrera², Odilon Gayosso Barragan³, Rosalinda Mendoza Villarreal⁴ y Arnoldo Oyervides García⁵
Fitomejoramiento², Horticultura⁴, Instituto mexicano del maíz⁵
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Torreón, Coa.^{1,2,3}, Saltillo; Coa.^{4,5}; México
marcoaeio@hotmail.com

Abstract—The aim of the study was to isolate and identify strains of *Azospirillum* sp. three locations and evaluate the effect of seed inoculation on two elite lines of forage maize in height and plant in greenhouse N content. Two seed forage maize elite lines was used, the CML-384 selected under low N content and CML-321 with a normal N. Isolation and identification of 40 strains of *Azospirillum* sp. was achieved of three locations: Torreón Coah, Celaya Gto. and Buenavista Coah., it was shown that the best strains were 1, 4 and 21 as may be associated with different types of lines leading to an increase in the content of N and plant height.

Keywords—*Azospirillum*, fertilization, forage, *Zea mays* L

Resumen—El objetivo del estudio fue aislar cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades y evaluar el efecto de la inoculación de semilla en dos líneas élite de maíz forrajero en la altura y contenido de N en planta en invernadero. Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, la CML-384 seleccionada en condiciones de bajo contenido de N y CML-321 con N normal. Se logró el aislamiento y la identificación de 40 cepas de *Azospirillum* sp. de tres localidades: Torreón Coah., Celaya Gto. y Buenavista Coah., se demostró que las mejores cepas fueron la 1, 4 y la 21 ya que se pueden asociar a diferentes tipos de líneas provocando un incremento en el contenido de N y altura de planta.

Palabras clave—*Azospirillum*, fertilización, forraje, *Zea maíz* L.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de forrajes y granos requiere del manejo de estrategias en los sistemas tradicionales para la alimentación animal, sobre todo para los productores de carne o pie de cría que demandan forraje todo el año para el mantenimiento y producción de los animales. Anteriormente el maíz forrajero se seleccionaba por el contenido de materia seca sin interesar la calidad nutritiva [1]. Sin embargo, algunos híbridos actualmente utilizados presentan rendimiento de grano y proporción de materia seca altos, siendo el maíz forrajero la fuente de energía en la alimentación del ganado productor de leche. En relación a su calidad nutricional, varios autores han indicado diferencias entre híbridos de maíz en los contenidos de proteína, fibra y digestibilidad, tanto de la materia seca como de la fibra [2].

Entre los insumos que requiere el cultivo se encuentran los fertilizantes con su respectivo costo, sin embargo para obtener un maíz forrajero de alta calidad es necesario utilizar dosis altas de fertilizantes químicos, que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo y los mantos freáticos, dicha contaminación puede afectar a cultivos posteriores y al consumidor. Una alternativa para disminuir la fertilización química es la biofertilización con microorganismos, los cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, descomposición de residuos orgánicos, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas [3].

Las bacterias del género *Azospirillum* tienen una especial afinidad por las raíces de las gramíneas [4], como es el caso de los pastos que responden con incrementos en su crecimiento y rendimiento cuando son inoculados con *Azospirillum spp.* La secreción de sustancias promotoras del crecimiento de las plantas (tales como auxinas, giberelinas y citoquininas) por *Azospirillum*, parece estar involucrada parcialmente en este efecto [5,6].

De las especies más estudiadas en maíz se encuentra el *A. brasilense* que crece a una temperatura entre 35 y 37 °C, un pH óptimo entre 5.8 a 6.5 y utiliza ácidos orgánicos para su crecimiento [7]. Además produce sideróforos y fitohormonas como giberelinas, citocininas y auxinas a partir del triptófano, por lo que se le clasifica como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, de aquí su importancia agrícola [8].

García *et al.*, [9] evaluaron el efecto de *A. brasilense* en el rendimiento de grano del maíz en dos experimentos establecidos durante 2001 en Díaz Ordaz, Tamaulipas, México, encontraron que la inoculación de *A. brasilense* incrementó el rendimiento de grano y la relación beneficio/costo. De igual manera la inoculación con *Azospirillum brasilense* en tres cultivares de maíz incrementó el rendimiento de grano (1.47 t ha⁻¹) y disminuyó la duración del ciclo biológico del cultivo (2 días en floración masculina y madurez fisiológica) [10].

