

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS BENEFICOS

I. *AZOSPIRILLUM*

Interactions between Plants and Beneficial Microorganisms

I. *Azospirillum*

Yoav Bashan¹, Gina Holguin¹, Ronald Ferrera-Cerrato²

RESUMEN

Azospirillum es la bacteria asociativa más estudiada. Afecta positivamente una gran diversidad de plantas. Ha sido aislada de diferentes regiones geográficas a partir de una gran variedad de plantas pertenecientes a diferentes familias botánicas. No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, sin embargo, se discuten algunos mecanismos de acción que han sido propuestos por diferentes autores: i) Fijación de nitrógeno, ii) efectos hormonales, iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular, y v) la hipótesis aditiva la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba.

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas de *Azospirillum* le permiten ser un competidor eficaz en la rizosfera, pese a la abrumadora microflora nativa con la capacidad de colonizar raíces vegetales. Se ha encontrado que algunos de los efectos positivos que *Azospirillum* provoca sobre las plantas se ven incrementados al inocularse con otros grupos de microorganismos.

A pesar de experimentos exitosos, tanto en el campo como en el invernadero, el desarrollo comercial de *Azospirillum* se ha retrasado. La principal dificultad ha sido la inconsistencia de los resultados de campo obtenidos con la inoculación de bacterias de este género. Hay todavía muchas preguntas que responder respecto a la interacción *Azospirillum*-planta y sus respuestas requieren de un intenso esfuerzo de investigación. Una vez respondidas podremos determinar si la interacción

Azospirillum-planta se utilizará en un futuro solamente como un modelo biológico para el estudio básico de asociaciones entre plantas y bacterias benéficas, o si tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro.

Palabras clave: Agente de control biológico, bacterias diazotróficas, BPCP, especificidad, fragmentos de restricción, hibridación, inoculantes, perfil protéico, agroquímicos, rizosfera, técnicas inmunológicas.

SUMMARY

Azospirillum is the most studied associative bacteria. It affects positively a large number of plant species. It was isolated from different geographical regions and from a large number of plants belonging to diverse botanical families. The mechanism by which *Azospirillum* affects plant growth is not defined. However, the following mechanisms were proposed as the mode of action of this bacteria: (i) Nitrogen fixation, (ii) hormonal effects, (iii) increase in growth of the entire root system enabling it to adsorb water and minerals better, (iv) change in root-cell membrane function by bacterial signal molecules, and (v) the additive hypothesis suggesting that all the above mentioned mechanisms are operating each on a small scale. Their combined effect increases plant growth.

The physiological and biochemical properties of *Azospirillum* allows it to compete efficiently with native rhizosphere populations and to colonize plant roots. Some of the positive effects of *Azospirillum* are enhanced when it is coinoculated with other microorganisms. Despite success in greenhouse and field experiments, commercial exploitation of *Azospirillum* is very limited. The major difficulty is the inconsistent and unpredicted field results obtained with this bacterial genus, leaving many open questions on the basic interaction of *Azospirillum* with plants. This review presents a critical and comprehensive analysis of the developments in environmental and physiological

¹ Departamento de Microbiología, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIB), Apartado Postal 128, 23000 La Paz, BCS, México.

² Sección de Microbiología de Suelos, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, 56230 Montecillo, Edo. de México, México.

Correspondencia: Fax: +52 (682) 54710 ó 53625.

Aceptado: Enero de 1996.

studies related to *Azospirillum* interactions with plants based on information published between 1976 and 1996. This review emphasizes the central issues of *Azospirillum* research today, such as coinoculation with other microorganisms and hormonal studies, shows the less researched areas, and proposes possible avenues for the exploitation of bacterium in agriculture.

Index words: *Biological control agent, BPCP, diazotrophic bacteria, hybridization, immunological techniques, inoculants, protein profile, restriction fragments, rhizosphere, specificity.*

EL GENERO *AZOSPIRILLUM*

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada en Holanda por Beijerinck (1925) a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. Esta bacteria fue posteriormente aislada de suelo adherido a pastos marinos secos en Indonesia (Schröder, 1932; H.C. Derx, sin publicar, 1949, citado en Becking, 1982) y J. Döbereiner *et al.* (1976) aislaron la bacteria, siendo los primeros en reportar su amplia distribución en la rizosfera de diversos pastos tropicales. Desde entonces, se han aislado cepas de *Azospirillum* a partir de la filosfera (superficie de la planta que se encuentra expuesta al aire) (Agarwala-Dutt *et al.*, 1991; Becking, 1982; Singh, 1992a) de raíces de numerosos pastos (silvestres y cultivados), cereales y de plantas de muy diversas familias, así como de suelos tropicales, subtropicales, templados y árticos. (Bally *et al.*, 1983; Bilal *et al.*, 1990; Döbereiner *et al.*, 1976; Fages y Arsac, 1991; Fages y Lux, 1991; Gamo y Ahn, 1991; George, 1990; Hill *et al.*, 1983; Horemans *et al.*, 1988; Kosslak y Bohlool, 1983; Ladha *et al.*, 1987; Lamm y Neyra, 1981; Li y Castellano, 1987; New y Kennedy, 1989; Nosko *et al.*, 1994; Nur *et al.*, 1980b; Penot *et al.*, 1992; Rangel-Lucio *et al.*, 1991; Rao y Venkateswarlu, 1982; Singh, 1992b; Sundaram *et al.*, 1988; Tyler *et al.*, 1979; Villarreal-Romero, 1990; Wong *et al.*, 1980).

Tarrand *et al.* (1978) propusieron a *Azospirillum* como género con base en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos sobre homología del ADN (Falk *et al.*, 1986) distinguiendo dos especies: *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*. Se han descrito tres especies más: *A. amazonense* (Falk *et al.*,

1985; Magalhães *et al.*, 1983), aislada de pastos en el área del Amazonas en Brasil; la especie halo-tolerante *A. halopraeferans*, asociada exclusivamente a raíces del pasto Kallar (Reinhold *et al.*, 1987) y la especie que degrada pectina aislada a partir de raíces de arroz, *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989; Khammas y Kaiser, 1991). Sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas en los últimos años pertenecen a las especies *A. brasilense* o *A. lipoferum* (Krieg y Döbereiner, 1986).

EFEECTO DE *AZOSPIRILLUM* SOBRE LAS PLANTAS

La inoculación a plantas con *Azospirillum* puede dar como resultado un cambio significativo en varios parámetros de crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento de la cosecha. El (Los) mecanismo(s) de acción de *Azospirillum* sobre las plantas no ha(n) sido todavía elucidado(s).

La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han llevado a cabo en cereales y pastos (Patriquin *et al.*, 1983) y, en menor grado, en otras familias de plantas (Bashan *et al.*, 1989b, 1989c; Crossman y Hill, 1987; Dayakar-Yadav y Nagendra-Kumar, 1991; Del-Gallo y Fabbri, 1990; Fages y Arsac, 1991; Favilli *et al.*, 1993; Fernández-Vega Figueroa, 1995; Gamo y Ahn, 1991; Govedarica *et al.*, 1993; Itzigsohn *et al.*, 1995; Kolb y Martin, 1985; Kothari Saraf, 1986; Mortley y Hill, 1990; Puente y Bashan, 1993; Russel e Ifiorah, 1995; Saha *et al.*, 1985; Sarig *et al.*, 1990; Zaady *et al.*, 1994). Los estudios han demostrado los siguientes resultados: i) Incrementos en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles, y mazorcas; ii) una floración y aparición de espigas más temprana; iii) incremento en el número de espigas y granos por espiga; iv) plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja; y v) tasas de germinación más altas (Albrecht *et al.*, 1981; Baldani y Döbereiner, 1980; Bashan, 1986a; Bhattarai y Hess, 1993; Bouton y Zuberer, 1979; Bouton *et al.*, 1979; Cohen *et al.*, 1980; Fulchieri y Frioni, 1994; Hegazi *et al.*, 1983; Kapulnik *et al.*, 1981a; Mertens y Hess, 1984; Millet y Feldman, 1986; O'Hara *et al.*, 1981; Pacovsky *et al.*, 1985b; Puente y Bashan, 1993; Schank *et al.*, 1981, 1985; Stancheva *et al.*, 1992; Warembourg *et al.*, 1987; Yahalom *et al.*, 1984). También se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (discusión posterior).

En algunos estudios de campo, realizados con cereales, se ha llegado a observar una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1982, 1983). También se ha reportado un efecto a simple vista sobre el crecimiento de varios vegetales tales como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berenjena (*Solanum melongena* L.), pimiento (*Capsicum annuum*) y algodón (*Gossypium barbadense*) (Bashan *et al.*, 1989b).

El incremento por efecto de la inoculación con *Azospirillum* en el rendimiento total de plantas crecidas en el campo, varió entre 10 y 30% (Fulchieri y Frioni, 1994; Kapulnik *et al.*, 1981c, 1987; Rao *et al.*, 1983; Watanabe y Lin, 1984). La inoculación de trigo con *Azospirillum* incrementó significativamente el rendimiento de la cosecha, desde 23% hasta 63% en 1986 y desde 29% hasta 43% en 1987 (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). En algunos trabajos se obtuvieron incrementos en rendimiento total de la cosecha de 50 a 270% en relación a los controles con plantas no inoculadas. La obtención de incrementos hasta 20% en el rendimiento se considera comercialmente valiosa para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes. Sin embargo, la información disponible puede resultar insuficiente como para pensar en la comercialización de un inóculo bacteriano. Por ahora, existen sólo algunas preparaciones comerciales de *Azospirillum* disponibles en el mercado (Fages, 1992; discusión posterior). No obstante ello, se han reportado muy pocos resultados negativos o nulos por efecto de la inoculación (Albrecht *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1984a, 1984b; Stancheva *et al.*, 1992). Los resultados con rendimientos muy altos se han debido casi siempre a la utilización de parcelas control de características no usuales tales como: suelos pobres en nutrientes, riego ineficiente, condiciones climáticas inapropiadas para el cultivo en particular, etc. lo cual provoca un incremento en el rendimiento no relacionado con la actividad de *Azospirillum* (Jagnow, 1987). Es difícil realizar una evaluación apropiada de trabajos sobre "cómo responde la planta en cuanto a rendimiento", debido a la carencia de ensayos analizados estadísticamente que integren datos de diferentes localidades y temporadas de crecimiento. Además, muchos de los experimentos no pueden repetirse apropiadamente como resultado de la carencia de detalles técnicos esenciales en la descripción de métodos, tales como preparación y concentración del inóculo y métodos de inoculación. Al evaluar datos acumulados a nivel mundial durante los últimos veinte años sobre experimentos de inoculación con *Azospirillum*, Okon y

Labandera-González (1994) concluyeron que los experimentos exitosos fueron aquellos en los cuales los investigadores utilizaron en el inoculante el nivel óptimo de células. Vandenhove *et al.* (1993) encontraron que si el inóculo de *A. brasilense* es tomado de la fase exponencial del cultivo, las bacterias sobreviven mejor en suelo que tomando el inóculo de la fase estacionaria. Se propone estandarizar y optimizar inóculos para así evitar la variabilidad en la respuesta vegetal que factores de manejo no controlados pudieran provocar.

Okon (1985) concluyó que se obtuvieron efectos positivos en el rendimiento de la cosecha en aproximadamente 65% de los experimentos realizados en el campo. En 75% de los experimentos con cereales de verano, se obtuvieron incrementos en el rendimiento; con trigo de primavera se obtuvo incremento significativo sólo en 50% de los experimentos (Schank y Smith, 1984; Smith *et al.*, 1984b). En 70-75% de los experimentos realizados en macetas con algodón y varios vegetales se obtuvo un incremento significativo en el rendimiento desde 23% hasta 72% (Bashan *et al.*, 1989b).

Dos factores básicos que contribuyen a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación son: la variedad de la planta cultivada, ya que cada una responde distinto a la inoculación (Arsac *et al.*, 1990; Bouton *et al.*, 1979; Millet *et al.*, 1986) y el nivel de fertilización con nitrógeno. Los rendimientos más altos se han obtenido con niveles de fertilización de nitrógeno más bajos de lo normal (75% de la cantidad de fertilizante nitrogenado utilizado normalmente (Kapulnik *et al.*, 1981b; Lau Wong, 1987; Macalintal y Urgel, 1992; Mertens y Hess, 1984; O'Hara *et al.*, 1987). Por lo tanto se consideró la inoculación con *Azospirillum* como un sustituto parcial a la fertilización con nitrógeno. Sin embargo, algunos trabajos demostraron que se incrementó el rendimiento aún con un nivel de fertilización al 100% y que el nitrógeno puede llegar a incrementar el número de bacterias en la rizosfera (Bashan *et al.*, 1989b; Chela *et al.*, 1993; Del Gallo y Fabbri, 1990; Kolb y Martin, 1988; Millet y Feldman, 1986).

Un problema crucial en la mayoría de los experimentos de campo e invernadero, realizados hasta ahora, es la inconsistencia de la respuesta de la planta a la inoculación con *Azospirillum* spp., no importando de qué especie vegetal se trate. De esta manera no es posible garantizar el éxito del experimento (Bashan y Levanony, 1990; Bashan *et al.*, 1993; Patriquin *et al.*, 1983). Numerosos trabajos reportados en la literatura popular agrícola (especialmente aquellas revistas publicadas en

Israel y dirigidas a los campesinos) y de compañías comerciales indican, que experimentos de campo con diseños experimentales idénticos, conducidos simultáneamente bajo condiciones ambientales similares, no han producido los mismos resultados en el rendimiento que se esperaba encontrar a pesar de haber experimentado con diferentes variables del manejo agrotecnológico (maquinaria, control de hierbas y manejo de pesticidas), la utilización de cepas bacterianas diferentes, variando el tipo de planta huésped, o a través de técnicas de inoculación mejoradas (Schank y Smith, 1984). El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro. El problema podría ser resuelto si se llegan a dilucidar los siguientes factores: mecanismo(s) por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal; colonización radicular de *Azospirillum*; factores de interacción y competencia entre *Azospirillum* y otros microorganismos de la rizosfera y el papel de la planta huésped en estas interacciones; estudio de los genes involucrados en la asociación planta-bacteria y la subsecuente manipulación genética de las bacterias; actividad y sobrevivencia de *Azospirillum* en la rizosfera al ser afectada por diversos factores ambientales (pH, salinidad, materia orgánica, concentración de calcio y de nitrógeno), incluyendo la inconsistencia de la respuesta vegetal. El conocer la participación de cada uno de estos factores en la interacción *Azospirillum*-planta, permitirá el diseño de técnicas de inoculación más efectivas.

EFFECTOS DE LA INOCULACION SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAICES

Los efectos más sobresalientes de la inoculación vegetal con *Azospirillum* son los diversos cambios morfológicos que sufre el sistema radicular. Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. Se ha observado que el nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, es de alrededor de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc/ml) (Bashan, 1986c; Bashan *et al.*, 1989b; Kapulnik *et al.*, 1985c; Okon y Kapulnik, 1986; Smith *et al.*, 1984b), mientras que para el maíz es de 10^7 ufc/ml (Fallik *et al.*, 1988). Una concentración de

inóculo de 10^8 - 10^{10} ufc/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular (Barbieri *et al.*, 1988; Bashan, 1986c, 1990; Kapulnik *et al.*, 1985c; Morgenstern y Okon, 1987a), excepto para el tomate cuyo nivel de inoculación en condiciones *in vitro* es $>10^8$ ufc/ml (Hadas y Okon, 1987). Estos datos no han revelado cuantas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva.

Los efectos positivos de la inoculación se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz (Fallik *et al.*, 1994), incremento en la longitud (particularmente en la zona de elongación) (Del Gallo y Fendrik, 1994; Kapulnik *et al.*, 1985b, 1985c; Kolb y Martin, 1985; Levanony y Bashan, 1989b; Sarig *et al.*, 1988); en el número y longitud de las raíces laterales, lo cual incrementa el volumen radicular (Barbieri *et al.*, 1986, 1988; Kolb y Martin, 1985; Morgenstern y Okon, 1987a; Tien *et al.*, 1979; Venkateswarlu y Rao, 1983), incremento en el peso seco de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Kapulnik *et al.*, 1981a; Morgenstern y Okon, 1987a; Schank *et al.*, 1981; Umali-Garcia *et al.*, 1980), en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares (Dubrovsky *et al.*, 1994; Hadas y Okon, 1987; Kapulnik *et al.*, 1985c; Martin y Glatzle, 1982; Morgenstern y Okon, 1987a; Umali-Garcia *et al.*, 1980; Venkateswarlu y Rao, 1983), en el área de superficie radicular (Bashan, 1986c; Fallik *et al.*, 1988), promoción de la división celular en el meristemo radicular (Levanony y Bashan, 1989b), cambios en los arreglos celulares de la corteza (Kapulnik *et al.*, 1985c; Lin *et al.*, 1983; Okon *et al.*, 1983), estimulación de la exudación radicular (Heulin *et al.*, 1987; Lee y Gaskins, 1982) y cambios en la morfología externa de las raíces (Bashan *et al.*, 1989b; Morgenstern y Okon, 1987a). Estas observaciones se fundamentaron en estudios microscópicos, pero no pudieron ser confirmadas en un estudio posterior donde se utilizó la misma cepa de *A. brasilense* (Levanony *et al.*, 1989). Otros estudios indican claramente que ocurre una disminución en la longitud radicular, masa y volumen, pese a que se observa un incremento en parámetros de crecimiento de los brotes (Kucey, 1988a; Murty y Ladha, 1988; Reynders y Vlassak, 1982).

Tales efectos contradictorios en raíces, a consecuencia de la inoculación de plantas con cepas de *Azospirillum*, son aparentemente reales, ya que la mayoría de dichos parámetros morfológicos se pueden medir fácilmente y con precisión, y fueron analizados utilizando métodos estadísticos reconocidos.

COLONIZACION RADICULAR POR *AZOSPIRILLUM*

Azospirillum puede colonizar la parte interna o externa de la raíz. En esta última, las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular. Por otro lado, las bacterias colonizadoras de la parte externa de la raíz se encuentran embebidas en la capa mucilaginoso que cubre la superficie radicular (Bashan *et al.*, 1986; Berg *et al.*, 1979; Bilal *et al.*, 1993; Murty y Ladha, 1987; Schank *et al.*, 1979; Umali-Garcia *et al.*, 1981). Tanto raíces vivas como muertas pueden ser colonizadas (Bashan y Levanony, 1988^a; Bashan *et al.*, 1986). En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Andreeva *et al.*, 1991; Levanony *et al.*, 1989; Patriquin y Döbereiner, 1978; Umali-Garcia *et al.*, 1981).

Azospirillum tiende a colonizar preferentemente las zonas de elongación de la raíz y de pelos radiculares (Assmus *et al.*, 1995; Bashan *et al.*, 1986, 1991a; Okon y Kapulnik, 1986; Zamudio y Bastarrachea, 1994). En cereales, la colonización ocurre principalmente en la superficie radicular y muy pocas bacterias se adhieren a los pelos radiculares (Bashan y Levanony, 1989b; Okon y Kapulnik, 1986), mientras que en arroz se observa frecuentemente colonización masiva en estas estructuras (Murty y Ladha, 1987). En todas las plantas que han sido inoculadas con *Azospirillum* muy pocas veces se ha detectado penetración de *Azospirillum* a pelos radiculares, y se asume que *Azospirillum* no penetra a los espacios intercelulares a través de pelos radiculares. Sin embargo, *A. brasilense* Sp-245 fue encontrada repetidamente en altas densidades en el interior de células de pelos radiculares en plantas de trigo (Assmus *et al.*, 1995).

Algunas cepas de *Azospirillum* pueden colonizar los espacios intercelulares de la corteza (Andreeva *et al.*, 1991; Levanony *et al.*, 1989; Patriquin y Döbereiner, 1978; Whallon *et al.*, 1985). La población bacteriana interna comprende la mayoría de la población total radicular en trigo (Bashan *et al.*, 1986), mientras que en mijo (pearl millet) la mayoría de la población de *Azospirillum* se concentra en la superficie radicular (Matthews *et al.*, 1983). No siempre ocurre colonización interna de raíces; tal es el caso del pasto "Kallar" en el cual sólo se ha detectado colonización masiva en la superficie (Reinhold *et al.*, 1986).

Estudios sobre colonización vascular por una cepa específica de *A. lipoferum*, detectada con microscopía de luz (Patriquin y Döbereiner, 1978), no fueron confirmados por estudios de microscopía electrónica al utilizar *A. brasilense* (Levanony *et al.*, 1989).

Se desconoce el mecanismo de penetración de *Azospirillum* a los espacios intercelulares. Las diversas teorías, propuestas hasta ahora, son: (i) invasión bacteriana vía tejidos corticales destruidos donde ramificaciones de raíces laterales emergen a partir de raíces principales (Matthews *et al.*, 1983; Patriquin y Döbereiner, 1978; Umali-Garcia *et al.*, 1980, 1981), (ii) invasión a través de pelos radiculares lisados y heridas mecánicas ocasionadas durante el crecimiento de la planta, y (iii) penetración directa a través de lamelas intermedias seguida de degradación de la pectina una vez que la bacteria logra penetrar por hendiduras de la zona cubierta por epidermis donde emerge la raíz lateral (Umali-Garcia *et al.*, 1980). Se conoce que algunas cepas de este género producen pectinasas *in vitro* (Khammas *et al.*, 1989; Okon y Kapulnik, 1986; Plazinski y Rolfé, 1985a; Tien *et al.*, 1981).

Se han identificado dos fases en el mecanismo de adhesión de *Azospirillum* a raíces de trigo. La primera fase del proceso de adhesión de *Azospirillum* consiste en una adhesión rápida y débil dependiente de proteínas superficiales bacterianas; al enjuagar las raíces con agua, agitándolas suavemente, la mayoría de las bacterias se pueden liberar (Bashan *et al.*, 1986). La mayoría de las áreas radiculares son saturadas en un período de dos horas después de la inoculación, encontrándose variación dependiendo de la fase de crecimiento bacteriana y de la cepa utilizada (Bashan y Levanony, 1988b; Evers *et al.*, 1988a, 1988b; Gafni *et al.*, 1986; Sukiman y New, 1990; Umali-Garcia *et al.*, 1980). El segundo paso (llamado anclaje) bajo condiciones *in vitro* es independiente del primero y consiste en un anclaje firme, caracterizado por la producción de fibrillas largas. Estas han sido observadas en estudios de microscopía electrónica de barrido en diversas especies vegetales (Bashan *et al.*, 1986, 1991a; Gafni *et al.*, 1986; Hadas y Okon, 1987; Okon y Kapulnik, 1986; Patriquin *et al.*, 1983; Umali-Garcia *et al.*, 1980) formando una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular de las plantas (Bashan y Holguin, 1993; Bashan *et al.*, 1991a) e involucra la participación de un polisacárido extracelular (Michiels *et al.*, 1991). Este proceso empieza después de 8 h de incubación y alcanza un nivel máximo

después de 16 h (Michiels *et al.*, 1991). Estudios preliminares indican que las fibras contienen compuestos de naturaleza proteica y polisacáridos (Bashan y Levanony, 1989b; Michiels *et al.*, 1991). El movimiento de *Azospirillum* a lo largo de la superficie radicular es mínimo, debido a la formación de estas fibras producidas por la misma bacteria. Estas fibras de soporte aseguran el transporte vertical bacteriano debido al crecimiento de la punta radicular (caliptra) hacia capas de suelo más profundas (Bashan y Levanony, 1989a).

Se ha demostrado adhesión polar de células de *Azospirillum* en raíces (Levanony *et al.*, 1989; Patriquin *et al.*, 1983; Whallon *et al.*, 1985). Sin embargo, un examen detallado de este fenómeno reveló que comprendía sólo un pequeño porcentaje del total de células. La mayor parte de la superficie radicular fue colonizada por bacterias en posición horizontal lo cual es termodinámicamente más estable. La cinética de adhesión de *A. brasilense* Sp-245 a plántulas de trigo se ajustó a la isoterma de adsorción de Langmuir indicando que existe un número saturable y específico de sitios en las raíces disponibles a ser colonizados por la cepa (Zamudio y Bastarrachea, 1994).

La adhesión fibrilar de la bacteria es dependiente de un metabolismo bacteriano activo; bacterias muertas no se adhirieron a raíces, pero bacterias vivas sí se adhirieron a materia vegetal muerta (Bashan *et al.*, 1986; Gafni *et al.*, 1986). El comparar el anclaje de *Azospirillum brasilense* Cd al poliestireno hidrofóbico con el anclaje a raíces reveló que células vivas se adhirieron significativamente más a raíces. Las células crecidas sin manganeso se anclaron a raíces en mayor concentración que células crecidas con manganeso (Bashan y Holguin, 1993).

Se desconoce el mecanismo específico por medio del cual *Azospirillum* se adhiere a las raíces. Diversos factores químicos, fisiológicos, ambientales y nutricionales regulan la adhesión de *A. brasilense* a las raíces (Bashan y Holguin, 1993; Bashan y Levanony, 1989b; Umali-García *et al.*, 1980). A través de la utilización de un mutante de *A. brasilense* sin flagelos, se demostró que el flagelo polar está involucrado en la adhesión de las bacterias a las raíces, encontrándose que flagelos polares purificados se adhieren a raíces de trigo bajo condiciones *in vitro* (Croes *et al.*, 1993). Se ha sugerido que el mecanismo de adhesión bacteria-planta está mediado por lectinas expuestas en la superficie celular de la bacteria (Del-Gallo *et al.*, 1989; Tabary *et al.*, 1984; Umali-

García *et al.*, 1980) o contenidas en el material fibrilar (Bashan y Levanony, 1988b). Es probable que la lectina de *A. brasilense* esté involucrada en la recepción de la aglutinina de germen de trigo (una de las lectinas de plantas más estudiadas) (Antonyuk *et al.*, 1993). Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp-245 promovió la fijación de nitrógeno (Antonyuk *et al.*, 1993, 1995) por esta cepa, la excreción de amonio y la síntesis de IAA. Estos resultados sugieren la hipótesis de que la aglutinina de germen de trigo tiene la función de molécula de comunicación celular, la cual altera el metabolismo de *Azospirillum* en beneficio de la planta (Antonyuk *et al.*, 1995). Parece ser que el mecanismo de adhesión a raíces y la agregación de células bacterianas se encuentran relacionados con el contenido de polisacáridos en la superficie bacteriana (Del-Gallo y Haegi, 1990; Michiels *et al.*, 1990; Zaady y Okon, 1990).

Observaciones microscópicas de raíces inoculadas con *Azospirillum* revelaron la presencia de dos tipos celulares: una forma celular altamente móvil y una forma sésil que presenta dos tipos de exopolisacáridos: el componente de polisacárido capsular (CPS) y el componente de exopolisacárido (EPS) (Del Gallo *et al.*, 1989). La producción de polisacáridos extracelulares, así como de una cápsula, forma parte del proceso de formación de las formas celulares sésiles llamadas quistes (Sadasivan y Neyra, 1985).

Se ha encontrado que al crecer *Azospirillum* bajo ciertas condiciones de cultivo, tales como presencia de fructosa y nitrato, se promueve la síntesis de polisacáridos exocelulares provocando la formación de agregados celulares. Contrario a estos resultados, Zaady *et al.* (1993) encontraron que células de *A. brasilense* Cd crecidas con fructosa no formaron agregados. Se ha demostrado que un polisacárido de la superficie celular de *A. brasilense* que se une al colorante fluorescente Calofluor, es necesario para la floculación o agregación de *A. brasilense* (Michiels *et al.*, 1990). Es posible que las microfibrillas de celulosa detectadas en los agregados celulares así como los polisacáridos extracelulares, estén participando en el proceso de infección en la rizosfera, provocando la agregación de las células bacterianas colonizadoras (Sadasivan y Neyra, 1985). Se propone que la formación de agregados es una ventaja ecológica para *Azospirillum* ya que permite a la bacteria establecerse en mayor concentración en la superficie radicular. Además, bajo condiciones desfavorables, los agregados incrementarían la posibilidad de sobrevivencia de *Azospirillum* en la rizosfera.

La capacidad de adhesión de *Azospirillum* a las raíces vegetales permite a la bacteria establecer una asociación permanente con la planta. Esto es importante por varias razones: (i) Si las bacterias no se adhieren a las células radiculares, las sustancias excretadas por las bacterias se difunden hacia la rizosfera donde son consumidas por otros microorganismos. Sin embargo, si las bacterias se adhieren a la superficie radicular, parte de estas sustancias penetran a los espacios intercelulares de la corteza radicular. (ii) Si no se encuentran firmemente adheridas, las bacterias pueden ser fácilmente desprendidas de la raíz por el agua, provocando que mueran en el suelo ya que se ha demostrado que *Azospirillum* no sobrevive bien en suelos sin plantas (Bashan y Levanony, 1990; Bashan *et al.*, 1995d). (iii) Los sitios disponibles de adhesión en raíces sin la presencia de *Azospirillum* son susceptibles de ser colonizados por otras bacterias no-benéficas. Concluyendo, el mecanismo de colonización radicular de *Azospirillum* varía dependiendo de la cepa bacteriana, especie vegetal, condiciones ambientales tales como humedad del suelo, temperatura y pH, factores químicos, fisiológicos y nutricionales y otros todavía no identificados. La interacción entre todas estas variables crea diferencias en grados y patrones de colonización radicular, tamaños poblacionales y sitios de colonización. Las principales zonas de colonización, en la mayoría de plantas estudiadas, son las de elongación y zonas de pelos radiculares.

La colonización de la superficie de la raíz, apoyada por el anclaje fibrilar, es un aspecto fundamental en la colonización de *Azospirillum*. La colonización interna de las raíces sólo ha sido demostrada en algunas especies vegetales.

MECANISMOS DE ACCION DE *AZOSPIRILLUM* SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción (Cuadro 1): i) Fijación de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta; ii) efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal; iii) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales y que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; iv) alteración del funcionamiento de la membrana por medio

de moléculas de comunicación celular (moléculas de comunicación celular de bajo peso molecular pueden ser responsables en alterar actividad y funciones de membrana relacionadas con la absorción de iones); y v) la hipótesis aditiva la cual propone la intervención de todos los mecanismos mencionados arriba. Se desconoce si estos mecanismos se expresan dependiendo de la cepa de *Azospirillum*. Sin embargo, ya que se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, las cepas alteran la proporción brotes/raíces (peso seco) de la planta, se propone que las bacterias de este género ejercen sobre la planta un efecto multiparamétrico (Bashan y Dubrovsky, 1996; Bashan y Levanony, 1990).

Fijación de nitrógeno por *Azospirillum*

Todas las cepas silvestres de *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico ya sea como bacterias libres o en asociación con plantas y participan en varias transformaciones relacionadas con el ciclo del nitrógeno (Heulin *et al.*, 1989; Hurek *et al.*, 1988; Tarrand *et al.*, 1978). Después de la inoculación hay un incremento en el nitrógeno total de brotes y granos de plantas inoculadas (Baldani *et al.*, 1983, 1987; Boddey *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1980; Hegazi *et al.*, 1983; Kapulnik *et al.*, 1981a, 1983, 1985b; Mertens y Hess, 1984; Nur *et al.*, 1980a; O'Hara *et al.*, 1981; Pacovsky *et al.*, 1985b; Rennie *et al.*, 1983; Schank *et al.*, 1981; Wani *et al.*, 1985; Warembourg *et al.*, 1987; Yahalom *et al.*, 1984). De aquí que, la fijación de nitrógeno fue el primer mecanismo principal sugerido para explicar el incremento del crecimiento vegetal por *Azospirillum*. La incorporación de nitrógeno atmosférico en la planta huésped por *Azospirillum* fue evaluada principalmente por el método de reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968). Sin embargo, a través de estudios que involucran el uso de $^{15}\text{N}_2$, se ha comprobado que las plantas obtienen parte de su nitrógeno de la atmósfera. Para una revisión detallada de este tema, se recomiendan los trabajos de Boddey (1987) y Boddey y Döbereiner (1988).

La contribución de la fijación de nitrógeno bacteriana al balance de nitrógeno de las plantas, está fundamentada en el hecho de que la actividad de la nitrogenasa en raíces, medida a través de la técnica de reducción de acetileno, se ve significativamente incrementada (Berg *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1980; Hegazi *et al.*, 1983; Hess, 1982; Kapulnik *et al.*, 1981b; Okon *et al.*, 1983; Patnaik *et al.*, 1994; Rao y Rajamamohan Rao, 1983; Yahalom *et al.*, 1984). Si todo el nitrógeno fijado por actividad bacteriana

Cuadro 1. Mecanismos de acción de *Azospirillum* sobre las plantas.**(A) Fijación de nitrógeno**

Evidencia a favor	Evidencia en contra
Acumulación de compuestos nitrogenados en plantas inoculadas	Las cepas mutantes Nif ⁺ y Nif ⁻ provocaron un mismo efecto sobre las plantas
Alta actividad de la nitrogenasa en plantas inoculadas	Efectos positivos en plantas crecidas en condiciones inhibitorias a la fijación de N
Crecimiento vegetal normal en plantas inoculadas sin haber incorporado N	Mínima actividad de nitrogenasa en plantas con respuesta positiva a la inoculación
5-18% del nitrógeno total en la planta proviene de la fijación de nitrógeno	Las concentraciones de nitrógeno fijado no explican el incremento en rendimiento de las plantas

(B) Hormonas vegetales

Evidencia sobre	Falta de evidencia sobre
<i>Azospirillum</i> produce <i>in vitro</i> varias hormonas vegetales	Efecto de mutantes deficientes en la producción de hormonas
La adición de hormonas provoca el mismo efecto sobre las plantas que la inoculación	Cambios en el equilibrio hormonal de las raíces
Mutantes sobreproductores de hormonas provocaron un efecto más pronunciado sobre el crecimiento vegetal	Relación entre efectos hormonales y producción en una planta mejorada
Prueba de que la inoculación cambia la concentración de hormonas en la planta	

(C) Promoción a nivel general del crecimiento de la planta y en la absorción de minerales

Evidencia sobre	Falta de evidencia sobre
Acumulación de minerales en follaje	Actividades enzimáticas relacionadas con absorción de minerales y agua
Actividades enzimáticas relacionadas con transformación de iones de follaje	La mayoría de las cepas promueven la absorción de minerales
Promoción en la absorción de agua	
Sustitución parcial de la fertilización con N	
Incremento en el flujo de protones de plantas inoculadas	
Incremento en muchos parámetros de crecimiento	

fuese incorporado por la planta, se incrementaría el rendimiento en ésta (el cual se expresa en términos de concentración de nitrógeno total) (Mertens y Hess, 1984; Sarig *et al.*, 1984). Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz han indicado que de un 5-10% (Kucey, 1988a) y hasta 18% (Rennie, 1980; Rennie *et al.*, 1983; Rennie y Thomas, 1987) del nitrógeno total de la planta se deriva de la fijación de nitrógeno; además, las plantas inoculadas crecieron normalmente con sólo una cantidad parcial del fertilizante de nitrógeno requerido para tal crecimiento, aún en zonas templadas (en las cuales *Azospirillum* es menos efectivo) y bajo cultivo intensivo (Berge *et al.*, 1990; Kapulnik *et al.*, 1981b; Millet y Feldman, 1986; Mortley y Hill, 1990; Nur *et al.*, 1980a). Por otro lado existen estudios que han mostrado baja, y a veces insignificante, actividad de la nitrogenasa en plantas que responden positivamente a la inoculación (Fernández-Vega Figueroa, 1995; Kapulnik *et al.*, 1985a; Lethbridge y Davidson, 1983; Sarig *et al.*, 1990; Venkateswarlu y Rao, 1983). Aún más, de todo el nitrógeno fijado por *Azospirillum* menos del 5% fue incorporado a las plantas huésped (Eskew *et al.*, 1981; Okon *et al.*, 1983). Esta cantidad de nitrógeno fijado es insuficiente como para explicar incrementos totales en el contenido de nitrógeno de las plantas inoculadas. Niveles altos de fertilización nitrogenada (lo que inhibe la fijación de nitrógeno) no suprimieron la respuesta positiva de la planta a la inoculación (Avivi y Feldman, 1982; Bashan *et al.*, 1989b, 1989c; Kapulnik *et al.*, 1981b, 1982, 1983; Mertens y Hess, 1984; Millet y Feldman, 1986; Pal y Malik, 1981; Rai y Gaur, 1982; Reynders y Vlassak, 1982).

El control definitivo para distinguir la contribución vía fijación de nitrógeno de otros efectos de la inoculación bacteriana es el utilizar mutantes Nif (incapaces de fijar nitrógeno) pero al mismo tiempo isogénicas con respecto a las cepas silvestres. La inoculación de cereales con mutantes Nif causó los mismos efectos en las plantas que las cepas silvestres (Barbieri *et al.*, 1986; Morgenstern y Okon, 1987a; O'Hara *et al.*, 1981). Plántulas de tomate respondieron a la inoculación con la mutante Nif de forma similar a la respuesta obtenida con la cepa silvestre (Bashan *et al.*, 1989c). Esto indica que la respuesta de la planta fue causada por otros factores diferentes a la fijación de nitrógeno.

Considerando que las bacterias asociativas no secretan amonio y, por lo tanto, proveen a la planta huésped de cantidades mínimas de nitrógeno, se seleccionaron mutantes de *A. brasilense* capaces de

excretar amonio (producto de la fijación de nitrógeno). Para contrarrestar la desventaja ecológica que esto representa, se intentó establecer estas bacterias en el interior de la raíz a través de la producción de para-nódulos (estructuras radiculares que simulan nódulos y cuya formación es inducida agregando la auxina sintética, ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991). Se demostró colonización intracelular de mutantes de *A. brasilense* excretores de amonio (producto de la fijación de nitrógeno) en para-nódulos de maíz y de trigo (Christiansen-Weniger, 1992; Christiansen-Weniger y Vanderleyden, 1994). A través de estudios con $^{15}\text{N}_2$ en estas plantas, se demostró que estos mutantes lograron transferir mayores cantidades de nitrógeno a las plantas huésped que la cepa silvestre (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991). Estos resultados indicaron que las plantas gramíneas son potencialmente capaces de establecer una simbiosis con bacterias diazotróficas y en la cual el simbiote excretor de amonio provee a las plantas huésped de una fuente de nitrógeno. Otros trabajos en para-nódulos de raíces de plántulas de trigo (Sriskandarajah *et al.*, 1993) demostraron que la actividad nitrogenasa en para-nódulos fue mayor que en raíces inoculadas sin para-nódulos (Yu *et al.* 1993; Zeman *et al.*, 1992).

Una estrategia innovadora en el estudio de la interacción *Azospirillum*-planta es a través del cultivo de tejidos. Cultivos de callo del pasto *Eulaliopsis binata* y de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, fueron co-cultivados con *A. lipoferum* obteniéndose actividad positiva de la nitrogenasa después de doce meses de haber sido co-inoculados (Gosal *et al.*, 1990). De Freitas y Germida (1990) desarrollaron un cultivo de raíces de trigo para estudiar las interacciones bacteria-raíz y colonización radicular por bacterias asociativas incluyendo a *A. brasilense*.

Existe la posibilidad de que la fijación de nitrógeno aporte a la planta pequeñas cantidades de nitrógeno, lo que puede ser de importancia significativa en etapas críticas del desarrollo vegetal, tales como reproducción y épocas de generación de retoños. Se puede concluir que la fijación de nitrógeno es un fenómeno que se presenta en muchas asociaciones de plantas con *Azospirillum*; sin embargo, surgen las preguntas: ¿Con cuánto nitrógeno contribuyen las bacterias a la planta y bajo qué condiciones de crecimiento ésta contribución es mayor?