Con la aplicación a la semilla, como formulaciones comerciales, se ha favorecido el amacollamiento, altura de planta, longitud de raíces, peso seco y número de granos [11]. Canto- Martín *et al.* [12] inocularon semilla de chile habanero, encontrando una disminución en el tiempo de germinación y un incremento en el número de raíces a una concentración de 1 y 3x 10⁷ UFC mL⁻¹ además Kalpulnik [13], encontró que existe una asociación no simbiótica en la zona de elongación de la raíz a concentración de 10⁶ a 10⁷ UFC mL⁻¹ incrementándose las raíces laterales favoreciendo la absorción de agua y nutrientes.

Por lo anterior, la presente investigación se planteó con el objetivo de aislar cepas de *Azospirillum sp.* de tres localidades y evaluar el efecto de la inoculación de semilla en dos líneas élite de maíz forrajero en la altura y contenido de N en planta.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Aislamiento de cepas e inoculación de semilla

Se colectaron plántulas de maíz y trigo con raíz, en cada localidad; Torreón, Coah.; Celaya, Gto. y Buenavista, Coah., México. De las raíces de las plántulas colectadas, se aislaron 300 cepas de *Azospirillum sp.* en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) por medio de una solución de NaCl al 0.85 %, se eliminaron las que no crecieron en medio NFb y rojo Congo [14], bacilo Gram (-) y movilidad (+). Se clasificaron 40 cepas nativas como probables cepas *Azospirillum*, además se utilizaron 4 cepas comerciales de *Azospirillum brasilense* como testigo (Tabla I). Una vez aisladas se colocaron dentro de un sustrato orgánico líquido, previamente disuelto con agua esterilizada, y se incubaron a 30 ± 1°C por 72 h. Después se cuantificó la concentración de UFC mL⁻¹ por el método de dilución y se diluyó con agua esterilizada hasta obtener 10⁹ UFC mL⁻¹.

Se aplicó 1 mL de biofertilizante por gramo de semilla de maíz y se dejaron reposar por 2 h para que la semilla absorbiera la mayor cantidad de inóculo.

Tabla I. Cepas aisladas e identificadas como *Azospirillum sp.* de diferente origen

Origen	Número de Cepas
Torreón, Coah.	1-17
Celaya, Gto.	18-26
Saltillo, Coah.	31-40
Comercial	27-30

B. Desarrollo de plántulas de maíz

Se sembraron semillas de maíz, bajo condiciones de invernadero, inoculadas con la bacteria, en macetas de plástico, con suelo de bosque previamente esterilizado. Se utilizó semilla de 2 líneas élite de maíz forrajero, la Línea 1 seleccionada para N normal CML-321[15] y la Línea 2, seleccionada con bajo contenido de N CML-384 [16]. Una vez realizada la inoculación se sembraron 4 semillas en cada maceta. Se utilizaron 3 repeticiones por cepa y 2 líneas de maíz forrajero, con 240 macetas en total. Se tomaron lecturas de altura de planta (AP) cada semana durante un mes.

Posteriormente, las plántulas se retiraron del invernadero y se llevaron al laboratorio donde se separaron en raíz y follaje, y se pesaron en fresco en una balanza analítica. El peso se registró por separado, como peso fresco de raíz (PFR); y follaje (PFF). Después las plantas se secaron al sol durante 2 semanas para eliminar humedad, las muestras se volvieron a pesar y se registraron los datos como peso seco de raíz y follaje (PSR y PSF); finalmente se obtuvo la biomasa en cada tratamiento.

C. Determinación del contenido de N

Al mes de establecido el experimento se cortaron las plantas de cada tratamiento y repetición, se pesaron por separado la raíz y tallo en fresco, se colocaron en la estufa a 70 °C hasta eliminar el exceso de humedad, después se volvieron a pesar para obtener el peso seco de cada parte de la planta, cada muestra fue molida, y se determinó el contenido de N por el método de micro-Kjeldahl [17].

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial AXB, líneas y cepas, con 2 y 42 niveles respectivamente. Los análisis se realizaron con ayuda del software estadístico SAS.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea CML-321, presentó mayor peso fresco y seco ($P < 0.01$), lo cual sugiere que el genotipo, fue la causa del incremento, sin embargo, la línea CML-384 fue seleccionada con bajo contenido de N (Tabla II). Lo anterior coincide con estudios realizados en Etiopía con líneas de maíz seleccionadas con bajo nivel de fertilización las cuáles tampoco respondieron al nivel de N [16].