Efectos hormonales de *Azospirillum* sobre las plantas

Cepas de *Azospirillum* producen diversas hormonas vegetales cuando son cultivadas en medios líquidos. Una de las principales es el ácido indol-3-acético (IAA) (Barbieri *et al.*, 1986; Fallik *et al.*, 1989; Hartmann *et al.*, 1983; Iosipenko y Ignatov, 1995; Jain y Patriquin, 1985; Kolb y Martin, 1985; Ruckdäschel *et al.*, 1988; Tien *et al.*, 1979; Venkateswarlu y Rao, 1983). Se encontró que *A. irakense* liberó al medio 10 veces menos la concentración de IAA que *A. brasilense* Sp-7 (Zimmer *et al.*, 1991) y que se requiere de oxígeno para la conversión de triptofano a IAA (Bar y Okon 1995). Varias cepas de bacterias diazotróficas asociativas utilizaron un 0.28-1.0% del triptofano disponible para la producción de IAA (Kravchenko *et al.*, 1994). La liberación de IAA se incrementó con la presencia de amonía en el medio de cultivo, así como en el inicio de la fase estacionaria de las células por lo que se le considera un metabolito secundario (Omay *et al.*, 1993). Otras hormonas detectadas a niveles más bajos, pero biológicamente significativos, son el ácido indoláctico (Tien *et al.*, 1979), ácido indol-3-butírico (IBA) (Fallik *et al.*, 1989), indol-3-etanol, indol-3-metanol (Crozier *et al.*, 1988), y compuestos de indol no identificados (Hartmann *et al.*, 1983). También varias giberelinas (Bottini *et al.*, 1989; Janzen *et al.*, 1992; Piccoli y Bottini, 1994; Rademacher, 1994; Tien *et al.*, 1979), ácido absicico (ABA) (Kolb y Martin, 1985) y citoquininas (Horemans *et al.*, 1986; Strzelczyk *et al.*, 1994a; Tien *et al.*, 1979).

Yahalom *et al.* (1991) encontraron que el efecto de la hormona IAA sobre las raíces dependió de su concentración; concentraciones de 10^{-8} M estimularon la elongación radicular, mientras que concentraciones mayores a 10^{-6} M la inhibieron y redujeron la longitud de la zona de elongación. Las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno (Christiansen-Weniger, 1988; Sriskandarajah *et al.*, 1993) así como su crecimiento (Strzelczyk *et al.*, 1994a). Estudios sobre la aplicación externa de hormonas sintéticas o purificadas a partir de cultivos bacterianos a plántulas, imitaron los efectos positivos que provoca *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología radicular (Harari *et al.*, 1988; Kucey, 1988b; Tien *et al.*, 1979; Zimmer *et al.*, 1988). Así mismo, se incrementó la longitud de las raíces (Kolb y Martin, 1985; Morgenstern y Okon, 1987a; Yahalom *et al.*, 1991), el número de pelos

radiculares (Kapulnik *et al.*, 1985c; Morgenstern y Okon, 1987a) así como la ramificación de éstos (Jain y Patriquin, 1984). Se produjeron más raíces laterales (Barbieri *et al.*, 1986; Tien *et al.*, 1979) y se incrementó la tasa de división celular y diferenciación en tejidos meristemáticos (Fallik *et al.*, 1989). Una cepa de *Azospirillum* y una mutante sobreproductora de IAA en condiciones de cultivo, modificaron considerablemente la morfología radicular (Jain y Patriquin, 1985; Kolb y Martin, 1985), mientras que mutantes incapaces o disminuidos en su capacidad de producir IAA en condiciones de cultivo, no causaron efectos en la morfología radicular (Barbieri *et al.*, 1986), en el desarrollo del sistema de raíces, y no lograron promover la absorción de minerales (Barbieri *et al.*, 1991, 1995). Sin embargo, Bothe *et al.* (1992) encontraron que la hormona IAA no logró promover la formación de raíces laterales en plántulas de trigo, mientras que la inoculación con *Azospirillum* sí lo logró. Se ha observado que plantas inoculadas con *Azospirillum* mantienen en estado óptimo durante más tiempo su equilibrio hormonal que plantas no inoculadas, contribuyendo así a obtener una mayor producción. La inoculación con *Azospirillum* mejoró el equilibrio hormonal de una mutante de trigo defectuosa en la producción de hormonas (Inbal y Feldman, 1982). Se encontraron concentraciones más altas de IAA y IBA en raíces de maíz inoculadas que en plantas no inoculadas (Fallik *et al.*, 1989). La inoculación de plántulas de maíz con *A. lipoferum* alteró el equilibrio de giberilina de las plántulas (Fulchieri *et al.*, 1993).

Estos resultados aportan evidencia sobre la participación de *Azospirillum* en la regulación hormonal de la planta. Sin embargo, para poder afirmar que los efectos hormonales son el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, se deben de hacer estudios adicionales, ya que otros factores no considerados en el diseño experimental pueden estar involucrados, i.e. el nitrito, como producto del metabolismo de *Azospirillum*, o agregado directamente, provoca de igual manera un drástico incremento en la formación de raíces laterales de trigo por lo que el sistema de ensayo utilizado puede estar provocando la generación de nitrito, promoviendo así el crecimiento de las plantas (Bothe *et al.*, 1992).

Los cambios en la morfología radicular tienen un efecto directo sobre el crecimiento de la planta, dando como resultado un efecto positivo o negativo en rendi-

miento, sin embargo, estos cambios deben de demostrarse también en los diferentes estadios de la planta y no exclusivamente en la etapa de plántula.

No se ha demostrado si los efectos en la morfología radicular de la plántula pueden desaparecer o desvanecerse cuando la población de *Azospirillum* presente en la raíz disminuye drásticamente durante las etapas de maduración de la planta. Es necesario demostrar claramente cambios en el equilibrio hormonal de plantas de diferentes especies crecidas en suelo por efecto de la inoculación con *Azospirillum*.

Promoción en el desarrollo de raíces, absorción de minerales, actividad de membrana, moléculas de comunicación celular y relación planta-agua por *Azospirillum*

Además de afectar positivamente (Kapulnik *et al.*, 1981a, 1985c) o negativamente (Kucey, 1988a) muchos parámetros en raíces, la inoculación de plantas con *Azospirillum* puede afectar muchos parámetros relacionados con el follaje. Estos cambios son atribuidos directamente a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. Se ha propuesto que la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ y Fe^{+2} inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (Barton *et al.*, 1986; Jain y Patriquin, 1984; Kapulnik *et al.*, 1985b; Lin *et al.*, 1983; Morgenstern y Okon, 1987b; Murty y Ladha, 1988; Sarig *et al.*, 1988). Durante el periodo de reproducción vegetal, estos minerales pueden ser transferidos a las panículas y espigas, lo que finalmente resulta en un mayor rendimiento.

Se ha sugerido que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen del sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz (Morgenstern y Okon, 1987b; Murty y Ladha, 1988). Por otro lado se sugiere que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente (Lin *et al.*, 1983) (se desconoce el mecanismo de este proceso); esto explicaría la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente fijación de nitrógeno. La planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente, requiriendo menos fertilización con nitrógeno.

La inoculación de frijol yorimón y frijol de soya con *A. brasilense* Cd incrementó el flujo de protones de sus raíces, reduciendo el potencial de membrana por lo que se

propuso que la membrana celular funciona como un sensor sobre el efecto de *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1992). El cambio en la actividad del flujo de protones en raíces de trigo inoculadas con *Azospirillum*, y cambios en el potencial de membrana de células radiculares, así como cambios en la concentración relativa de fosfolípidos en la membrana celular del frijol yorimón, apoyan la hipótesis que propone que en raíces inoculadas la absorción de nutrimentos es más eficiente (Bashan, 1990, 1991a; Bashan y Levanony, 1991; Bashan *et al.*, 1989a 1990, 1992). Es conocido que el flujo de protones a través de las membranas radicales se encuentra directamente relacionado con el equilibrio iónico en las raíces. Recientemente se propuso que moléculas de comunicación celular no identificadas de bajo peso molecular pueden ser responsables en alterar actividad y funciones de la membrana relacionadas con la absorción de iones (Bashan, 1991a; Bashan *et al.*, 1992). Ya que las membranas son extremadamente sensibles a cualquier cambio, pueden servir como indicadores de la actividad de *Azospirillum* a nivel celular. Se encontró que la adición de aglutinina de germen de trigo a *A. brasilense* Sp-245, además de provocar cambios en el metabolismo celular de la cepa (ver sección sobre colonización radicular de *Azospirillum*), provocó cambios en la proporción relativa de los fosfolípidos ácidos de la membrana. Es probable que los fosfolípidos ácidos estén participando en la comunicación celular a través de la membrana. Se sugiere que la aglutinina de germen de trigo puede tener la función de molécula de comunicación celular en la asociación *Azospirillum*-planta (Antonyuk *et al.*, 1995).

Además de promover la absorción de minerales, la inoculación con *Azospirillum* mejora factores relacionados con el agua y la conductividad hídrica en plantas de sorgo sometidas a un periodo de estrés acuoso, dando como resultado mayor concentración de agua en el follaje, mayor potencial hídrico en hojas, y menor temperatura de follaje que en plantas no inoculadas. Así mismo, se ha observado que la extracción total de humedad del suelo por parte de plantas inoculadas con *Azospirillum* es mayor que en plantas no inoculadas y el agua puede ser extraída de capas más profundas del suelo. Por esta razón, el incremento en rendimiento de sorgo inoculado se atribuye principalmente a una mejor captación de la humedad del subsuelo (Sarig *et al.*, 1988, 1992). Es muy probable que la promoción en la absorción de agua y minerales jueguen un papel vital en la asociación *Azospirillum*-planta. Sin embargo, la información presentada hasta ahora, no ha demostrado si estos resultados son

la causa o efecto de otros mecanismos tales como cambios en el equilibrio hormonal de las plantas. Además, la amplia gama de actividades enzimáticas relacionada con estos fenómenos ha sido estudiada de manera superficial y no se ha llevado a cabo una evaluación con mutantes deficientes en inducir la absorción de agua y minerales. Finalmente, debe aclararse que se han evaluado muy pocas cepas de *Azospirillum* y existen dudas sobre la capacidad de otras cepas y/o especies de *Azospirillum* de producir estos efectos. Existe evidencia sobre cepas de *A. brasilense* que no promovieron la absorción iónica pero sí promovieron el crecimiento de las plantas (Bashan *et al.*, 1990).

ESPECIFICIDAD Y VARIABILIDAD EN *AZOSPIRILLUM*

Una de las preguntas más controvertidas relacionadas con las asociaciones *Azospirillum*-planta es si existe especificidad en dicha interacción como para afectar el crecimiento vegetal. Se ha sugerido que existen diferencias específicas entre las respuestas de plantas C₃ y C₄; *A. lipoferum* fue la especie predominante en colonizar plantas C₄ y *A. brasilense* lo fue en plantas C₃ de zonas tropicales (Baldani y Döbereiner, 1980; Baldani *et al.*, 1986). Así mismo, se encontró una preferencia similar a la anterior con plantas hospederas de zonas templadas (Haahtela *et al.*, 1981; Lamm y Neyra, 1981). Cuando la especie bacteriana es inoculada a su respectiva planta hospedera, la frecuencia de éxito es mayor al hacer la combinación planta-bacteria apropiada (Baldani *et al.*, 1983, 1987; Pereira *et al.*, 1988; Rangel-Lucio, 1991; Reynders y Vlassak, 1982). Diferentes efectos morfogénicos en pelos radiculares de trigo han sido atribuidos a ciertas cepas de *Azospirillum* en particular (Jain y Patriquin, 1984; Patriquin *et al.*, 1983). Algunos estudios demuestran que algunas plantas (de muchas variedades probadas) respondieron a la inoculación con una cepa de *Azospirillum* en particular (Bouton *et al.*, 1979; Garcia de Salomone y Döbereiner, 1996; Millet *et al.*, 1986; Wani *et al.*, 1985). Hay indicaciones de que la especificidad no es a nivel especie sino a nivel cepa. Caballero-Mellado *et al.* (1992) encontraron que los incrementos en rendimiento de trigo dependieron de la cepa de *Azospirillum brasilense* utilizada. Por otro lado, otros estudios muestran falta de especificidad en la interacción *Azospirillum*-planta. La cepa Cd/Sp-7 de *A. brasilense* benefició un gran número de cereales de verano e invierno tales como trigo, maíz, *Setaria*, verduras

como tomate, berenjenas, pimientos y plantas de cultivo industriales (Bashan *et al.*, 1989b; Kapulnik *et al.*, 1981c, 1983; Smith *et al.*, 1984b; Yahalom *et al.*, 1984). La inoculación de semillas del Cardon gigante (*Pachycereus pringlei*) con cepas de *Azospirillum* redujo el tiempo de germinación de las semillas y promovió el crecimiento de las plántulas (Puente y Bashan, 1993). Además, la inoculación de frijol yorimón (cowpea) y soya con la cepa Cd de *A. brasilense* produjo cambios en el metabolismo de estas plantas (Bashan *et al.*, 1990; 1992). Las cepas Cd y Sp-245 de *A. brasilense* colonizaron exitosamente 64 especies de plantas de las cuales 48 eran hierbas (perennes y anuales) y 16 eran plantas de cultivo (Bashan y Holguin, 1995).

Considerando que *Azospirillum* afecta positivamente un gran diversidad de plantas, se propone que no existe especificidad en la asociación *Azospirillum*-planta. Sin embargo, esto no significa que no pueda existir mayor afinidad entre una especie bacteriana y su respectiva planta hospedante que con otra planta a la que nunca ha estado asociada.

Para confirmar esta propuesta es necesario: i) Realizar pruebas comparativas con cepas obtenidas en lugares diferentes e inoculadas a un solo tipo de planta hospedera, así como pruebas de inoculación con una sola cepa realizadas en plantas hospedantes diferentes e, ii) implementar pruebas rápidas para evaluar la asociación planta-bacteria en todas las cepas y así poder predecir combinaciones planta-bacteria exitosas antes de realizar pruebas de campo (Sukiman y New, 1990).

INTERACCION DE *AZOSPIRILLUM* CON MICROFLORA DE LA RIZOSFERA

Después de su incorporación al suelo, las células de *Azospirillum* se deben adaptar rápidamente a las condiciones siempre cambiantes de la rizosfera, mismas que incluyen modificaciones frecuentes en la disponibilidad de nutrimentos, así como la interacción con bacterias nativas las cuales compiten también por los nutrimentos disponibles. Las interacciones pueden ser antagonistas, sinergistas o del tipo predador-presa, en las cuales *Azospirillum* puede ser presa disponible para la micro y macro-fauna necesitada de nutrimentos.

La interacción microbiana más estudiada de *Azospirillum* involucra a *Rhizobium*. Por un lado, pruebas de campo e invernadero han demostrado que una inoculación simultánea de *Azospirillum* y *Rhizobium* o el inocular *Azospirillum* a leguminosas colonizadas de

manera natural por los rizobios, da como resultado incremento en la fijación de nitrógeno, mayor número de nódulos, incremento en el contenido de aminoácidos de raíces y brotes, y eventualmente un incremento en rendimiento (Andreeva *et al.*, 1991, 1993; Del Gallo y Fabbri, 1991; Elmokadem y Badawi, 1992; Fabbri y Del Gallo, 1995; Hassouna *et al.*, 1994; Iruthayathas *et al.*, 1983; Itzigsohn *et al.*, 1993; Rai, 1983; Sarig *et al.*, 1986; Yadav *et al.*, 1992; Yahalom *et al.*, 1990). Se encontró que el flavonoide luteolina (inductor del gen involucrado en nodulación) incrementó al igual que *Azospirillum* la formación de nódulos en alfalfa (Itzigsohn *et al.*, 1993).

La inoculación de frijol con floculados (agregados masivos) conteniendo una mezcla de *Azospirillum* y *Rhizobium* promovió significativamente la nodulación y el crecimiento de las plantas (Neyra *et al.*, 1995), sin embargo, la inoculación mixta de *Rhizobium* y *Azospirillum* en cacahuate no produjo ningún efecto sinérgico en la simbiosis *Rhizobium*-planta (Raverkar y Konde, 1990).

Estudios de inoculación mixta en laboratorio han generado datos contradictorios. La aplicación de *A. brasilense* previa a *Rhizobium* incrementó la formación de nódulos en zonas libres de pelos radiculares, aun cuando *Rhizobium* fue aplicado en una concentración no inductora a la formación de nódulos. Este incremento en la susceptibilidad de las leguminosas a la infección por *Rhizobium* fue atribuido al efecto estimulador de las hormonas secretadas por *Azospirillum*. Estas hormonas inducen la formación de un mayor número de células epidérmicas, las cuales se diferencian en pelos radiculares. Esto favorece la infección por *Rhizobium* debido a que este organismo infecta principalmente a través de pelos radiculares (Schmidt *et al.*, 1988; Yahalom *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando las células de *Azospirillum* llegan a sobrepasar en número a las células de *Rhizobium* en la mezcla, la inoculación mixta provoca efectos negativos, impidiendo la nodulación de trébol (Plazinski y Rolfe, 1985b, 1985c, 1985d). Aparentemente, la colonización de *Azospirillum* en pelos radiculares bloquea los sitios de infección de *Rhizobium*.

Al agregar *Azospirillum* en concentraciones mayores a 10^8 cfu/ml se inhibió el proceso de elongación de las raíces, aunque este efecto fue menor al combinarse *Azospirillum* con *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1991). Se ha demostrado la participación del etileno en procesos de senescencia de las plantas. La inoculación de *Azospirillum* a una concentración de 10^9 cfu/ml provocó un incremento

en la producción endógena de etileno por las raíces. A una concentración menor del inóculo, no se incrementó la producción de etileno por las raíces. La producción de etileno por *Azospirillum* dependió de la presencia de metionina cuando la fuente de carbono son malato y succinato (Strzelczyk *et al.*, 1994a). La inoculación con *Azospirillum* incrementó la actividad específica de las enzimas glucosa-6-fosfato heshidrogenasa y otras enzimas al compararse con inoculaciones únicas con *Rhizobium* (Yahalom *et al.*, 1990).

Estos reportes sobre la interacción *Azospirillum*-*Rhizobium* indican que, antes de hacer inferencias, se debe definir cómo interactúan exactamente ambos géneros.

En contraste, la inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos micorrízicos vesículo-arbusculares (V-A) origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en crecimiento y en el contenido de fósforo de las plantas. Esta inoculación doble podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo (Al-Nahidh y Gomah, 1991; Barea *et al.*, 1983; Pacovsky, 1988; Pacovsky *et al.*, 1985a; Singh, 1992b; Singh *et al.*, 1990; Subba Rao *et al.*, 1985a; 1985b) y promover la infección de hongos micorrízicos en plantas (Barea *et al.*, 1983). Los extractos libres de células de *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia* sp., *Azospirillum brasilense* Cd y *A. lipoferum* promovieron la germinación de esporas del hongo micorrízico *G. fasciculatum* (Tilak y Dwivedi, 1990).

Estudios con plantas de sorgo demostraron que la inoculación combinada de *A. brasilense* y las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas striata* o *Bacillus polymyxa*, incrementó significativamente el rendimiento del grano y la absorción de nitrógeno y fósforo al compararse con los resultados de la inoculación con un solo grupo de organismos (Alagawadi y Gaur, 1992). Los pocos datos obtenidos hasta ahora son alentadores y estimulan la investigación hacia este tipo de interacción, además de que la descripción de las propiedades elementales de esta interesante interacción bacterias-hongos-plantas es muy reciente.

La inoculación de plantas de cebada en maceta con las combinaciones bacterianas *A. lipoferum* 137 + *Agrobacterium radiobacter* 10 (solubilizadora de fosfato) y *A. lipoferum* 137 + *Arthrobacter mysorens* 7, incrementaron el rendimiento de las plantas al compararse con inoculaciones únicas. Las inoculaciones dobles tuvieron un mejor efecto sobre el desarrollo de las plantas cuando la concentración de nitrógeno combinado en el

suelo era baja. Se concluye que la inoculación con mezclas bacterianas permite que las plantas tengan un alimentación más balanceada, mejorándose la absorción del nitrógeno y fósforo presentes en el suelo. Experimentos de campo con tres variedades de cebada confirmaron el hecho de que la inoculación con cultivos mixtos le ayuda a la planta a alcanzar un equilibrio nutricional, e incrementa significativamente su rendimiento al compararse con inoculaciones únicas (Belimov *et al.*, 1995a).

La inoculación mixta de *A. brasilense* y *A. lipoferum* con el hongo agente de control biológico *Phialophora radicola* incrementó significativamente el peso seco de brotes de plantas de trigo al compararse con inoculaciones únicas. Se encontró que el filtrado del hongo estimuló el crecimiento de ambas cepas de *Azospirillum* (Flouri *et al.*, 1995).

Se inhibió la colonización de células de *A. brasilense* en raíces del pasto Kallar (*Leptochloa fusca*) al inocular las semillas del pasto simultáneamente con *Herbaspirillum seropedicae* (Stein *et al.*, 1995).

La inoculación mixta de *Azospirillum lipoferum* y el hongo micorrízico *Glomus intraradices* en plantas de sorgo, incrementó todos los parámetros de crecimiento de las plantas, los niveles de fosfatasas en raíces así como la absorción de minerales, al compararse con inoculaciones únicas (Veerawamy *et al.*, 1992). Al inocular trigo con *A. brasilense* y *Glomus* sp. se incrementó el peso fresco y seco de brotes y raíces (Gori y Favilli, 1995). La inoculación doble de *Glomus macrocarpum* y *A. brasilense* en la planta *Corchorus ollitorius* promovió su crecimiento (Bali y Mukerji, 1991).

Azospirillum establece asociaciones con una gran variedad de bacterias que degradan polisacáridos en las cuales los productos de degradación o fermentación generados por ellas son utilizados por *Azospirillum* como fuentes de energía o carbono. De la inoculación con *Azospirillum* y *Cellulomonas* u hongos celulolíticos surge una interacción sinérgica, promoviéndose la descomposición de paja por las bacterias o los hongos. Los cultivos bacterianos mixtos, líquidos o en suelo, degradan más eficientemente la celulosa que los microorganismos celulolíticos por sí mismos. La interacción microbiana también promueve la fijación de nitrógeno de *Azospirillum*. Se ha encontrado que las células de *Azospirillum* y *Cellulomonas* spp. se encontraban en relación estrecha y cercana, facilitándose de esta manera

una asociación mutualista (Halsall y Gibson, 1985, 1986, 1991; Halsall y Goodchild, 1986; Halsall *et al.*, 1985; Markus y Krämer, 1988). Este sinérgico podría explicar indirectamente el rendimiento más alto que se ha obtenido con *Azospirillum* ocurrido en suelo mezclado con paja (Hegazi, 1988; Hegazi *et al.*, 1983). Al crecer a *A. brasilense* en cultivo mixto con *Enterobacter cloacae*, utilizando glucosa como fuente de carbono, *E. cloacae* degradó la glucosa produciendo ácido acético y succínico, los cuales fueron utilizados por *A. brasilense* para fijar nitrógeno (Kaiser, 1995). Se ha encontrado que la degradación de pectina por *Bacillus* (Khammas y Kaiser, 1992) se incrementó en presencia de *Azospirillum*. Se obtuvo un incremento en la actividad de la nitrogenasa de *A. brasilense* al crecer en cultivo mixto con *Arthrobacter giacomelloi*. Esta interacción parece estar regulada por un intercambio de metabolitos (Lippi *et al.*, 1992). Al crecer a *A. brasilense* Cd en cultivo mixto con *Staphylococcus* sp., bacteria aislada de la rizosfera del mangle *Avicennia germinans*, se incrementó la fijación de nitrógeno de la primera. El efecto fue mayor al agregar el dializado diluido de *Staphylococcus* sp. al cultivo de *A. brasilense* Cd y se debió parcialmente a la liberación de ácido aspártico por *Staphylococcus* sp. (Holguin y Bashan, 1996). De manera similar a la interacción entre *Azospirillum* y hongos micorrízicos V-A, es necesario primero definir estas interacciones antes de evaluar su potencial. Estos resultados sugieren que *Azospirillum* puede establecer interacciones positivas con otras bacterias de la rizosfera sin importar si se trata de bacterias de otros ambientes completamente ajenos (Holguin y Bashan, 1993).

Las interacciones mencionadas anteriormente representan sólo una fracción pequeña de las relaciones que *Azospirillum* sostiene con otros microorganismos de la rizosfera. Su interacción con especies predominantes de *Pseudomonas* y con poblaciones de *Bacillus* ha sido escasamente estudiada, y la aplicación de *Pseudomonas* sp., la cual sobrepasó en número a *Azospirillum*, inhibió el efecto benéfico de *Azospirillum* sobre las plantas (Fallik *et al.*, 1988). Muchas especies de *Azospirillum* producen bacteriocinas, las cuales, sorprendentemente, inhibieron a otras especies del mismo género (Oliveira y Drozdowicz, 1981, 1987; Skorupska *et al.*, 1985; Tapia-Hernandez *et al.*, 1990). Estas bacteriocinas no identificadas desaparecieron después de haber sido aplicadas en varios tipos de suelos, pero persistieron en suelo con bajo contenido de

materia orgánica y minerales de arcilla (Oliveira y Drozdowicz, 1988). Se desconoce el significado ecológico de las bacteriocinas producidas por *Azospirillum*.

Se ha demostrado que algunos microorganismos del suelo, tales como streptomicetos y hongos, ejercen efectos antagónicos sobre *Azospirillum*, sin embargo, no se logró establecer si esto se debe a la producción de antibióticos (Drozdowicz y Ferreira Santos, 1987; Kulinska y Drozdowicz, 1983; Kulinska y Kroczyńska, 1990; Zuberer y Roth, 1982). Muchas cepas de *Azospirillum* son altamente resistentes a una amplia gama de antibióticos, tales como streptomina, rifamicina y penicilina (Baldani et al., 1986; Bashan y Levanony, 1985; Döbereiner y Baldani, 1979; Horemans et al., 1987), por lo que el aislamiento de cepas de *Azospirillum* resistentes a antibióticos es una tarea simple. Aprovechando la resistencia natural de *Azospirillum* hacia los antibióticos, se ha mejorado la colonización radicular de *Azospirillum* con un subsecuente incremento en el rendimiento de plantas de trigo cultivadas en macetas. Estos resultados sugieren el utilizar compuestos a los cuales *Azospirillum* es resistente, pero que inhiben temporalmente la microflora natural competidora. Aunque esta inhibición dura solamente algunas semanas, esta resistencia de *Azospirillum* hacia una amplia gama de antibióticos le confirió una ventaja significativa sobre otros organismos en la colonización radicular (Bashan, 1986a). Obviamente esta práctica no puede ser utilizada directamente en el campo, ya que tendría que tratarse todo el suelo ocupado por el sistema de raíces, práctica que originaría altos costos así como contaminación del suelo. Sin embargo, se debe evaluar este enfoque utilizando agroquímicos baratos que no representen un peligro para la salud de la población y no contaminen el medio ambiente.

El tamaño poblacional de *Azospirillum* ha sido estimado en 1-10% de la población total de la rizosfera (Okon, 1985). Es probable que en algunos casos se obtengan estos números, sin embargo, generalmente se obtienen cifras más bajas. Conteos de rutina en la rizosfera indican que este porcentaje es una sobreestimación. En plantas creciendo en suelo, las poblaciones de *Azospirillum* son relativamente pequeñas; el número poblacional más alto fue registrado en cereales de verano en Brasil (10^6 - 10^8 ufc/g) (Baldani et al., 1983). Por lo general, la población de *Azospirillum* es mucho más pequeña, alcanzando un tamaño poblacional promedio de 10^3 - 10^6 ufc/g en trigo (Balandreau, 1986; Bashan y Wolowelsky, 1987; Bashan et al., 1987, 1991b;

Levanony y Bashan, 1989a, 1990, 1991a; Levanony et al., 1987; Negi et al., 1987). En varias ocasiones se han reportado poblaciones de la rizosfera aún más pequeñas (Albrecht et al., 1983; Harris et al., 1989; Smith et al., 1984b). De esta manera, una estimación más adecuada del tamaño poblacional de *Azospirillum* estaría dentro de los valores 0.001-1% de la población total de la rizosfera (O'Hara et al., 1981). Las técnicas de inmunoabsorbencia (ELISA y ABELISA) se han utilizado con éxito para la identificación y conteo de *Azospirillum* en suelo o raíces (Levanony y Bashan, 1990, 1991a; Levanony et al., 1987). Estas técnicas presentan la inconveniencia de no detectar niveles poblacionales bajos (menor a 10^3 bacterias por mililitro).

Recientemente se ha incrementado el número de trabajos relacionados con el estudio de las interacciones entre *Azospirillum* y otros microorganismos. Sin embargo, la información se encuentra muy fragmentada, dispersa entre datos no relacionados con el tema y es de naturaleza descriptiva. Todos estos factores hacen imposible una predicción confiable de las interacciones más importantes. Considerando que *Azospirillum* comprende sólo una pequeña fracción de la población de la rizosfera, es de suponer que muchas otras especies bacterianas afectarán positiva o negativamente a *Azospirillum* en la rizosfera y su participación deberá de tomarse en cuenta al incorporar *Azospirillum* al suelo. Janzen y McGill (1995) demostraron que en microambientes fisicoquímicamente definidos, la proliferación de *A. brasilense* Cd dependió de las interacciones entre las poblaciones a nivel de la comunidad.

AZOSPIRILLUM COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Aun cuando *Azospirillum* no logró reducir el índice de enfermedad provocado por algunos hongos patógenos (Hadas y Okon, 1987), existen algunos trabajos que nos hacen pensar en el potencial de *Azospirillum* como agente de control biológico. Una cepa de *A. lipoferum* produjo sideróforos el cual exhibe actividad antimicrobiana en algunas bacterias y hongos (Shah et al., 1992). La inoculación de algunas dicotiledóneas con *A. brasilense* inhibió el desarrollo de cáncer provocado por *Agrobacterium tumefaciens* (Bakanchikova et al., 1993). El nivel poblacional de *Staphylococcus* sp., decayó drásticamente al crecer en cultivo mixto con *A. brasilense* Cd (Holguin y Bashan, 1996).

AZOSPIRILLUM COMO COMPETIDOR EN LA RIZOSFERA

La gran cantidad de estudios relacionados con las propiedades fisiológicas y bioquímicas de *Azospirillum* revelaron que este género no presenta características especiales que lo distinguan de otros géneros bacterianos presentes en la rizosfera (Hartmann y Zimmer, 1994; Pedrosa, 1988). Sin embargo, algunas especies en particular y aún cepas individuales de *Azospirillum* poseen características de otras especies bacterianas. Esto facultó a dichos organismos a competir eficazmente en la rizosfera de diferentes plantas, a partir de niveles de inóculo extremadamente bajos (10^6 ufc/m²), pese a la abrumadora microflora nativa con la capacidad de colonizar raíces vegetales en condiciones de campo (Bashan, 1986c).

Por definición, todo *Azospirillum* nativo es fijador de nitrógeno y capaz de satisfacer sus necesidades de nitrógeno (Tarrand *et al.*, 1978). Dado que la actividad de la nitrogenasa es sensible a la presencia de oxígeno, *Azospirillum* debe fijar nitrógeno bajo condiciones microaerofílicas (Hartmann y Hurek, 1988) y más aún, algunas cepas presentan una marcada respuesta aerotáctica, que puede llegar a enmascarar otras propiedades relacionadas con substratos químicos (Barak *et al.*, 1982a, 1982b; Das y Mishra, 1984; Del Gallo *et al.*, 1988; Grishanin *et al.*, 1991; Hurek *et al.*, 1987; Okon *et al.*, 1980; Reiner y Okon, 1986). También presentan taxis hacia gradientes "redox" (Grishanin *et al.*, 1991; Zhulin y Armitage, 1992). *Azospirillum* es un microorganismo versátil en su nutrición, dado que las muchas vías metabólicas alternas le permiten consumir una amplia variedad de ácidos orgánicos, azúcares, y aminoácidos de origen vegetal o microbiano disponibles en la rizosfera (Okon, 1985). *Azospirillum* produce vitaminas del grupo B (tiamina, biotina, riboflavina, ácido nicotínico y pantoténico) al crecerse en cultivo líquido y su crecimiento se ve afectado por la presencia de éstas (Dahm *et al.*, 1993; Rodelas *et al.*, 1993). La aplicación artificial de vitaminas al medio también afecta el crecimiento de *Azospirillum* (Rozycki *et al.*, 1992). Casi todas las cepas son altamente móviles, tanto *in vitro* como en el suelo, y poseen una significativa movilidad quimiotáctica hacia una gran variedad de compuestos (Barak *et al.*, 1983; Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987; Hall y Krieg, 1984; Heinrich y Hess, 1985; Lopez de Victoria y Lovell, 1993; Maheswari y Purushothaman, 1990; Mandimba *et al.*, 1986; Okon *et al.*, 1980;

Reinhold *et al.*, 1985). La respuesta quimiotáctica de *Azospirillum* no ha demostrado especificidad en cuanto al tipo de planta (Fedi *et al.*, 1992).

Se evaluó la capacidad de la cepa silvestre Cd de *A. brasilense* y de una mutante deficiente en movimiento, de trasladarse de raíces de una planta hacia otra en arena y charolas con suelo. La cepa no-móvil no se trasladó a raíces no inoculadas permaneciendo en el sitio de inoculación, mientras que la cepa móvil se trasladó de una planta inoculada hacia otra no inoculada. La presencia de sustancias atrayentes tanto como de repelentes determinaron la movilidad. Se propone que el traslado de *A. brasilense* de la raíz de una planta hacia otra es un paso preliminar al proceso de reconocimiento de la bacteria hacia la planta. El traslado de *Azospirillum* hacia las raíces de otras plantas es un proceso activo que no depende de la influencia de algún atrayente o repelente en particular (Bashan y Holguin, 1994; Zhulin y Armitage, 1993) y es influenciado posiblemente por el efecto global de los atrayentes y repelentes exudados por las raíces (Bashan y Holguin, 1994). En cuanto al traslado de *A. brasilense* entre hierbas, la cepa móvil se trasladó de una planta hacia otra independientemente de la especie o familia botánica de la planta ó si se trataba de hierbas perennes o anuales. En suelos saturados de agua sin plantas, *Azospirillum* permaneció en el sitio de inoculación sin moverse (Bashan y Holguin, 1995). *Azospirillum* presentó quimiotaxis a concentraciones pico y nanomolares de ácidos aromáticos, por lo que se considera que *Azospirillum* presenta mecanismos sensoriales más sensibles para la detección de sustancias que otras bacterias del suelo pudiéndolas utilizar como fuentes de energía y carbono. Esta capacidad seguramente contribuye a su sobrevivencia y capacidad de colonización (Lopez de Victoria y Lovell, 1993; Lopez de Victoria *et al.*, 1994). La quimiotaxis dependió de la fase de crecimiento de las células. *A. brasilense* mostró quimiotaxis en respuesta a gradientes temporales de quimioefectores (Zhulin y Armitage, 1993). Cambios en el comportamiento quimiotáctico de *A. brasilense* Sp-7 coincidió con cambios en el potencial de membrana, el principal componente de fuerza motriz para el flagelo (Zhulin *et al.*, 1995), por lo que se propone que la quimiotaxis depende del mecanismo de bombeo de protones que acciona al flagelo.

A. brasilense migra hacia las raíces, a través de secciones de suelo carentes de plantas (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987) y tienen capacidad de movilidad inter-radical (Bashan y Holguin, 1994; Broek *et*

al., 1993). Mutantes no móviles presentan menos habilidad de colonización que las cepas nativas (Bashan y Holguin, 1994; Kimmel *et al.*, 1990). Las bacterias pueden ser transferidas pasivamente a grandes profundidades a través de la punta de las raíces que se encuentren en proceso de crecimiento (Bashan y Levanony, 1989a) o por medio de su propia movilidad (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987). Sus flagelos polares rotan en sentido de las manecillas del reloj así como en dirección contraria (Zhulin y Armitage, 1993).

Bajo condiciones de estrés tales como radiación ultravioleta, desecación o tensión osmótica y escasez de nutrimentos, *Azospirillum* es capaz de formar quistes, los cuales incrementan significativamente el índice de sobrevivencia de las células (Bashan *et al.*, 1991a; Bleakley *et al.*, 1988; Lamm y Neyra, 1981; Madi *et al.*, 1988; Murray y Moyles, 1987; Oliveira y Desouza, 1991; Sadasivan y Neyra, 1985, 1987; Zaady *et al.*, 1993). *Azospirillum* acumula grandes cantidades de poli-Beta-hidroxibutirato (PHB) (hasta un 70% de su peso seco) el cual puede ser almacenado para una bioconversión posterior o utilizado como fuente de energía cuando el organismo se enfrenta a escasez de nutrimentos (Berg *et al.*, 1979; Tal y Okon, 1985). Se demostró que estas formas enquistadas ricas en PHB sobreviven mejor que células sin PHB, siendo los quistes formas celulares fisiológicamente activas (Assmus *et al.*, 1995) capaces de fijar nitrógeno en ausencia de una fuente de carbón exógena (Okon y Itzigsohn, 1992).

A. amazonense y *A. halopraeferans* son resistentes a los ácidos, a sales y a altas temperaturas (Hartmann, 1988; Reinhold *et al.*, 1988a), lo que favorece significativamente sus índices de sobrevivencia en la rizosfera. La tolerancia de bacterias del género *Azospirillum* hacia altas concentraciones de NaCl, sacarosa o polietilenglicol, se incrementa en el orden de *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. halopraeferans* (Hartmann *et al.*, 1991; Rai, 1991). Los mecanismos de regulación osmótica de *Azospirillum* involucra la acumulación de prolina, glutamato y glicina betaina (Madkour *et al.*, 1990; Riou y Rudulier, 1990; Riou *et al.*, 1991) y de beta (1-3), beta (1-6) glucano (Altabe *et al.*, 1994).

Los estudios de sobrevivencia de *Azospirillum* en su nicho microecológico natural demuestran que este microorganismo sobrevive por periodos prolongados de tiempo y sólo el tamaño de la población llega a variar. Las cepas de *Azospirillum* pueden sobrevivir en raíces durante la temporada de invierno bajo condiciones templadas, pero el

nivel de población se mantiene relativamente bajo (De Coninck *et al.*, 1988; Harris *et al.*, 1989; Horemans *et al.*, 1988), a excepción del trabajo realizado por Germida (1986) en el cual se observó un buen nivel de sobrevivencia en suelos de climas templados. Asimismo, se ha demostrado que *Azospirillum* sobrevive en raíces durante toda la temporada de crecimiento de cereales (Bashan y Levanony, 1987; Bashan *et al.*, 1987; Jagnow, 1982) y arroz (Nayak *et al.*, 1986). Sin embargo, se ha demostrado que *Azospirillum* es incapaz de recuperar su nivel poblacional original después del invierno (Fages, 1992; Harris *et al.*, 1989; Horemans *et al.*, 1988). En tanto que en zonas templadas se encontró que ocurre una transferencia de bacterias de la rizosfera a plantas ubicadas lejos del área original de inoculación, por medio de corrientes de aire (Bashan, 1991b). La importancia ecológica de esta habilidad de sobrevivencia a largo plazo tiene todavía que ser determinada. Dada la capacidad de *Azospirillum* para sobrevivir por periodos prolongados, su habilidad de reinoculación y su fase aérea, la explotación comercial de *Azospirillum* puede llegar a obstaculizarse, ya que una sola inoculación del producto bastaría para producir efectos benéficos por varios años.