Tabla II. Peso fresco y seco de follaje y raíz de las líneas CML-321 y CML-384, inoculadas con cepas de *Azospirillum sp.*

PFF		PSF		PFR		PSR	
Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media	Línea	Media
CML-321	16.79a	CML-321	1.65a	CML-321	3.18a	CML-321	0.72a
CML-384	11.79b	CML-384	1.26b	CML-384	2.19b	CML-384	0.47b

Comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.01$); PFF=peso fresco de follaje; PSF=peso seco de follaje; PFR=peso fresco de raíz; PSR=peso seco de raíz.

A. Efecto de la interacción entre la cepa y la línea en altura de planta

La interacción entre la cepa y la línea presentó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$). Sin embargo las plántulas de la línea de maíz CML-321, no presentaron diferencias significativas entre si para la altura de planta excepto con la cepa 14 la cual es inferior estadísticamente al resto de los aislamientos y a los testigos comerciales ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey). Para la Línea CML-384 si se observaron diferencias significativas entre sí para la altura de planta ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey)

Donde se observa que las mejores cepas fueron la 1 y la 2 las cuales son superiores significativamente al testigo y a las cepas comerciales (Tabla III). También se observa en este análisis que cepas con una altura de planta mayor en la línea CML-321 tiene una altura de planta estadísticamente inferior en la línea CML-384 por ejemplo la cepa 22. Esto puede deberse a la dificultad de las cepas para expresar su genotipo y asociarse a las raíces de las líneas en un ambiente distinto al de su origen. Por el contrario cepas como la 4 y la 1 presentan una altura de planta mayor al interaccionar con ambas líneas.

Tabla III. Altura de planta en plántulas de las líneas CML- 321 y CML- 384, inoculadas con cepas de *Azospirillum sp.*

Línea CML-321		Línea CML-384	
Cepa	Altura	Cepa	Altura
22	66.71a	1	63.98a
20	66.42a	2	63.72b
18	65.83a	3	63.51c
1	64.1a	4	62.77d
17	64.02a	5	61.39e
26	62.21a	6	59.63f
39	61.91a	7	59.5g
21	61.46a	8	59.38h
com28	61.39a	9	59.34h
37	61.06a	10	58.17h
com29	60.92a	11	57.49h
15	60.55a	12	56.67h
35	60.51a	13	56.65h
10	59.8a	14	56.56h
23	59.43a	15	56.32h
36	59.36a	16	55.64h
19	59.3a	17	55.14h
24	59.27a	18	55.02h
com30	59.24a	19	54.95h
7	58.87a	20	54.88h
9	58.63a	21	53.53h
16	58.17a	22	53.06h
2	58.13a	23	53.03h
4	57.83a	24	51.14h
33	56.39a	25	51.01h
Testigo 41	56.17a	26	50.88h
31	54.95a	com27	50.63h
8	54.9a	com28	50.24h
32	54.27a	com29	49.45h
11	53.61a	com30	48.88h
6	53.5a	31	48.74h
38	53.42a	32	48.71h
12	51.62a	33	48.58h
34	51.53a	34	48.12h
3	50.8a	35	46.93h
com27	50.19a	36	46.17h
25	47.47a	37	45.81h
13	41.36a	38	45.31h
5	41.03a	39	43.25h
14	34.14b	40	41.91h
		Testigo	39.48h
		42	

Comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

Esto puede deberse a su capacidad de adaptación a distintos genotipos y a la capacidad de *Azospirillum sp.* de producir auxinas y giberelinas en medios de cultivo, además de que el ácido indolacético producido por las bacterias puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas inoculadas conduciendo a su estimulación y crecimiento, como lo describen estudios anteriores [18, 8].

B. Efecto de la Cepa

En la Tabla IV se muestra el contenido de N en plántulas de maíz inoculadas con las cepas *Azospirillum sp.* aisladas, donde se puede observar que las cepas 25, 8, 20, 4, 21, 6, 24, 36 y 5 no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey) con el testigo ni con dos de las cepas comerciales de *Azospirillum brasilense* (com28 y com27) y son mejores significativamente que una cepa comercial (com 29) y otras de las cepas aisladas (para la línea CML-321). En cambio para la línea CML-384 no se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey) con el testigo ni con las cepas comerciales de *Azospirillum brasilense*. De estos análisis se puede concluir que hay diferencia entre el efecto de la cepa para aumentar el contenido de nitrógeno en la línea aislada en condiciones de nitrógeno normal CML-321 y no hay efecto significativo en la línea aislada en condiciones bajas de nitrógeno CML-384.