La mayoría de las cepas de *Azospirillum* se encuentran en la rizosfera; sin embargo, algunas cepas permanecen en el suelo. *Azospirillum* fue originalmente aislada de suelos arenosos (Beijerinck, 1925); aunque se ha encontrado que bacterias similares al género se encuentran sólo en aluviales de Somalia (Favilli *et al.*, 1988). En un gran número de campos belgas persisten niveles bajos de *Azospirillum* sin importar la textura del suelo (De Coninck *et al.*, 1988; Horemans *et al.*, 1988), mientras que es común encontrar altos niveles de cepas nativas en suelos tropicales. La explicación a este fenómeno se desconoce ya que estos suelos no han sido caracterizados (Döbereiner, 1988; Döbereiner *et al.*, 1976; Patriquin *et al.*, 1983). Una evaluación de la sobrevivencia de *A. brasilense* Cd y Sp-245 en 23 tipos de suelos diferentes obtenidos de distintas regiones geográficas, así como un análisis de la tasa de sobrevivencia para 15 parámetros edáficos diferentes, demostraron que en presencia de plantas la tasa de sobrevivencia fue buena y no dependió del tipo u origen del suelo (Bashan *et al.*, 1995c,d). En ausencia de plantas se encontró que por periodos prolongados (35-45 días), *Azospirillum* sobrevive pobremente en la mayoría de los suelos, tanto en el campo como en el invernadero y casi desaparece después de un periodo menor de 15 días. Aún así, una fracción de la población puede sobrevivir en el

suelo por periodos prolongados (Albrecht *et al.*, 1983; Bashan *et al.*, 1995a,b,c,d; Bashan y Levanony, 1987, 1988c; Horemans *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1984b), siempre y cuando las condiciones de estrés (falta de humedad y materia orgánica, valores bajos de pH, altas concentraciones de carbonato de calcio y alto porcentaje de arena) no prevalezcan (Bashan *et al.*, 1995d; Germida, 1986; Hegazi, 1988; Jagnow, 1982; Sadasivan *et al.*, 1986a; Schank *et al.*, 1985). Se encontró correlación positiva entre la viabilidad bacteriana y porcentaje de arcilla, nitrógeno, materia orgánica y capacidad de retención de agua. Concentraciones altas de CaCO₃ y presencia de arena tuvieron efectos adversos en la sobrevivencia de las cepas (Bashan *et al.*, 1995a,b).

En contraste con sus características superiores, ya mencionadas, *Azospirillum* puede ser parasitado por *Bdellovibrio* sp. en suelo (Germida, 1987) y puede servir de presa a protozoarios nativos del suelo. Como conclusión, *Azospirillum* tiene el potencial para mantener un buen nivel de sobrevivencia en la rizosfera. Es probable que su versatilidad metabólica le permita competir eficazmente con otra microflora de la rizosfera, sin embargo, se requieren de más estudios sobre rizocompetencia para verificar lo anterior. Las varias fases de *Azospirillum* en la rizosfera se muestran en la Figura 1.

INTERACCION DE *AZOSPIRILLUM* CON PARTICULAS DEL SUELO

La inoculación de plantas con *Azospirillum* en algunas ocasiones se ha realizado aplicando las bacterias directamente al suelo, junto a las plántulas germinadas (Bashan, 1986b; Okon y Hadar, 1987). Durante este proceso, la bacteria es expuesta a fuerzas físicas y químicas naturales e interacciones que ocurren entre las bacterias y partículas del suelo. Para superar estas barreras y colonizar las raíces, *Azospirillum* tiene que generar la fuerza física suficiente como para poder desplazarse en el subsuelo (Bashan, 1986d; Bashan y Levanony, 1987). Pocos trabajos han abordado el estudio de la interacción de *Azospirillum* con partículas del suelo. Las células de *Azospirillum* usualmente se encuentran adheridas de manera irreversible a la fracción superior del perfil de suelo, principalmente mediante interacciones electrostáticas con arcillas y materia orgánica. *A. brasilense* Cd se adsorbió fuertemente a suelos de textura ligera así como a los de textura pesada, sin embargo, se

adsorbió muy ligeramente a partículas de cuarzo (Levanony y Bashan, 1991b).

Las condiciones fisicoquímicas del suelo, tales como pH, el grado de humedad y la disponibilidad de sustancias químicas que atraen a las bacterias, afectan en diferentes grados de magnitud la adhesión de *Azospirillum* al suelo (Bashan y Levanony, 1988c; Horemans *et al.*, 1988). La adhesión de *Azospirillum* a arena pura, carente de arcillas y materia orgánica, es débil, y es llevada a cabo por una red de puentes proteicos que entrelazan la célula bacteriana y las partículas de cuarzo. Se concluye que las fibrillas bacterianas son esenciales para el anclaje de *A. brasilense* Cd. La formación de puentes proteicos es controlada principalmente por la disponibilidad de nutrimentos los cuales serán utilizados para su síntesis (Bashan y Levanony, 1988d, 1991; Bashan *et al.*, 1991a).

La concentración de nitrato disponible en el suelo para las plantas se puede reducir debido a la desnitrificación, a la que se le puede atribuir hasta un 20-30% de pérdidas de nitrógeno aplicado como fertilizante (Firestone, 1982). La participación de *Azospirillum* en este proceso de pérdidas de nitrógeno provocadas por la desnitrificación debe ser investigada.

ASPECTOS AGROTECNICOS: INOCULANTES Y SU INTERACCION CON PESTICIDAS

Una poderosa razón para entender la interacción *Azospirillum*-planta, es la aplicación comercial de la bacteria en sistemas agrícolas de países modernos y de países en vía de desarrollo. Sorprendentemente, muy poco se ha publicado acerca de los aspectos agrotécnicos del sistema, i.e. efectos potenciales de una inoculación con *Azospirillum*, conjuntamente con diferentes compuestos químicos aplicados en sembradíos de interés comercial. Este tipo de información, la cual sería llevada a cabo por compañías de investigación y desarrollo, no es accesible, ya que este tipo de compañías se niegan a publicar sus resultados (Fages, 1992).

Aún después de haber establecido la mejor combinación planta-*Azospirillum*, para la producción comercial de cultivos todavía persiste el problema de lograr una aplicación exitosa de las bacterias. Las bacterias tienen que llegar a la raíz a pesar de que el sistema de raíces se encuentre muy extendido; la inoculación bacteriana debe realizarse en el momento preciso requerido por la planta (Bashan, 1986c); las téc-

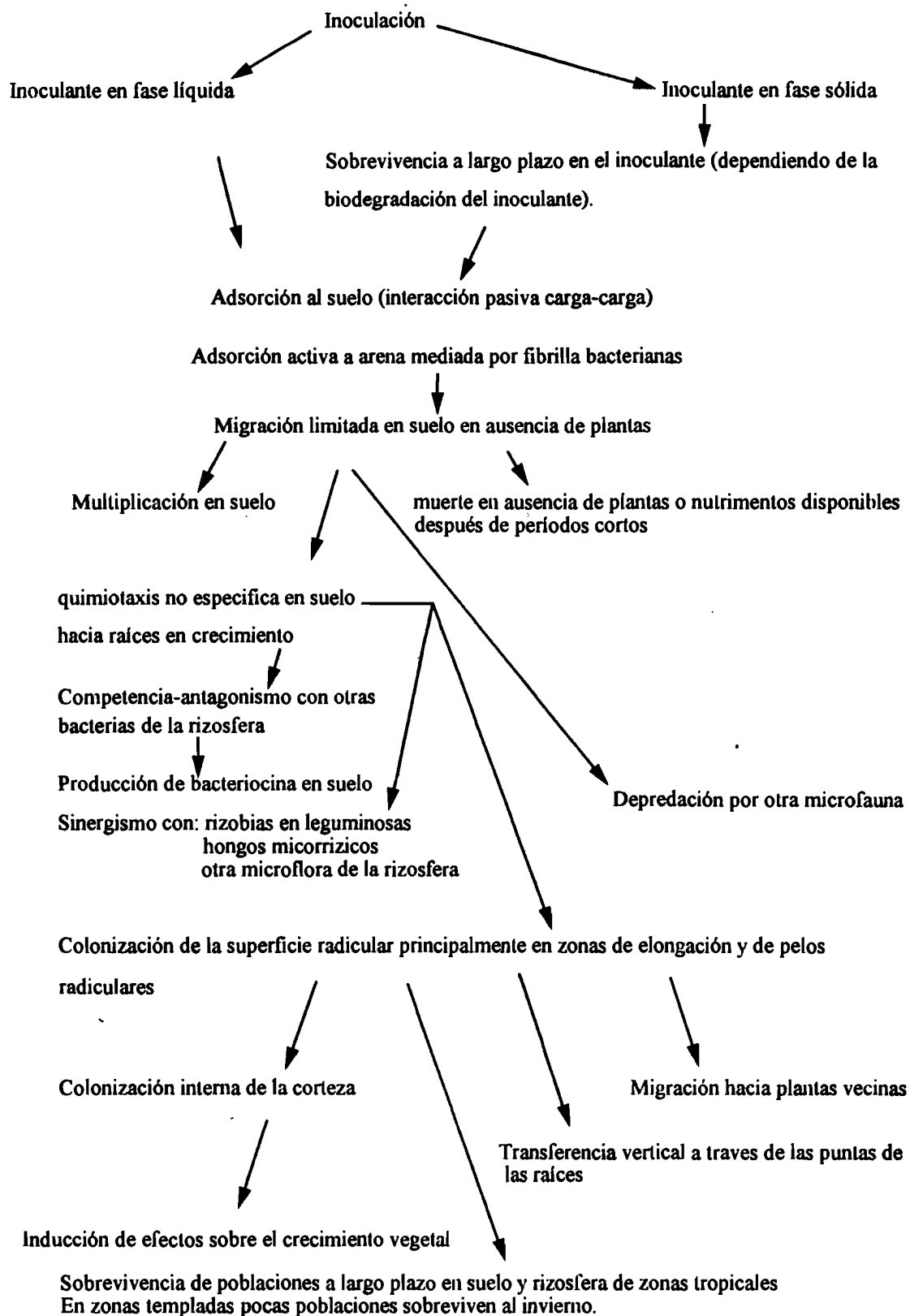


Figura 1. Fases de *Azospirillum* en la rizosfera*, solo indicaciones.

nicas de inoculación deben ser prácticas, económicas y fáciles de manejar por el agricultor; el producto formulado debe proveer inóculo suficiente para la planta; debe ser competitivo con las normas comerciales vigentes, así como tener una viabilidad de almacenamiento larga (Fages, 1992).

Actualmente se utilizan algunos métodos para inocular *Azospirillum*. El más simple es aplicando las bacterias en suspensión líquida, ya sea directamente al suelo o a las semillas. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos experimentos de invernadero y de campo (Albrecht *et al.*, 1981; Fallik *et al.*, 1988; Millet y Feldman, 1986; Reynders y Vlassak, 1982; Smith *et al.*, 1984b) pero resulta inadecuada puesto que el tiempo de sobrevivencia de *Azospirillum* en suelo es relativamente corto en ausencia de un acarreador (técnicas más confiables utilizan varios acarreadores orgánicos (Okon, 1985; Sadasivan *et al.*, 1986b). Los mejores resultados en rendimiento han sido obtenidos a partir de suspensiones de turba vertido por goteo al surco o distribuyendo el inoculante de turba granular al momento de la siembra. Al comparar la viabilidad de *Azospirillum* con diferentes acarreadores, la turba superó a la vermiculita, el polvo de talco, los gránulos de basalto y la bentonita (Fallik y Okon, 1996). Estos inoculantes prácticos no poseen ninguna de las características que requiere un buen inoculante debido a la liberación incontrolada de bacterias y varias dificultades técnicas ya que carece de una viabilidad de almacenamiento (Bashan, 1986b), lo que da como resultado una inconsistencia en el rendimiento. El encapsulamiento de células en biopolímeros como el alginato protege a las células de las tensiones ambientales y permite una gradual liberación de las bacterias al suelo (Bashan, 1986b). La sobrevivencia de las células dependerá de muchos parámetros tales como la cepa, la composición del medio en que se suspenden las células y las condiciones de secado. Paul *et al.* (1993) encontraron que la viabilidad de células de *Azospirillum lipoferum* encapsuladas en alginato (macroesferas) es mayor con una tasa baja de secado (1.18g/g peso seco/h). Otra opción es la producción de microesferas o microencapsulados bacterianos en una matriz de alginatos y liofilizados. De esta manera, se satisfacen los requerimientos de un inoculante bueno y práctico. Es un acarreador químicamente inerte similar a polvo de mármol, arena o carbonato de calcio, seco, fácil de usar, uniforme, biodegradable por organismos del suelo, de naturaleza no-tóxica, que contiene una población bacteriana vasta y uniforme, permite la liberación gradual

de las bacterias durante periodos largos hasta de un mes, y puede ser producido a gran escala (Bashan, 1986b; Bashan *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1993). Durante el proceso de optimización para la producción de microesferas de alginato, se obtuvo mayor sobrevivencia de las células al agregar leche descremada con deshidratación por aire controlada, obteniendo, finalmente, un inoculante en polvo fácil de almacenar y manejar con más de 10 billones de células/g (Fages, 1990, 1992). Debido a las ventajas de sobrevivencia que presentan las células enquistadas de *Azospirillum* sobre las células vegetativas, se sugiere la generación de inoculantes compuestos por agregados masivos o floculados de *Azospirillum* y/o *Rhizobium*, los cuales consisten en una mezcla de quistes y células vegetativas rodeados por una red de polisacáridos. La inoculación de frijol con formas floculadas de *R. leguminosarum* o coagregadas con *A. brasilense*, promovió la nodulación y el crecimiento de las plantas al compararse con inoculaciones con *Rhizobium* no floculado (Neyra *et al.*, 1995). Se encontró alta actividad nitrato reductasa en células enquistadas de *A. brasilense* Sp-7 y Sp-245 inmovilizadas en esferas de alginato, en cultivo continuo bajo condiciones anaerobias (Ueckert *et al.*, 1991). Los mejores resultados en crecimiento de plantas de maíz se obtuvieron al utilizar como inóculo células de *Azospirillum brasilense* con 40% de polihidroxibutirato (Fallik y Okon, 1996).

El desarrollo comercial de inoculantes de *Azospirillum* a escala industrial depende de tres factores principales, los cuales están interrelacionados entre sí: (1) avances en la investigación básica relacionada con el entendimiento de la asociación planta-bacteria; (2) una formulación y una tecnología de aplicación optimizadas; y (3) un cambio de actitud favorable por parte de las industrias agroquímicas y semilleras hacia los inoculantes microbianos, así como normas legislativas en cada país que autoricen su uso.

El desarrollo de inoculantes avanzados es una tarea esencial para lograr una aplicación futura de *Azospirillum*. El desarrollo de un acarreador bacteriano adecuado (sintético, orgánico o inorgánico) determinará si la interacción *Azospirillum*-planta tendrá un impacto significativo en la producción agrícola del futuro.

Los agroquímicos, especialmente los pesticidas, pueden ejercer efectos colaterales indeseables sobre microorganismos presentes en el ambiente.

Se ha ignorado la investigación relacionada con esta área de estudio. La única información disponible se refiere a estudios realizados *in vitro* donde los herbicidas,

fungicidas e insecticidas afectaron negativa o positivamente la actividad de la nitrogenasa (Buff *et al.*, 1992; Gallori *et al.*, 1991; Haahtela *et al.*, 1988; Jagnow *et al.*, 1979; Jena *et al.*, 1992; Martinez-Toledo *et al.*, 1990; Rivarola *et al.*, 1992; Roslycky, 1990; Salmeron *et al.*, 1991), así como el crecimiento de *Azospirillum* (Gadkari 1987, 1988; Omar *et al.*, 1992) y el proceso de respiración bacteriana (Omar y Abd-Alla, 1992).

Se estudió el efecto de thiobencarb en *Azospirillum* asociado con arroz bajo condiciones de laboratorio y campo y se encontró que tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las plántulas (Omar *et al.*, 1992). Jena *et al.* (1990) concluyen que bajo condiciones de no inundación en cultivo de arroz, el efecto de los herbicidas sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas dependió del tipo de suelo, concentración del herbicida y del grupo de bacteria.

El pesticida diflubenzuron incrementó significativamente el crecimiento, reducción de acetileno y concentraciones de ATP en células de *A. brasilense* (Sanchez *et al.*, 1994). De seis pesticidas probados, cinco inhibieron el crecimiento y la fijación de nitrógeno de *Azospirillum lipoferum* y cuatro afectaron la movilidad y volumen celular. La incorporación de insecticidas en el medio de crecimiento puede provocar el rompimiento de células de *Azospirillum* y la generación de células enquistadas (Mano *et al.*, 1988) o un incremento en la fijación de nitrógeno y producción de IAA (Jena *et al.*, 1987).

Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que *Azospirillum* puede tolerar altas concentraciones de algunos herbicidas y pesticidas (Langenbach *et al.*, 1991; Salmeron *et al.*, 1991). *A. lipoferum* pudo reducir un compuesto aromático utilizado en la fabricación de pesticidas, colorantes, explosivos y solventes industriales (Russel y Muszynski, 1995).

La aplicación tecnológica de *Azospirillum* dependerá de la realización de más estudios bajo condiciones de campo sobre el efecto de los agroquímicos sobre la fisiología de estas bacterias.

TECNICAS EN LA IDENTIFICACION, LOCALIZACION DE *AZOSPIRILLUM* EN RAICES Y ESTUDIO DE LA INTERACCION PLANTA-BACTERIA

Generalmente se siguen cuatro estrategias diferentes para el monitoreo de poblaciones y colonización de *Azospirillum* en raíces y suelo: Los métodos tradicionales,

los métodos inmunológicos, los métodos moleculares y combinaciones de varios métodos.

Los métodos tradicionales utilizan marcadores de resistencia a los antibióticos (Garcia de Salomone y Döbereiner, 1996), métodos de microscopía directa con técnicas de inmunofluorescencia (Schloter *et al.*, 1992), métodos de conteo por dilución en placa (Puente y Bashan, 1993), técnicas de cultivo y métodos fisiológicos de rutina. Estos métodos son populares en aquellos laboratorios de investigación agronómica, preocupados por monitorear la presencia de determinadas cepas en suelo o en plantas. Estos métodos no son útiles para la identificación de bacterias a nivel de especie. Además, la mayoría de estos métodos no pueden detectar niveles poblacionales bajos (menores a 10^4 - 10^5 bacterias/ml). Se puede mejorar el método de inmunofluorescencia a través del procesado de imágenes de microfotografías epifluorescentes o con microscopía de barrido con laser (scanning confocal laser microscopy), el cual involucra la iluminación de un solo punto de la muestra por un rayo laser eliminando la interferencia provocada por otros componentes de la muestra no enfocados, al mismo tiempo que permite (a través del procesado de imágenes) la reconstrucción en tres dimensiones del objeto analizado (Schloter *et al.*, 1995). Los métodos de detección inmunológicos han empezado a cobrar importancia en ecología microbiana para el rastreo de microorganismos específicos y para el análisis de la comunidad bacteriana. Para una aplicación confiable de estas técnicas, los anticuerpos monoclonales o el antisuero policlonal utilizados deben cumplir ciertos criterios de calidad. Se debe descartar la posibilidad de reacción cruzada así como determinar la localización celular del determinante antigénico, las características de afinidad y la expresión del determinante antigénico en condiciones ambientales. Los métodos inmunológicos pueden ser utilizados para la identificación, cuantificación y enriquecimiento de bacterias específicas, así como para la visualización de células *in situ*. La sensibilidad de estas técnicas inmunológicas avanzadas es comparable a los resultados obtenidos con la reacción en cadena de la polimerasa PCR (polymerase chain reaction) (Schloter *et al.*, 1995).

Una de las técnicas inmunológicas más útiles y directas es la técnica ELISA con sus variantes. Su principal desventaja es que el nivel de detección no es mayor a 10^4 bacterias/ml de suelo (Levanony *et al.*, 1987). La incorporación del complejo avidina-biotina a la técnica estándar de ELISA mejoró el nivel de detección y la cuan-

tificación de *A. brasilense* (Levanony y Bashan, 1990). Para mejorar el nivel de detección, se desarrolló un método sencillo de enriquecimiento, basado en la multiplicación limitada de *A. brasilense* en el medio semi-sólido convencional. El conteo de las bacterias se realiza después por la técnica ELISA o por la técnica del Número Más Probable (NMP) (Bashan *et al.*, 1991b).

Un método aún más sensible y rápido que la técnica ELISA es el inmunoensayo basado en quimioluminiscencia. Con este método fue posible cuantificar a *A. brasilense* Sp-7 hasta a una densidad de 100 bacterias/ml de extracto de suelo (Schloter *et al.*, 1992).

Las técnicas de vanguardia para la detección de microorganismos son las moleculares utilizadas solas o en combinación con técnicas inmunológicas. Por ahora, estas técnicas son principalmente utilizadas en laboratorios de investigación para la detección de especies y, hasta donde sabemos, no han sido utilizadas a gran escala por la industria de los inoculantes. Sin embargo, es de esperarse que, debido a su precisión, en un futuro estas técnicas serán ampliamente utilizadas.

Existen varios métodos de análisis del perfil proteico o "fingerprinting" para identificar especies de *Azospirillum*, siendo posible, en algunos casos, diferenciar hasta cepas de una misma especie. El análisis del perfil proteico utilizando electroforesis en "pulsed-field gel" demostró que diferentes cepas de *Azospirillum* asociadas a plantas de cultivo diferentes, mostraron un patrón genético muy similar (Eid y Sherwood, 1995). El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP) es otra opción para la identificación de bacterias a nivel cepa. La identificación de células de *Azospirillum* a través del RFLP del operon histidina y el análisis del 16S rDNA, son métodos fáciles, rápidos, confiables y reproducibles (Grifoni *et al.*, 1995) o a través de sondas (probes) de *Azospirillum* basados en el gen del 16S-rRNA (Kabir *et al.*, 1995). Giovannetti *et al.* (1992) tuvieron éxito en la identificación de cepas pertenecientes a las especies *A. lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense* utilizando el análisis del patrón de restricción, por lo que sugieren su uso para la identificación rutinaria de *Azospirillum*. Al marcar a *A. brasilense* con el transposon Tn5, el nivel de detección alcanzó niveles tan bajos como de 25 células/g de suelo (Christiansen-Weniger, 1992). Adicionalmente, los genes indicadores (reporter genes) NifA-lacZ fueron utilizados para localizar a *A. brasilense* Sp-7 en raíces de trigo (Katupitiya *et al.*, 1995).

Se utilizó hibridación de células completas con sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia (fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes) para el monitoreo *in situ* de *A. brasilense* en plántulas de trigo. Para eliminar la interferencia provocada por la fluorescencia que emiten otros componentes de la muestra, se utilizó "scanning confocal laser microscopy". Esta técnica permitió un análisis de alta resolución de la distribución espacial de las bacterias en la rizosfera del trigo (Assmus *et al.*, 1995).

Además de las técnicas mencionadas, se utilizó un método microcalorimétrico basado en la producción de calor del cultivo, para medir la sobrevivencia de las bacterias en suelo así como su metabolismo *in situ* (Vandenhove *et al.*, 1993). Ellos proponen caracterizar los cultivos de *Azospirillum* y estandarizar y optimizar inóculos a través de datos microcalorimétricos del cultivo.

En suma, aunque las técnicas tradicionales seguirán siendo utilizadas con fines prácticos, seguramente serán reemplazadas por versiones sencillas o kits de los métodos avanzados descritos aquí.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la discusión general de la última conferencia internacional sobre *Azospirillum* y microorganismos relacionados sostenida en Sárvár, Hungría, 1994, los participantes decidieron dirigir los esfuerzos de investigación futura sobre fisiología y ecología de *Azospirillum* a los siguientes temas: (1) co-inoculación con otros microorganismos, (ii) inoculación de plantas maderables, (iii) la participación de superficies bacterianas y vegetales en el proceso de adhesión, (iv) la importancia del genotipo en la interacción *Azospirillum*-planta, (v) especificidad y afinidad, y (vi) adaptabilidad ambiental (rizocompetencia).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue escrito en memoria del Sr. Avner Bashan de Israel quien alentó la investigación agrícola. Agradecemos a la Srita. Patricia Vázquez por organizar las citas bibliográficas y a Edgar Yuan por las búsquedas en los bancos de datos. Este trabajo fue realizado con el apoyo económico #3541-A del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

LITERATURA CITADA

- Agarwala Dutt, R., K.V.B.R. Tilak y J.P.S. Rana. 1991. Isolation of *Azospirillum* from the interior of various parts of some graminaceous plants. *Z. Mikrobiol.* 146: 217-219.
- Alagawadi, A.R. y A.C. Gaur. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in dry land. *Trop. Agric.* 69: 347-350.
- Albrecht, S.L., M.H. Gaskins, J.R. Milam, S.C. Schank y R.L. Smith. 1983. Ecological factors affecting survival and activity of *Azospirillum* in the rhizosphere. In: *Azospirillum II Experimentia Supplementum*, Vol. 48. W. Klingmüller (Ed.) Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 138-148.
- Albrecht, S.L., Y. Okon, L. Lonquist y R.H. Burris. 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Sci.* 21: 301-306.
- Al-Nahidh, S y A.H.M. Gomah. 1991. Response of wheat to dual inoculation with VA-mycorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. *Arid Soil Res. Rehabil.* 5: 83-96.
- Altabe, S.G., N. Inon-de-Iannino., D. De-Mendoza y R.A. Ugalde. 1994. New osmoregulated β (1-3), β (1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 176: 4890-4898.
- Andreeva, I.N., K. Mandkhan, T.V. Red'kina., E.N. Mishustin y S.F. Izmailov. 1991. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. *Soviet Plant Physiology* 38: 646-651.
- Andreeva, I.N., T.V. Red'kina y S.F.I. Smailov. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium*-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russian J. Plant Physiol.* 40: 901-906.
- Antonyuk, L.P., O.R. Fomina, M.A. Galkin y V.V. Ignatov. 1993. The effect of wheat germ agglutinin on dinitrogen fixation, glutamine synthetase activity and ammonia excretion in *Azospirillum brasilense* Sp 245. *FEMS Microbiol. Lett.* 110: 285-289.
- Antonyuk, L.P. O.R. Fomina, A. Kalinina, S. Semenov, M. Nestmeyer y V. Ignatov. 1995. Wheat lectin possibly serves as a signal molecule in the *Azospirillum*-wheat association. In: *Azospirillum VI* and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 319-324.
- Arsac, J.F., C. Lamothe, D. Mulard y J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 640-654.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence y A. Hartmann. 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
- Avivi, Y. y M. Feldman. 1982. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* 32: 237-245.
- Bakanchikova, T.I., E.V. Lobanok, L.K. Pavlova Ivanova, T.V. Red'kina, Z.A. Nagapetyan y A.N. Majsuryan. 1993. Inhibition of tumor formation process in dicotyledonous plants by *Azospirillum brasilense* strains. *Mikrobiologiya (Russian Federation)* 62: 515-523. (In Russian).
- Balandreau, J. 1986. Ecological factors and adaptive processes in N_2 -fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil* 90: 73-92.
- Baldani, V.L.D. y J. Döbereiner. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem* 12: 433-439.
- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 924-929.
- Baldani, V.L.D., J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
- Baldani, V.L.D., M.A. De B. Alvarez, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90: 35-46.
- Bali, M y K.G. Mukerji. 1991. Interaction between VA mycorrhizal fungi and root microflora of jute. *Dev. Agric. Manage. For. Ecol.* 24: 396-401.
- Bar, T. y Y. Okon. 1995. Conversion of tryptophan, indole-3-pyruvic acid, indole-3-lactic acid and indole to indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense* Sp 7. In: *Azospirillum VI* and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 347-359.
- Barak, R., I. Nur y Y. Okon. 1983. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 399-403.
- Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982a. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. *J. Bact.* 152: 643-649.
- Barak, R., I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982b. Tactic responses of *Azospirillum brasilense* towards oxygen and organic compounds. *Isr. J. Bot.* 31: 229-236.
- Barbieri, P., A. Bernardi, E. Galli y G. Zanetti. 1988. Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat roots development. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 181-188.
- Barbieri, P., C. Baggio, M. Bazzicalupo, E. Galli, G. Zanetti y M.P. Nuti. 1991. *Azospirillum*-gramineae interaction: effect of indole-3-acetic acid. *Dev. Plant Soil Sci.* Kluwer Academic Publishers Dordrecht 48: 161-168.
- Barbieri, P., C. Trambaioli, G. Zanetti y E. Galli. 1995. Inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd affects the root system development of *Sorghum bicolor*. In: *Azospirillum VI* and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 335-340.
- Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli y G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some

- mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 87-90.
- Barea, J.M., A.F. Bonis y A. Olivares. 1983. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 15: 705-709.
- Barton, L.L., G.V. Johnson y S. Orbock Miller. 1986. The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by sorghum. *J. Plant Nut.* 9: 557-565.
- Bashan, Y. 1986a. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1067-1071.
- Bashan, Y. 1986b. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1089-1098.
- Bashan, Y. 1986c. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* 18: 297-301.
- Bashan, Y. 1986d. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3407-3414.
- Bashan, Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Can. J. Microbiol.* 36: 419-425.
- Bashan, Y. 1991a. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 958-963.
- Bashan, Y. 1991b. Air-borne transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *Microb. Ecol.* 22: 257-269.
- Bashan, Y., A. Carrillo y G. Holguin. 1995a. New synthetic and multi-species bacterial inoculants for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications.* I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov y W.E. Newton (Eds). In the series "Current plant science and biotechnology in agriculture" Vol. 27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. p. 750.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 379-385.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2120-2131.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* 29: 269-281.
- Bashan, Y., G. Holguin y A. Carrillo. 1995b. Mixed bacterial inoculants and micro-encapsulated synthetic inoculants: present status and future prospects. *In: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants.* Saratov, Russia. pp. 42-44.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991a. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant Soil.* 132: 73-83.
- Bashan, Y., G. Mitiku, O. Ziv-Vecht y H. Levanony. 1991b. Estimation of minimal numbers of *Azospirillum brasilense* using time-limited liquid enrichment combined with enzyme-linked immunosorbent assay. *Soil Biol. Biochem.* 23: 135-138.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1985. An improved selection technique and medium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 31: 947-952.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3473-3480.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988a. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. *In: Azospirillum IV, Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 166-173.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988b. Migration, colonization and adsorption of *Azospirillum brasilense* to wheat roots. *In: Lectins-biology, biochemistry, clinical biochemistry.* T. C. Bøg-Hansen y D. L. J. Freed (Eds). Vol. 6. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. pp. 69-84.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988c. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1811-1820.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1988d. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2269-2279.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989a. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2899-2908.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989b. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.* 35: 936-944.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 137: 99-103.
- Bashan, Y., H. Levanony y E. Klein. 1986. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3069-3073.
- Bashan, Y., H. Levanony y G. Mitiku. 1989a. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 35: 691-697.
- Bashan, Y., H. Levanony y O. Ziv-Vecht. 1987. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season. *Can. J. Microbiol.* 33: 1074-1079.
- Bashan, Y., H. Levanony y R.E. Whitmoyer. 1991b. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* 137: 187-196.
- Bashan, Y., G. Mitiku, R.E. Whitmoyer y H. Levanony. 1991c. Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. *Plant and Soil* 132: 73-83.

- Bashan, Y y J.G. Dubrovsky. 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. Biol. Fertil. Soils. (In Press).
- Bashan, Y. y J. Wolowelsky. 1987. Soil samplers for quantifying microorganisms. Soil Sci. 143: 132-138.
- Bashan, Y., L. Alcaraz-Melendez y G. Toledo. 1992. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Symbiosis 13: 217-228.
- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodríguez-Mendoza, G. Holguin, G. Toledo, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrín. 1995c. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 441-449.
- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. Rodríguez-Mendoza, G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrín. 1995d. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1938-1945.
- Bashan, Y., M. Singh y H. Levanony. 1989c. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Canadian Journal of Botany 67: 2429-2434.
- Bashan, Y., S.K. Harrison y R.E. Whitmoyer. 1990. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. Appl. Environ. Microbiol. 56: 769-775.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Asade. 1989b. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Botany 67: 1317-1324.
- Becking, J.H. 1982. *Azospirillum lipoferum*-a reappraisal. In: *Azospirillum*, Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 130-149.
- Beijerinck, M.W. 1925. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2, 63: 353-359.
- Belimov, A.A., A.P. Kojemiakov, C.V. Chuvarliyeva. 1995a. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. Plant Soil. 173: 29-37.
- Berg, R.H., M.E. Tyler, N.J. Novick, V. Vasil y I.K. Vasil. 1980. Biology of *Azospirillum*-sugarcane association: enhancement of nitrogenase activity. Appl. Environ. Microbiol. 39: 642-649.
- Berg, R.H., V. Vasil y I.K. Vasil. 1979. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association II. Ultrastructure. Protoplasma 101: 143-163.
- Berge, O, J. Fages, D. Mulard y J. Balandreau. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. Symbiosis 9: 259-266.
- Bhattacharai, T. y D. Hess. 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant Soil 151: 67-76.
- Bilal, R., G. Rasul, M. Arshad y K.A. Malik. 1993. Attachment, colonization and proliferation of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter* spp. on root surface of grasses. World. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 63-69.
- Bilal, R., G. Rasul, J.A. Qureshi y K.A. Malik. 1990. Characterization of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology 6: 46-52.
- Bleakley, B.H., M.H. Gaskins, D.H. Hubbell, y S.G. Zam. 1988. Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly-hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2986-2995.
- Boddey, R.M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Gramineae. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 6: 209-266.
- Boddey, R.M. y J. Döbereiner. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. Plant Soil 108: 53-65.
- Boddey, R.M., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. Plant Soil 95: 109-121.
- Bothe, H., H. Koersgen, T. Lehmacher y B. Hundeshagen. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. Symbiosis 13: 167-179.
- Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce y R.P. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃, and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Bouton, J.H., R.L. Smith, S.C. Schank, G.W. Burton, M.E. Tyler, R.C. Littell, N.R. Gallaher y K.H. Quesenberry. 1979. Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Crop Sci. 19: 12-16.
- Bouton, J.H. y D.A. Zuberer. 1979. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 52: 585-590.
- Broek, A.V., J. Michiels, A. Van Gool y J. Vanderleyden. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *NifH* genes during association. Mol. plant-microbe inter. 6: 592-600.
- Buff, K., D.M.S. Mano y T. Langenbach. 1992. Effect of endosulfan on *Azospirillum lipoferum* growth, morphology, nitrogenase activity and protein binding. Appl. Environ. Microbiol. 8: 3173-3176.
- Caballero Mellado, J., M.G. Carcano Montiel y M.A. Mascarua Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13: 243-253.
- Chela, G.S. M.S. Tiwana, I.S. Thind, K.P. Puri y K. Kaur. 1993. Effect of bacterial cultures and nitrogen fertility on the yield and quality of maize fodder (*Zea mays* L.). Ann. Biol. 9: 83-86.
- Christiansen-Weniger, C. 1988. An influence of plant growth substances on growth and nitrogenase activity from *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 141-149.

- Christiansen-Weniger, C. 1992. Dynamics of a transposon Tn5 mutant of *Azospirillum brasilense* in soil and rhizosphere of spring wheat. *Symbiosis* 13: 85-100.
- Christiansen-Weniger, C. y J.A. Van Veen. 1991. NH₄⁺-excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3006-3012.
- Christiansen-Weniger, C. y J. Vanderleyden. 1994. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. *Biol. Fertil. Soils* 17: 1-8.
- Cohen, E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur y Y. Henis. 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.* 66: 746-749.
- Croes, C.L., S.Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden y K.W. Michiels. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2261-2269.
- Crossman, S.M. y Hill, W.A. 1987. Inoculation of sweet potato with *Azospirillum*. *HortScience* 22: 420-422.
- Crozier, A., P. Arruda, J.M. Jasmin, A.M. Monteiro y G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2833-2837.
- Dahm, H., H. Rozycki, E. Strzelczyk y C.Y. Li. 1993. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Z. Mikrobiol.* 148: 195-203.
- Das, A. y A.K. Mishra. 1984. Aerotolerant growth in *Azospirillum brasilense* induced by dehydroxyphenyl iron-binding compound. *Curr. Microbiol.* 11: 313-316.
- Dayakar Yadav, B.R. y T.D. Nagendra Kumar. 1991. Response of mulberry (*Morus alba* var. local) to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Indian j. Microbiol.* 31: 109-111.
- De Coninck, K., S. Horemans, S. Rombauts y K. Vlassak. 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* 110: 213-218.
- De Freitas, J.R. y J.J. Germida. 1990. A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. *Appl. Microbiol. Biotech.* 33: 589-595.
- Del Gallo, M. y A. Haegi. 1990. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 9: 155-161.
- Del Gallo, M. y I. Fendrik. 1994. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant associations*. Y. Okon (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 57-75.
- Del Gallo, M., L. Gratani y G. Morpurgo. 1988. Selection at the chemostat of *Azospirillum brasilense* Cd N₂-fixing at high O₂ pressure. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 75-82.
- Del Gallo, M., M. Negi y C.A. Neyra. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 171: 3504-3510.
- Del Gallo, M. y P.Fabbri. 1990. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chickpea (*Cicer arietinum*). *Symbiosis* 9: 283-287.
- Del Gallo, M. y P. Fabbri. 1991. Effect of soil organic matter on chickpea inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* bv. ciceri. *Plant Soil* 137: 171-175.
- Döbereiner, J. 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 207-212.
- Döbereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- Döbereiner, J. y V.L.D. Baldani. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 1264-1269.
- Drozdowicz, A. y G.M. Ferreira Santos. 1987. Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 142: 487-493.
- Dubrovsky, J.G., M.E. Puente y Y. Bashan. 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hairs growth. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1657-1664.
- Elmokadem, M.T. y Badawi, A.M. 1992. Effect of *Azospirillum* inoculation on the amino acid content in roots and shoots of wheat, barley, peas and lupin. *Z. Mikrobiol.* 147: 119-125.
- Eskew, D.L., A.R.J. Eaglesham y A.A. App. 1981. Heterotrophic ¹⁵N₂ fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. *Plant Physiol.* 68: 48-52.
- Eyers, M., J. Vanderleyden y A. Van Gool. 1988a. Attachment of *Azospirillum* to isolated plant cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 435-439.
- Eyers, M., F. Waelkens, J. Vanderleyden y A.P. Van Gool. 1988b. Quantitative measurement of *Azospirillum* plant cell attachment. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 174-180.
- Fabbri, P. y M. Del Gallo. 1995. Specific interaction between chickpea (*Cicer arietinum*) and three chickpea-*Rhizobium* strains inoculated singularly and in combination with *Azospirillum brasilense* Cd. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics- physiology -ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 257-267.
- Fages, J. 1990. An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crops. *Appl. Microbiol. Biotech.* 32: 473-478.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis* 13: 15-26.
- Fages, J. y J.F. Arsac. 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil.* 137: 87-90.
- Fages, J. y B. Lux. 1991. Identification of bacteria isolated from roots of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivated in a French Soil. *Can. J. Microbiol.* 37: 971-974.