También hay que señalar que aunque las cepas provienen de localidades distintas, algunas de ellas continúan favoreciendo al cultivo en condiciones climáticas diferentes a las de su origen. Al igual que en este experimento, en estudios previos se ha demostrado que *Azospirillum sp.* aumenta el contenido de N, P, K y otros minerales en las plantas inoculadas [19, 20, 21 y 22].

C. Efecto de la interacción entre la línea y la cepa en contenido de N

Las cepas inoculadas en las plántulas de la línea CML-384 no presentan diferencias significativas entre sí, esto significa que los aislamientos, el testigo y las cepas comerciales tienen un efecto similar estadísticamente sobre el contenido de nitrógeno, en cambio las cepas inoculadas en las plántulas de la línea CML-321 si presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey), con lo cual se demuestra que hay 4 cepas inferiores a las demás: 35, 33, com 29 y 1 (tabla IV). También se puede observar que tanto la cepa 4 como la 21, lograron asociarse de manera similar con cada línea, lo cual puede deberse a que son microorganismos capaces de asociarse a líneas con distintos genotipos.

IV CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento y probable identificación de 40 cepas de *Azospirillum sp.* de tres localidades: Torreón Coah., Celaya Gto. y Buenavista Coah. ya que coinciden con la morfología macroscópica y microscópica para las cepas de este género aisladas en el medio selectivo medio NFB y medio rojo Congo, además de la prueba de movilidad característica de *Azospirillum sp.* Sin embargo sería recomendable realizar análisis bioquímicos complementarios y pruebas de biología molecular para asegurar que las cepas correspondan a *Azospirillum sp.* En este estudio no se llevó a cabo porque el objetivo era conocer las cepas que aportaran mayores beneficios en las variables analizadas a las líneas elite de maíces forrajeros evaluados. El efecto de la línea fue significativamente mayor en la línea CML-321 sobre la CML-384 para todos los parámetros analizados: PSF, PFF, PSR, PFR y porcentaje de nitrógeno lo cual puede deberse principalmente al efecto del genotipo de ambas líneas. La interacción entre la cepa y la línea presentó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) para el parámetro de la altura de planta. Las cepas inoculadas a la línea de maíz CML-321, no presentaron

diferencias significativas entre sí para la altura de planta excepto con la cepa 14 la cual fue inferior ($P < 0.05$ para la prueba de Tukey).

Para la Línea CML-384 si se observaron diferencias significativas y las mejores cepas fueron la 1 y la 2 las cuales fueron superiores significativamente al testigo y a las cepas comerciales. Cepas como la 4 y la 1 presentan una altura de planta mayor en ambas líneas. Al analizar el efecto en el contenido de nitrógeno derivado de la interacción de la línea y la cepa se puede observar que la cepa 4 es estadísticamente igual que el testigo y que las cepas comerciales en ambas líneas para la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Tabla IV. Contenido de N en plántulas de las líneas CML- 321 y CML- 384, inoculadas con cepas de *Azospirillum sp.*.

Línea CML-321		Línea CML-384	
Cepa	N (%)	Cepa	N (%)
25	3.84a	3	3.64a
8	3.68a	5	3.57a
20	3.65a	14	3.57a
4	3.64a	11	3.54a
21	3.59a	15	3.49a
6	3.56a	4	3.43a
24	3.54a	21	3.42a
36	3.42a	com27	3.38a
5	3.36a	25	3.37a
com28	3.33a	9	3.36a
13	3.3 a	40	3.35a
19	3.29a	22	3.32a
11	3.26a	23	3.30a
17	3.24a	6	3.30a
37	3.22a	10	3.29a
18	3.19a	2	3.28a
7	3.17a	20	3.23a
9	3.15a	39	3.22a
16	3.15a	13	3.22a
12	3.14a	8	3.16a
15	3.13a	12	3.15a
com27	3.12a	Testigo 42	3.15a
32	3.12a	7	3.06a
10	3.06a	34	3.06a
38	3.06a	1	3.05a
35	2.35b	17	2.17a
33	2.34b	35	2.15a
com29	2.11c	31	2.13a
1	2.01c	37	2.01a
3	2.82a	32	2.95a
34	2.79a	33	2.93a
26	2.77a	26	2.91a
23	2.74a	com30	2.88a
2	2.74a	com28	2.82a
Testigo 41	2.62a	16	2.82a
39	2.6 a	36	2.81a
31	2.52a	38	2.79a

Comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$)