- Falk, E.C., J. Döbereiner, J.L. Johnson y N.R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 117-118.
- Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner y N. R. Krieg. 1986. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 80-95.
- Fallik, E., S. Sarig y Y. Okon. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum/plant associations*. Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 77-85.
- Fallik, E. y Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28: 123-126.
- Fallik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman y M. Fischer. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* - inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.
- Fallik, E., Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20: 45-49.
- Favilli, F., F. Trinci y W. Balloni. 1988. *Azospirillum* spp ecology of some soils of the Somali republic. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 223-233.
- Favilli, R., R. Pastorelli y A. Gori. 1993. Response of sugar beet to *Azospirillum* bacterization in field experiments. *Agr. Med.* 123: 281-285.
- Fedi, S., P. Montaini y F. Favilli. 1992. Chemotactic response of *Azospirillum* toward root exudates of C₃ and C₄ plants. *Symbiosis* 13: 101-105.
- Fernandez-Vega Figueroa, Z.C. 1995. Capacidad fijadora de nitrógeno *in vitro* e *in vivo* de dos cepas de *Azospirillum* en plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.
- Firestone, M.K. 1982. Biological denitrification. In: *Nitrogen in agricultural soils*. F.J. Stevenson (Ed.). Agronomy monograph, American Society for Agronomy, Madison, WI. 22: 289-326.
- Flouri, F., K. Sini y C. Balis. 1995. Interactions between *Azospirillum* and *Phialophora radialis*. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 231-237.
- Fulchieri, M., C. Lucangeli y R. Bottini. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status on corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* 34: 1305-1309.
- Fulchieri, M. y L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- Gadkari, D. 1987. Influence of the herbicides Arelon, Goltix and Stomp on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum lipoferum*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 142: 587-594.
- Gadkari, D. 1988. Influence of herbicides on growth and nitrogenase activity of *Azospirillum*. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 150-158.
- Gafni, R., Y. Okon, Y. Kapulnik y M. Fischer. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* 18: 69-75.
- Gallori, E., E. Casalone, C.M. Colella, S. Daly y M. Polsinelli. 1991. 1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of captan and thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. *Res. Microbiol.* 142: 1005-1012.
- Gamo, T. y S.B. Ahn. 1991. Growth-promoting *Azospirillum* spp. isolated from the roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 37: 455-461.
- Garcia de Salomone, I. y J. Döbereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soil* 21:193-196.
- George, M. 1990. *Azospirillum* for nitrogen fixation in coconut (a research note). *Philippine J. Coconut Studies* 15: 1-3.
- Germida, J.J. 1986. Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. *Plant Soil* 90: 117-128.
- Germida, J.J. 1987. Isolation of *Bdellovibrio* spp. that prey on *Azospirillum brasilense* in soil. *Can. J. Microbiol.* 33: 459-461.
- Giovannetti, L., S. Fedi, A. Gori, P. Montaini y S. Ventura. 1992. Identification of *Azospirillum* strains at the genome level with total DNA restriction pattern analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 37-41.
- Gori, A. y F. Favilli. 1995. First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum - glomus* on wheat. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics -physiology- ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 245-249.
- Gosal, S.K., R.P. Gupta y S.S. Gosal. 1990. Establishment of association between *Azospirillum* and non-legumes *in vitro* and plant regeneration. *Ann. Biol.* 6: 161-165.
- Govedarica, M., N. Milosevic, M. Jarak y M. Vojvodic Vukovic. 1993. Effectiveness of *Azospirillum lipoferum* strains in carrot. *Zemljiste I. Biljka* (Yugoslavia) 42: 121-125. (in Serbian)
- Grifoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di-Serio, S. Fancelli y R. Fani. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 85-91.
- Grishanin, R.N., I.I. Chalmina, I.B. Zhulin. 1991. Behaviour of *Azospirillum brasilense* in a spatial gradient of oxygen and in a 'redox' gradient of an artificial electron acceptor. *J.Gen.Microbiol.* 137: 2781-2785.
- Haahtela, K., S. Kilpi y K. Kari. 1988. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 123-127.

- Haahtela, K., T. Wartiovaara, V. Sundman y J. Skujins. 1981. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 203-206.
- Hadas, R. y Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 5: 241-247.
- Hall, P.G. y N.R. Krieg. 1984. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 433-435.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1985. Cellulose decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species of *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1021-1026.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1986. Comparison of two *Cellulomonas* strains and their interaction with *Azospirillum brasilense* in degradation of wheat straw and associated nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 855-861.
- Halsall, D.M. y A.H. Gibson. 1991. Nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) in straw-amended wheat belt soils in response to diazotrophs inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 987-998.
- Halsall, D.M. y D.J. Goodchild. 1986. Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed population of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 849-852.
- Halsall, D.M., G.L. Turner y A.H. Gibson. 1985. Straw and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 423-428.
- Harari, A., J. Kigel y Y. Okon. 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. *Plant Soil* 110: 275-282.
- Hardy, R.W., R.D. Holsten, E.K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and Field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207.
- Harris, J.M., J.A. Lucas, M.R. Davey, G. Lethbridge y K.A. Powell. 1989. Establishment of *Azospirillum* inoculant in the rhizosphere of winter wheat. *Soil Biol. Biochem.* 21: 59-64.
- Hartmann, A. 1988. Osmoregulatory properties of *Azospirillum* spp. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 122-130.
- Hartmann, A., M. Singh y W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- Hartmann, A., S.R. Prabhu y E.A. Galinski. 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil*. 137: 105-109.
- Hartmann, A. y T. Hurek. 1988. Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2449-2455.
- Hartmann, A. y W. Zimmer. 1994. Physiology of *Azospirillum*. *In: Azospirillum/plant associations.* Y. Okon (Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 15-39.
- Hassouna, M.G., M.T. Hassan y M.A. Madkour. 1994. Increased yields of alfalfa (*Medicago sativa*) inoculated with N₂-fixing bacteria and cultivated in a calcareous soil of Northwestern Egypt. *Arid Soil Res. Rehabilit.* 8: 389-393.
- Hegazi, N.A. 1988. Modification of soil environment through straw application versus *Azospirillum* spp. inoculation. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 215-222.
- Hegazi, N.A., M. Monib, H.A. Amer y E.S. Shokr. 1983. Response of maize plants to inoculation with azospirilla and (or) straw amendment in Egypt. *Can. J. Microbiol.* 29: 888-894.
- Heinrich, D. y D. Hess. 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31: 26-31.
- Hess, D. 1982. Induction of nitrogenase activity in *Azospirillum* by wheat. *In: Azospirillum: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 69-74.
- Heulin, T., A. Guckert y J. Balandreau. 1987. Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biol. Fertil. Soils.* 4: 9-14.
- Heulin, T., M. Rahman, A.M.N. Omar, Z. Rafidison, J.C. Pierrat y J. Balandreau. 1989. Experimental and mathematical procedures for comparing N₂-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. *J. Microbiol. Meth.* 9:163-173.
- Hill, W.A., P. Bacon-Hill., S.M. Crossman y C. Stevens. 1983. Characterization of N₂-fixing bacteria associated with sweet potato roots. *Can. J. Microbiol.* 29: 860-862.
- Holguin, G. y Y. Bashan. 1993. Increasing the nitrogen-fixing activity of *Azospirillum* by mixed culturing with *Staphylococcus* sp. *In: New horizons in nitrogen fixation.* R. Palacios, J. Mara y W.E. Newton (Eds). Nijhoff/Junk, Dordrecht, The Netherlands. (in press).
- Holguin, G., y Y. Bashan. 1996. Co-culturing of *Azospirillum brasilense* Cd with the mangrove rhizosphere bacteria *Staphylococcus* sp. promotes its nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* (accepted).
- Horemans, S., K. De Coninck, J. Neuray, R. Hermans y K. Vlassak. 1986. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and other rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341-346.
- Horemans, S., K. De Koninck y K. Vlassak. 1988. Aspects of the ecology of *Azospirillum* sp. in Belgian soils. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 207-214.
- Horemans, S., S. Demarsin, J. Neuray y K. Vlassak. 1987. Suitability of the BLCR medium for isolating *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 806-808.
- Hurek, T., B. Reinhold, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1987. Root-zone-specific oxygen tolerance of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 163-169.
- Hurek, T., B. Reinhold, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1988. N₂-dependent growth of *Azospirillum* spp. in batch cultures at low concentrations of oxygen. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 115-121.

- Inbal, E. y M. Feldman. 1982. The response of a hormonal mutant of common wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. *Isr. J. Bot.* 31: 257-263.
- Iosipenko, A., y V. Ignatov. 1995. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp 7. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 307-312.
- Iruthayathas, E.E., S. Gunasekaran y K. Vlassak. 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂-fixation of winged bean and soybean. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 20: 231-240.
- Itzigsohn, R., Y. Kapulnik, Y. Okon y A. Dovrat. 1993. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 39: 610-615
- Itzigsohn, R., Z. Abbass, S. Sarig y Y. Okon. 1995. Inoculation effects of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 503-513.
- Jagnow, G. 1982. Growth and survival of *Azospirillum lipoferum* in soil and rhizosphere as influenced by ecological stress conditions. In: *Azospirillum: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.) Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 100-107.
- Jagnow, G. 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria: possible causes of success and failure with regard to yield response - a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.* 150: 361-368.
- Jagnow, G., O. Heinemeyer y S. Draeger. 1979. Choice of liquid, semisolid, or soil suspension media: an important factor modifying the effect of pesticides on the nitrogenase (C₂H₂) activity of *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum* and *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Ecotox. Environ. Safety* 3: 152-158.
- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1208-1213.
- Jain, D.K. y D.G. Patriquin. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.
- Janzen, R.A. y W.B. McGill. 1995. Community-level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 189-196.
- Janzen, R.A., S.B. Rood, J.F. Dormaar y W.B. McGill. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1061-1064.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1987. Nitrogen fixation and indole acetic acid production by *Azospirillum* sp. as influenced by an insecticide, carbofuran. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 355-360.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1990. Nitrogen-fixing bacterial populations as influenced by butachlor and thiobencarb in rice soils. *Z. Mikrobiol.* 145: 457-460.
- Jena, P.K., T.K. Adhya y V.R. Rao. 1992. Nitrogen fixation in *Azospirillum* sp. isolated from rice roots and soils as influenced by carbofuran and combined nitrogen. *Z. Mikrobiol.* 147: 340-344.
- Kabir, M.M., D. Faure, J. Haurat, P. Normand, C. Jacoud, P. Wadoux y R. Bally. 1995. Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 41:1081-1087.
- Kaiser, P. 1995. Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacae*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 207-212.
- Kapulnik, Y., M. Feldman, Y. Okon y Y. Henis. 1985a. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in israel. *Soil Biol. Biochem.* 17: 509-515.
- Kapulnik, Y., R. Gafni y Y. Okon. 1985b. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃⁻ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.* 63: 627-631.
- Kapulnik, Y., J. Kigel, Y. Okon, I. Nur y Y. Henis. 1981a. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. *Plant Soil* 61: 65-70.
- Kapulnik, Y., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur y Y. Henis. 1981b. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain Cd). *Plant Physiol.* 68: 340-343.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1985c. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- Kapulnik, Y., Y. Okon y Y. Henis. 1987. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. Turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. *Biol. Fertil. Soils* 4: 27-35
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur y Y. Okon. 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 895-899.
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon y Y. Henis. 1982. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. *Isr. J. Bot.* 31: 247-255.
- Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon, J. Kigel y Y. Henis. 1981c. Yield increases in summer cereal crops of Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. *Exp. Agric* 17: 179-187.
- Katupitiya, S., P.B. New, C. Elmerich y I.R. Kennedy. 1995. Improved N₂ fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporting genes. *Soil Biol. Biochem.* 27: 447-452.
- Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium

- associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology* 140: 679-693.
- Khammas, K.M. y P. Kaiser. 1991. Characterization of pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant and Soil* 137: 75-79.
- Khammas, K.M. y P. Kaiser. 1992. Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Can. J. of Microbiol.* 38: 794-797.
- Kimmel, S., B. Reinhold-Hurek, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1990. Contribution of chemotaxis and aerotaxis to the establishment of *Azospirillum* in the rhizosphere. *Proceedings of the international conference on the mechanisms between soil plant microorganisms in the rhizosphere* 9: 195-197.
- Kolb, W. y P. Martin. 1985. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. *In: Azospirillum III: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 215-221.
- Kolb, W. y P. Martin. 1988. Influence of nitrogen on the number of N₂-fixing and total bacteria in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 20: 221-225.
- Kosslak, R.M. y B.B. Bohlool. 1983. Prevalence of *Azospirillum* spp. in the rhizosphere of tropical plants. *Can. J. Microbiol.* 29: 649-652.
- Kothari, S.K. y C.S. Saraf. 1986. Response of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) to bacterial seed inoculation and application of phosphorus fertilizer. *J. Agric. Sci.* 107: 463-466.
- Kravchenko, L.V., E.I. Leonova y I.A. Tikhonovich. 1994. Effect of root exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotrophs. *Microb. Releases.* 2: 267-271.
- Krieg, N.R. y J. Döbereiner. 1986. The genus *Azospirillum*. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology.* N.R. Krieg y J. G. Holt. (Eds). Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 96-104.
- Kucey, R.M.N. 1988a. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 34: 735-739.
- Kucey, R.M.N. 1988b. Plant growth-altering effects of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus C-11-25* on two wheat cultivars. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 187-196.
- Kulinska, D. y A. Drozdowicz. 1983. Occurrence of microorganisms antagonistic to *Azospirillum* spp. *Zentralbl. Mikrobiol.* 138: 585-594.
- Kulinska, D. y B. Kroczyńska. 1990. Occurrence of actinomycetes antagonistic to *Azospirillum* spp. [*Azospirillum lipoferum*] in rye monoculture. *Annals of Warsaw Agricultural University.* no. 22. pp. 55-61.
- Ladha, J.K., R.B. So y I. Watanabe. 1987. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. *Plant Soil* 102: 127-129.
- Lamm, R.B. y C.A. Neyra. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol.* 27: 1320-1325.
- Langenbach, T., D.M.S. Mano, W. De-Souza y A.N. Hagler. 1991. Influence of insecticides on growth, nitrogenase activity and morphology of *Azospirillum lipoferum*. *Cienc. Cult.* 43: 207-209.
- Lau-Wong, M.M. 1987. Field testing of the effectiveness of bacterial fertilizer in Nepal. *Agric. Ecosyst. Environ.* 19: 145-153.
- Lee, K.J. y M.H. Gaskins. 1982. Increased root exudation of ¹⁴C-compounds by sorghum seedlings inoculated with nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 69: 391-399.
- Lethbridge, G. y M.S. Davidson. 1983. Root-associated nitrogen-fixing bacteria and their role in the nitrogen nutrition of wheat estimated by ¹⁵N isotope dilution. *Soil Biol. Biochem.* 15: 365-374.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1989a. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. *Current Microbiology.* 18: 145-149.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1989b. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 2213-2216.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Current Microbiology* 20: 91-94.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991a. Enumeration and identification of rhizosphere bacteria by advanced immuno techniques. *In: Plant growth-promoting hizobacteria-progress and prospects.* C. Keel, B. Koller y G. Défago. IOBC/WPRS Bulletin, Zürich, Switzerland. pp. 231-237.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991b. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant and Soil* 137: 91-97.
- Levanony, H., Y. Bashan y Z.E. Kahana. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd. in cereals roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 358-364.
- Levanony, H., Y. Bashan, B. Romano y E. Klein. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat roots by immuno-gold labeling. *Plant Soil* 117: 207-218.
- Li, C.Y. y M.A. Castellano. 1987. *Azospirillum* isolated from within sporocarps of the mycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* and *Rhizopogon vinicolor*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 563-565.
- Lin, W., Y. Okon y R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1775-1779.
- Lippi, D., I. Cacciari, T. Pietrosanti y W. Pietrosanti. 1992. Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. *Symbiosis* 13: 107-114.
- López de Victoria, G. y C.R. Lovell. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2951-2955.
- López de Victoria, G., D.R. Fielder, R.K. Zimmer faust y C.R. Lovell. 1994. Motility behavior of *Azospirillum* species in

- response to aromatic compounds. *Can. J. Microbiol.* 40: 705-711.
- Macalintal, E.M. y G.V. Urgel. 1992. Effects of *Azospirillum*-inoculated seedpieces and rate of nitrogen application on yields of sugarcane. *Philippine Sugar Quarterly* 3: 8-10.
- Madi, L., M. Kessel, E. Sadovnik y Y. Henis. 1988. Electron microscopic studies of aggregation and pellicle formation in *Azospirillum* spp. *Plant Soil* 109: 115-121.
- Madkour, M.A., L.T. Smith y G.M. Smith. 1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2876-2881.
- Magalhães, F.M.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall y J. Döbereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 55: 417-430.
- Maheswari, M. y D. Purushothaman. 1990. Root exudate of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) as chemoattractant for *Azospirillum*. *Curr. Sci.* 59: 110-111.
- Mandimba, G., T. Heulin, R. Bally, A. Guckert y J. Balandreau. 1986. Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil* 90: 129-139.
- Mano, D.M.S., A.C.M. Matos y T. Langenbach. 1988. The effect of dicofol on morphology growth and nitrogenase activity of *Azospirillum lipoferum*. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 159-165.
- Markus, P. y J. Krämer. 1988. Importance of nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria in organic farming systems. In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 197-204.
- Martinez-Toledo, M.V., V. Salmeron y J. González-López. 1990. Effect of phenoxy and benzoic acid herbicides on nitrogenase activity and growth of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 22: 879-881.
- Martin, P. y A. Glatzle. 1982. Mutual influences of *Azospirillum* spp. and grass seedlings. In: *Azospirillum*: Genetics, physiology, ecology. W. Klingmüller (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel. pp. 108-120.
- Matthews, S.W., S.C. Schank, H.C. Aldrich y R.L. Smith. 1983. Peroxidase-antiperoxidase labeling of *Azospirillum brasilense* in field-grown pearl millet. *Soil Biol. Biochem.* 6: 699-703.
- Mertens, T. y D. Hess. 1984. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. *Plant Soil* 82: 87-99.
- Michiels, K.W., C.L. Croes y J. Vanderleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2241-2246.
- Michiels, K., C. Verreth y J. Vanderleyden. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 705-711.
- Millet, E. y M. Feldman. 1986. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant Soil* 80: 255-259.
- Millet, E., Y. Avivi y M. Feldman. 1986. Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 80: 261-266.
- Morgenstern, E. y Y. Okon. 1987a. The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* *Sorghum sudanense*. *Arid Soil Res. Rehabilit.* 1: 115-127.
- Morgenstern, E. y Y. Okon. 1987b. Promotion of plant growth and NO₃⁻ and RB⁺ uptake in *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense* inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Arid Soil Res. Rehabilit.* 1:211-217.
- Mortley, D.G. y W.A. Hill. 1990. Sweetpotato growth and nitrogen content following nitrogen application and inoculation with *Azospirillum*. *HortScience* 25: 758-759.
- Murray, R.G.E. y D. Moyles. 1987. Differentiation of the cell wall of *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 33: 132-137.
- Murty, M.G. y J.K. Ladha. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils* 4: 3-7.
- Murty, M.G. y J.K. Ladha. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* 108: 281-285.
- Nayak, D.N., J.K. Ladha y I. Watanabe. 1986. The fate of marker *Azospirillum lipoferum* inoculated into rice and its effect on growth, yield and N₂ fixation of plants studied by acetylene reduction, ¹⁵N₂ feeding and ¹⁵N dilution techniques. *Biol. Fert. Soils* 2: 7-14.
- Negi, M., K.V. Sadasivam y K.V.B.R. Tilak. 1987. Establishment of *Azotobacter* and *Azospirillum* in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) in organic-amended soils. *Zentralbl. Mikrobiol.* 142: 149-154.
- New, P.B. y I.R. Kennedy. 1989. Regional Distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in eastern Australia. *Microbial Ecology* 17: 299-309.
- Neyra, C.A., A. Atkinson y O. Olubayi. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 429-439.
- Nosko, P., L.C. Bliss y F.D. Cook. 1994. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids. *Arct. Alp. Res.* 26: 180-186.
- Nur, I., Y. Okon y Y. Henis. 1980a. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.* 26: 482-485.
- Nur, I., Y. Okon y Y. Henis. 1980b. Comparative studies of nitrogen-fixing bacteria associated with grasses in Israel with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 26: 714-718.
- O'Hara, G.W., M.R. Davey y J.A. Lucas. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. *Can. J. Microbiol.* 27: 871-877.
- O'Hara, G.W., M.R. Davey y J.A. Lucas. 1987. Effect of nitrogen on the yield response of *Pennisetum americanum*, *Triticum aestivum* and *Zea mays* to inoculation with

- Azospirillum brasilense* under temperate conditions. Biol. Fertil. Soils 4: 67-72.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends in Biotechnology 3: 223-228.
- Okon, Y., L. Cakmakci, I. Nur y I. Chet. 1980. Aerotaxis and chemotaxis of *Azospirillum brasilense*: a note. Microb. Ecol. 6: 277-280
- Okon, Y. y Y. Hadar. 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 61-85.
- Okon, Y., P.G. Heytler y R.W.F. Hardy. 1983. N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 694-497.
- Okon, Y. y R. Itzigsohn. 1992. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Lett. 103: 131-139.
- Okon, Y. y Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum* - inoculated roots. Plant Soil 90: 3-16.
- Okon, Y. y C.A. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26: 1591-1601.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. Rev. Microbiol. (Brazil) 12: 42-47.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1987. Inhibition of producing strains of *Azospirillum lipoferum* by their own bacteriocin. Zentralbl. Mikrobiol. 142: 387-391.
- Oliveira, R.G.B. y A. Drozdowicz. 1988. Are *Azospirillum* bacteriocins produced and active in soil? In: *Azospirillum* IV: Genetics, physiology ecology. W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 101-108
- Oliveira, R.G.B. y M.L. DeSouza. 1991. Partial characterization of a brown pigment produced by *Azospirillum lipoferum*. Rev. Microbiol. (Brazil) 22: 340-344.
- Omar, M.N.A., O. Berge, E.E. Hassanein y S.N. Shalan. 1992. *In vitro* and *in situ* effects of herbicide thiobencarb on rice-*Azospirillum* association. Symbiosis 13: 55-63.
- Omar, S.A. y M.H. Abd-Alla. 1992. Effect of pesticides on growth, respiration and nitrogenase activity of *Azotobacter* and *Azospirillum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8: 326-328.
- Omay, S.H., W.A. Schmidt, P. Martin y F. Bangerth. 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. Can. J. Microbiol. 39: 187-192.
- Pacovsky, R.S. 1988. Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. Plant Soil 110: 283-287.
- Pacovsky, R.S., G. Fuller y E.A. Paul. 1985a. Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in *Sorghum*. Soil Biol. Biochem. 17: 525-531.
- Pacovsky, R.S., E.A. Paul y G.J. Bethlenfalvay. 1985b. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 85: 145-148.
- Pal, U.R. y H.S. Malik. 1981. Contribution of *Azospirillum brasilense* to the nitrogen needs of grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in humid sub-tropics. Plant Soil 63: 501-504.
- Patnaik, G.K., L.K. Bose, A.M. Mehta y V.R. Rao. 1994. Rhizosphere nitrogenase and *Azospirillum* sp. association with wild, trisomic and cultivated rice. Microbiol. Res. 149: 42-46.
- Patriquin, D.G. y J. Döbereiner. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734-747.
- Patriquin, D.G., J. Döbereiner y D.K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol. 29: 900-915.
- Paul, E., J. Fages, P. Blanc, G. Goma y A. Pareilleux. 1993. Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 34-39.
- Pedrosa, F.O. 1988. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. CRC crit. Rev. Plant Sci. 6: 345-384.
- Penot, I., N. Berges, C. Guinguene y J. Fages. 1992. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays*) in France, using biochemical tests and plasmid profiles. Canadian Journal of Microbiology 38: 798-803.
- Pereira, J.A.R., V.A. Cavalcante, J.I. Baldani y J. Döbereiner. 1988. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant Soil 110: 269-274.
- Piccoli, P. y R. Bottini. 1994. Effects of C/N ratio, N content, pH, and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis 17: 229-236.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985a. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. J. Plant Physiol. 120: 181-187.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985b. *Azospirillum-Rhizobium* interaction leading to a plant growth stimulation without nodule formation. Can. J. Microbiol. 31: 1026-1030.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985c. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 49: 984-989.
- Plazinski, J. y B.G. Rolfe. 1985d. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. Appl. Environ. Microbiol. 49: 990-993.
- Puente, M.E. y Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). Symbiosis 15: 49-60.
- Rademacher, W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. Plant Growth Regul. 15: 303-314.
- Rai, R. 1983. Efficacy of associative N₂-fixation by streptomycin-resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes of chick pea *Rhizobium* strains. J. Agric. Sci. Camb. 100: 75-80.
- Rai, R. 1991. Isolation, characterization and associative N-fixation of acid-tolerant *Azospirillum brasilense* strains associated with Eleusine coracana in low pH-Al-rich acid soil. Dev. Plant Soil Sci. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. 45: 663-671.
- Rai, S.N. y A.C. Gaur. 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant Soil 69: 233-238.

- Rangel-Lucio, J.A., R. Ferrera-Cerrato, J.D. Molina-Galan, N. Rodriguez-Mendoza. 1991. Influencia de la variabilidad genética del maíz (*Zea mays* L.) sobre la actividad de *Azospirillum* sp. J.L. Tovar S. y R. Quintero L. (Eds.) La Investigación Edafológica en México 1990-1991. Memorias XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Pachuca, Hidalgo, México.
- Rao, A.V. y B. Venkateswarlu. 1982. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. *Can. J. Microbiol.* 28: 778-782.
- Rao, J.L.N. y V.R. Rajamamohan Rao. 1983. Nitrogenase activity in the rice rhizosphere soil as affected by *Azospirillum* inoculation and fertilizer nitrogen under upland conditions. *Curr. Sci.* 52: 686-688.
- Rao, V.R., D.N. Nayak, P.B.B.N. Charyulu y T.K. Adhay. 1983. Yield responses of rice to root inoculation with *Azospirillum*. *J. Agric. Sci. Camb.* 100: 689-691.
- Raverkar, K.P. y B.K. Konde. 1990. Influence of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on *Arachis hypogaea* L. and detection of *Rhizobium* by ELISA. *Indian J. Microbiol.* 30: 209-212.
- Reiner, O. y Y. Okon. 1986. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 32: 829-834.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Baldani y J. Döbereiner. 1988. Temperature and salt tolerance of *Azospirillum* spp from salt-affected soils in Brazil. *In: Azospirillum IV. Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 234-241.
- Reinhold, B., T. Hurek y I. Fendrik. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bact.* 162: 190-195.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann y I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halo-praeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rennie, R.J. 1980. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Can. J. Bot.* 58: 21-24.
- Rennie, R.J., J.R. Defreitas, A.P. Ruschel y P.V. Vose. 1983. ¹⁵N-isotope dilution to quantify dinitrogen (N₂) fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. *Can. J. Bot.* 61: 1667-1671.
- Reuthe, R.J. y J.B. Thomas. 1987. ¹⁵N-determined effect of inoculation with N₂ fixing bacteria on nitrogen assimilation in Western Canadian wheats. *Plant Soil* 100: 213-223.
- Reynders, L. y K. Vlassak. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil.* 66: 217-223.
- Riou, N. y D. Le Rudulier. 1990. Osmoregulation in *Azospirillum brasilense*: glycine betaine transport enhances growth and nitrogen fixation under salt stress. *J. Gen. Microbiol.* 136: 455-461.
- Riou, N., M.C. Poggi y D. Le Rudulier. 1991. Characterization of an osmoregulated periplasmic glycine betaine-binding protein in *Azospirillum brasilense* sp7. *Biochimie* 73: 1187-1193.
- Rivarola, V., A. Fabra, G. Mori y H. Balegno. 1992. *In vitro* protein synthesis is affected by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Toxicology* 73: 71-79.
- Rodelas, B., V. Salmeron, M.V. Martinez-Toledo y J. González-López. 1993. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant Soil* 153: 97-101.
- Roslycky, E.B. 1990. Effect of sethoxydim on some properties of *Azotobacter* and *Azospirillum* spp. *Phyton* 51: 111-123.
- Rozycki, H., E. Strzelczyk, E. Raczowska y C.Y. Li. 1992. Effect of different carbon and nitrogen sources and vitamins on growth of *Azospirillum* spp isolated from coniferous ectomycorrhizae and sporocarps of ectomycorrhizal fungi. *Acta Microbiol. Polonica* 41: 193-201.
- Ruckdäschel, E., B.L. Kittell, D.R. Helinski y W. Klingmüller. 1988. Aromatic amino acid aminotransferases of *Azospirillum lipoferum* and their possible involvement in IAA biosynthesis. *In: Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology.* W. Klingmüller (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 49-53.
- Russel, S. y C.C. Ifiorah. 1995. Occurrence of dinitrogen-fixing bacteria and acetylene reduction activity in a rhizosphere of five selected plants from tropics. *In: Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology.* I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 549-554.
- Russel, S. y S. Muszynski. 1995. Reduction of 4-chloronitrobenzene by *Azospirillum lipoferum*. *In: Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology.* I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 369-375.
- Sadasivan, K.V., M. Negi y K.V.B.R. Tilak. 1986a. Survival of *Azospirillum brasilense* and *Azotobacter chroococcum* in organic-amended soil-based carriers. *Zentralbl. Mikrobiol.* 141: 567-570.
- Sadasivan, K.V., R.K. Tyagi y S. Ramarethinam. 1986b. Evaluation of some agricultural wastes as carriers for bacterial inoculants. *Agric. Wastes* 17: 301-306.
- Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* 163: 716-723.
- Sadasivan, L. y C.A. Neyra. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* 169: 1670-1677.
- Saha, K.C., S. Sannigrahi y L.N. Mandal. 1985. Effect of inoculation of *Azospirillum lipoferum* on nitrogen fixation in rhizosphere soil, their association with roots, yields and nitrogen uptake by mustard (*Brassica juncea*). *Plant Soil* 87: 273-280.
- Salmeron, V., M.V. Martinez-Toledo y J. Gonzalez-Lopez. 1991. Effects of alachlor and metolachlor on the biological activity of *Azospirillum brasilense* grown in chemically defined and

- dialyzed-soil media. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 493-499.
- Sánchez, C.E., B. Rodelas, M.V. Martínez Toledo, V. Salmeron y González J. López. 1994. Diflufenzuron and the biological activity of *Azospirillum brasilense*. *Toxicol. Environ. Chem.* 42: 241-247.
- Sarig, S., A. Blum y Y. Okon. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci. Camb.* 110: 271-277.
- Sarig, S., Y. Kapulnik, I. Nur y Y. Okon. 1984. Response of non-irrigated *Sorghum bicolor* to *Azospirillum* inoculation. *Exp. Agric.* 20: 59-66.
- Sarig, S., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1986. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant Soil* 90: 335-342.
- Sarig, S., Y. Okon y A. Blum. 1990. Promotion of leaf area development and yield in *Sorghum bicolor* inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 9: 235-245.
- Sarig, S., Y. Okon y A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. *J. Plant Nutr.* 15: 805-819.
- Schank, S.C. y R.L. Smith. 1984. Status and evaluation of associative grass-bacteria N₂-fixing systems in Florida. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.* 43: 120-123.
- Schank, S.C., R.L. Smith, G.C. Weiser, D.A. Zuberer, J.H. Bouton, K.H. Quesenberry, M.E. Tyler, J.R. Milam y R.C. Littell. 1979. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. *Soil. Biol. Biochem.* 11: 287-295.
- Schank, S.C., R.L. Smith, J.R. Milam y R.C. Littell. 1985. Testing grass-bacteria combinations for associative N₂fixation potential. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.* 45: 179-184.
- Schank, S.C., K.L. Weier y I.C. Macrae. 1981. Plant yield and nitrogen content of a digitgrass in response to *Azospirillum* inoculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 342-345.
- Schlöter, M., B. Assmus y A. Hartmann. 1995. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotechnol. Adv.* 13: 75-90.
- Schlöter, M., W. Bode, A. Hartmann y F. Beese. 1992. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biol. Biochem.* 24: 399-403.
- Schmidt, W., P. Martin, S.H. Omay y F. Bangerth. 1988. Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In: *Azospirillum IV: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 92-100.
- Schroder, M. 1932. Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg. Abt 2*, 85: 177-212.
- Shah, S., V. Karkhanis y A. Desai. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum*. *Curr. Microbiol.* 25: 347-351.
- Singh, C.S. 1992a. Prevalence of *Azospirillum* within the stem nodules of *Aeschynomene* spp. and *Neptunia* sp. *Z. Mikrobiol.* 147: 455-458.
- Singh, C.S. 1992b. Mass inoculum production of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizae. 1. Selection of host in the presence of *Azospirillum brasilense*. *Zentralblatt fuer Microbiologie* 147: 447-453.
- Singh, C.S., J.S. Amawate, S.P. Tyagi y A. Kapoor. 1990. Interaction effect of *Glomus fasciculatum* and *Azospirillum brasilense* on yields of various genotypes of wheat (*Triticum aestivum*) in pots. *Z. Mikrobiol.* 145: 203-208.
- Skorupska, A., M. Brzezinska, A. Choma, D. Kulinska y Z. Lokiewicz. 1985. Physiological characterization, plasmids and bacteriocinogenicity of *Azospirillum*. *Microbios* 44: 243-251.
- Smith, R.L., S.C. Schank y R.C. Littell. 1984a. The influence of shading on associative N₂ fixation. *Plant Soil* 80: 43-52.
- Smith, R.L., S.C. Schank, J.R. Milam y A.A. Baltensperger. 1984b. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1331-1336.
- Sriskandarajah, S., I.R. Kennedy, D. Yu y Y. T. Tchan. 1993. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant Soil* 153: 165-178.
- Stancheva, I., I. Dimitrov, N. Kaloyanova, A. Dimitrova y M. Angelov. 1992. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. *Agronomie* 12: 319-324.
- Stancheva, I. y N. Dinev. 1992. Effects of inoculation of maize and species of *Tribe triticeae* with *Azospirillum brasilense*. *J. Plant Physiol.* 140: 550-552.
- Stein, T., J. Ueckert y I. Fendrik. 1995. Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of Kallar grass using alginate-coated seeds in Mixed inoculation. In: *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 240-243.
- Strzelczyk, E., M. Kampert y C.Y. Li. 1994a. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149: 55-60.
- Strzelczyk, E., M. Kampert, H. Rozycki y C.Y. Li. 1994b. Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum* sp. in media with different carbon sources. *Acta microbiol. Polonica* 43: 89-95.
- Subba Rao, N.S., K.V.B.R. Tilak y C.S. Singh. 1985a. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. *Soil Biol. Biochem.* 17: 119-121.
- Subba Rao, N.S., K.V.B.R. Tilak y C.S. Singh. 1985b. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil* 84: 283-286.
- Sukiman, H.I. y P.B. New. 1990. Relationship between root colonization and initial adsorption of *Azospirillum* to plant roots. *Microbial Ecology* 20: 65-74.
- Sundaram, S., A. Arunakumari y R.V. Klucas. 1988. Characterization of azospirilla isolated from seeds and roots of turf grass. *Can. J. Microbiol.* 34: 212-217.

- Tabary, F., J. Balandreau y R. Bourrillon. Purification of the rice embryo lectin and its binding to nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 549-555.
- Tal, S. y Y. Okon. 1985. Production of the reserve material poly-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31: 608-613.
- Tapia-Hernández, A., M.A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64: 73-83.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. And *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Tien, T.M., H.G. Diem, M.H. Gaskins y D.H. Hubbell. 1981. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 27: 426-431.
- Tien, T.M., M.H. Gaskins y D.H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-1024.
- Tilak, K.V.B.R. y A. Dwivedi. 1990. Enhancement of spore germination of *Glomus fasciculatum* by bacterial cell free extracts. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 373-375.
- Tyler, M.E., J.R. Milam, R.L. Smith, S.C. Schank y D.A. Zuberer. 1979. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol.* 25: 693-697.
- Ueckert, J., J. Döbereiner, I. Fendrik y E.G. Niemann. 1991. Nitrate reductase activity of *Azospirillum brasilense* SP7 and SP245 V- and C-forms in continuous culture. *Dev. Plant Soil Sci.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 48: 249-253.
- Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins y F.B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
- Umali-Garcia, M., D.H. Hubbell, M.H. Gaskins y F.B. Dazzo. 1981. Adsorption and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots. In: *Associative N₂-fixation*. P.B. Vose y A.P. Ruschel (Eds). Vol. 1. CRC Press, Boca Raton. pp. 49-62.
- Vandebroek, A. y J. Vanderleyden. 1995. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association - Review. *Critical Rev. Plant Sci.* 14: 445-466.
- Vandenhove, H., R. Merckx, M. van Steenberghe y K. Vlassak. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 513-519.
- Veeraswamy, J., T. Padmavathi y K. Venkateswarlu. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. *Indian J. Microbiol.* 32: 305-308.
- Venkateswarlu, B. y A.V. Rao. 1983. Response of pearl millet to inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil.* 74: 379-386.
- Villareal-Romero, M. 1990. Efecto de la doble inoculación *Azospirillum* sp. endomicorriza (V-A) en la producción de trigo (*Triticum aestivum*, L.) Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México.
- Wani, S.P., S. Chandrapalaiah y P.J. Dart. 1985. Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. *Expl. Agric.* 21: 175-182.
- Warembourg, F.R., R. Dreesen, K. Vlassak y F. Lafont. 1987. Peculiar effect of *Azospirillum* inoculation on growth and nitrogen balance of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Biol. Fertil Soils* 4: 55-59.
- Watanabe, I. y C. Lin. 1984. Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30: 117-124.
- Whallon, J.H., G.F. Acker y H. El-khawas. 1985. Electron microscopy of young wheat roots inoculated with *Azospirillum*. In: *Azospirillum III: Genetics, physiology, ecology*. W. Klingmüller (Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 223-229.
- Wong, P.P., N.E. Stenberg y L. Edgar. 1980. Characterization of a bacterium of the genus *Azospirillum* from cellulolytic nitrogen-fixing mixed cultures. *Can. J. Microbiol.* 26: 291-296.
- Yadav, K., V. Prasad, K. Mandal y N. Ahmad. 1992. Effect of co-inoculation (*Azospirillum* and *Rhizobium* strains) on nodulation, yield, nutrient uptake and quality of lentil in calcareous soil [*Lens culinaris*]. *LENS-Newsletter* 19: 29-31.
- Yahalom, E., A. Dovrat, Y. Okon, y H. Czosnek. 1991. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymorpha* L.). *Isr. J. Bot.* 40: 155-164.
- Yahalom, E., Y. Kapulnik y Y. Okon. 1984. Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* 82: 77-85.
- Yahalom, E., Y. Okon y A. Dovrat. 1987. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Can. J. Microbiol.* 33: 510-514.
- Yahalom, E., Y. Okon y A. Dovrat. 1990. Possible mode of action of *Azospirillum brasilense* strain Cd on the root morphology and nodule formation in burr medic (*Medicago polymorpha*). *Can. J. Microbiol.* 36: 10-14.
- Yu, D.G., I.R. Kennedy y Y.T. Tchan. 1993. Verification of nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) in *Azospirillum* populated, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induced, root structure of wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 187-195.
- Zaady, E. y Y. Okon. 1990. Cultural conditions affecting *Azospirillum brasilense* cell aggregation and adsorption to maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1103-1107.
- Zaady, E., Y. Okon y A. Perevolotsky. 1994. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Range Manag.* 47: 12-15.
- Zaady, E., A. Perevolotsky y Y. Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. *Soil Biol. Biochem.* 25: 819-823.
- Zamudio, M. y F. Bastarrachea. 1994. Adhesiveness and root hair deformation capacity of *Azospirillum* strains for wheat seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 26: 791-797.

- Zeman, A.M.M., Y.T. Tchan, C. Elmerich y I.R. Kennedy. 1992. Nitrogenase activity in wheat seedlings bearing para-nodules induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and inoculated with *Azospirillum*. *Res. Microbiol.* 143: 847-855.
- Zhulin, I.B. y J.P. Armitage. 1992. The role of taxis in the ecology of *Azospirillum*. *Symbiosis* 13: 199-206.
- Zhulin, I.B. y J.P. Armitage. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 175: 952-958.
- Zhulin, I.B., L.E. Sarmiento y B.L. Taylor. 1995. Changes in membrane potential upon chemotactic stimulation of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum VI* and related microorganisms, genetics-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Vol. G37: 299-305.
- Zimmer, W., C. Aparicio y C. Elmerich. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*; identification and sequencing of a trpGDC cluster. *Mol. Gen. Genet.* 229: 41-51.
- Zimmer, W., K. Roeben y H. Bothe. 1988. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta* 176: 333-342.
- Zuberer, D.A. y M. Roth. 1982. *In vitro* inhibition of nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria by rhizosphere actinomycetes associated with grasses. *Can. J. Microbiol.* 28: 705-709.
-