Además en la línea CML-321 fue significativamente superior a una de las cepas comerciales *Azospirillum brasilense*. La cepa 21 también es estadísticamente igual que el testigo y que las cepas

comerciales en ambas líneas para la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), además de ser superior a una cepa comercial en la línea CML-321. Debido a que estas cepas presentaron los valores más altos en cuanto a contenido de nitrógeno en ambas líneas seleccionadas en condiciones de nitrógeno normal y bajo, es probable que puedan provocar este efecto en otras líneas seleccionadas en condiciones similares. En estudios posteriores se pretende analizar estas cepas con otras líneas elite de maíz forrajero en invernadero para comprobar la eficacia en el aumento del contenido de nitrógeno provocado por la interacción de las líneas y las cepas aisladas y evaluadas en este estudio. También se pretende estudiar el efecto de inóculos con mezclas de cepas con efectos favorables como la 1 y 4 (Torreón Coahuila) para elevar la altura de planta en combinación de la 21 (Celaya Gto.) para elevar el porcentaje de nitrógeno.

REFERENCIAS

- [1] Peña, R. A., G. Núñez H y F. Gonzáles C. 2002. Potencial forrajero de poblaciones de maíz y relación entre atributos agronómicos con la calidad. *Téc. Pecu. Mex.* 40:215-228.
- [2] Núñez, H. G., Anaya S. A., Faz C.R. y Serrato M. H. 2015. Híbridos de maíz forrajero con alto potencial de producción de leche de bovino. *Agrofaz* 15 (1):47-56.
- [3] Martínez, V. R. 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas XIII Congreso del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.
- [4] Brasil, M.S., Baldani, J. I. and Baldani, V. L D. 2005. Ocorrencia e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* 29:179.
- [5] Radwan, T.E.E., Mohamed, Z. K. Reis, V.M. 2005. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (10):997.
- [6] Kuss, A.V., Kuss V. V., Lovato T., Flôres M. L. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesq. Agropec. Brás.* 42 (10):1459.
- [7] Eory, V.J., Momo, F.R., Alvarez, M. 1995. Desarrollo y sobrevivencia de *Azospirillum* en la raíz y rizósfera del maíz a diferentes niveles de acidéz. *Rev. Argent. Microbiol.* 27(2):99-105.
- [8] Lucangeli, C. and Bottini, R. 1997. Effects of *Azospirillum* spp on endogenous gibberellins content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis* 23(1):63-72.
- [9] García-Olivares, J. G., A. Mendoza-Herrera, N. Mayek-Pérez. 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.
- [10] González, H. A., Pérez L. D., Franco, M. O., Balbuena, M. A., Gutiérrez, R. F., Romero S. H. 2011. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum* brasilense bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *Ciencias Naturales y Agropecuarias* Vol. 18-1, Pp. 51-58.
- [11] Cracogna, M. F., Iglesias M. C., Díaz I., Gonzáles N. y Carvajal M. L. 2003. Utilización de *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de fósforo en el cultivo de trigo. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.* Resumen: A-045.
- [12] Canto-Martín, J.C., Medina-Peralta S. y Morales Avelino. D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropic. Subtropic. Agroecosyst.* 4: 21 – 27.
- [13] Kalpulnik, Y. 1996. Nonsymbiotic nitrogen-fixing soil microorganisms. In: *Plant roots, the hidden half.* Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi. Editors Marcel Dekker, Inc. New York. p. 757-767.
- [14] Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:990-991.
- [15] Kikafunda, J., Kyetere, D.T., Bigirwa, G., Imanowa, I. and Nakayima, A. 2001. Response of maize varieties to nitrogen: selection for N-use efficiency in Uganda. *Seventh eastern and southern Africa regional maize conference.* p 233-240.

- [16] Worku, M., Tuna, H., Abera, W., Wolde, L., Diallo, A., Afriyie, T. S., Guta, A. 2001. Developing low N tolerant maize varieties for mid altitude subhumid agro-ecology of Ethiopia. Seventh eastern and southern Africa regional maize conference. p 197-201.
- [17] AOAC. 1980. Official methods of analytical chemistry. 13th edition. Washington, D.C. USA.
- [18] Bar, T., and Y. Okon. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Can. J. Microbiol.* 39:81-86.
- [19] Avivi, Y., and M. Feldman. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* 31:237-245.
- [20] Murthy, M. G., and J. K. Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* 108:281-285.
- [21] Pacovsky, R. S., E. A. Paul and G. J. Bethlenfalvay. 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 85:145-148.
- [22] Caballero-Mellado, J., M. G. Carcaño-Montiel, and M. A. Mascarúa-Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13:243-253.