

BIOFERTILIZACIÓN CON *Azospirillum brasilense* EN SORGO, EN EL NORTE DE MÉXICO*

Azospirillum brasilense BIOFERTILIZATION IN SORGHUM AT NORTHERN MEXICO

Jesús Gerardo García-Olivares^{1§}, Víctor Ricardo Moreno-Medina¹, Isabel Cristina Rodríguez-Luna¹, Alberto Mendoza-Herrera¹ y Netzahualcóyotl Mayek-Pérez¹

¹Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro esq. Elias Piña s/n, Col. Narciso Mendoza. 88710, Reynosa, Tamaulipas, México. [§]Autor para correspondencia: jggarcia@ipn.mx

RESUMEN

Durante 2002-2004 se realizó este estudio cuyo objetivo fue evaluar tres cepas de *Azospirillum brasilense* (CBG-497, CBG-180 y CBG-181), nativas del norte de Tamaulipas, México, para caracterizarlas en laboratorio y determinar su capacidad de producir biomasa y grano de sorgo en condiciones de invernadero y campo. La cepa CBG-497 produjo mayor cantidad de ácido indol-acético *in vitro* que las cepas CBG-180 y CBG-181. En invernadero, también las plantas inoculadas con CBG-497 incrementaron significativamente la producción de biomasa (50%), en comparación con las del testigo no inoculado, mientras que las CBG-180 y CBG-181 incrementaron la biomasa en 12 y 22%, respectivamente. En campo los tratamientos inoculados tuvieron un rendimiento promedio de grano en sorgo de 13 y 17% mayor que el testigo no inoculado en 2002-2003 y 2003-2004, respectivamente; y las cepas CBG-180 y CBG-181 incrementaron el rendimiento en mayor proporción respecto al testigo (13 a 27%), en comparación con CBG-497 (10% a 12%). Los resultados indican que la aplicación de biofertilizantes con base en cepas nativas de *A. brasilense*, incrementaron el rendimiento del sorgo.

Palabras clave: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, ácido 3-indol-acético, biofertilizantes, rendimiento de grano.

ABSTRACT

During 2002 to 2004 a study was carried out with the aim of evaluating three strains of *Azospirillum brasilense* (CBG-497, CBG-180 and CBG-181), native from the northern region of Tamaulipas, Mexico. Strains were characterized in a laboratory and tested for biomass and grain production in sorghum grown in the greenhouse and under field conditions. *In vitro*, strain CBG-497 produced a higher amount of indol acetic acid than CBG-180 and CBG-181. In the greenhouse, plants inoculated with CBG-497 significantly ($p<0.05$) increased biomass accumulation (50%) in comparison with the non-inoculated check, whereas CBG-180 and CBG-181 increased biomass by 12 and 22% respectively. In the field inoculated treatments had an average yield increase over the checks of 13 and 17% in 2002-2003 and 2003-2004, respectively, and strains CBG-180 and 181 increased the seed yield in a larger proportion (13 to 27%), in comparison to CBG-497 (10 to 12%). Results indicated that the inoculation with native strains of *A. brasilense* increased grain yield in sorghum.

Key words: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, biofertilizers, grain yield, 3-indol-acetic acid.

* Recibido: Abril de 2005

Aceptado: Abril de 2006

INTRODUCCIÓN

En el estado de Tamaulipas, México, durante 2004 se sembraron alrededor de 800 000 ha con sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], cuya producción promedio de grano fue de 3.7 t ha⁻¹ (SIAP, 2005). La mayor parte de dicha superficie se estableció en condiciones de temporal en el norte del estado, región caracterizada por la prevalencia de altas temperaturas, escasa y errática precipitación pluvial, y altos índices de salinidad del suelo (SEDESOL, 1995). Para obtener rendimientos aceptables, el sorgo requiere cantidades importantes de fertilizantes químicos; sin embargo, su alto costo impacta negativamente en la rentabilidad del mismo; además incrementa el problema de la salinidad, debido a las características químicas de sus suelos. Una alternativa al uso de los fertilizantes químicos son los microorganismos promotores del crecimiento denominados: “bioestimulantes”, “biofertilizantes” o “inoculantes”.

Los microorganismos más utilizados son las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*, así como hongos micorrícicos del género *Glomus*, que generalmente provenientes de otras regiones, lo que limita a los agricultores locales. Así, los estudios sobre la adaptación y eficiencia biofertilizante de nuevas cepas deberán conducirse en las regiones donde se utilizarán recurrentemente. La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como: maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Vivieni *et al.*, 2004).

A partir del 2000, en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional se han aislado y caracterizado cepas de *A. brasilense*, nativas del norte de Tamaulipas, y se ha determinado su potencial biofertilizante en condiciones controladas de invernadero. Sin embargo, es necesario evaluar su potencial bioestimulante en cultivos de importancia económica bajo condiciones de campo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial biofertilizante en sorgo de tres cepas de *A. brasilense* nativas del norte de Tamaulipas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aislamientos de *Azospirillum brasilense*

Durante el otoño-invierno de 1999-2000 se realizaron colectas de suelos cultivados con maíz en los municipios de Díaz Ordaz y Río Bravo, Tamaulipas, México (26° 13' LN, 98° 35' LO y 40 msnm), sitios de suelos con textura franco-arcillosa y franco-arenosa, respectivamente, contenido de materia orgánica menor a 1% y pH de 7.8.

A. brasilense se aisló en medio de cultivo PY (peptona 0.5%, extracto de levadura 0.3%, CaCl₂ 0.007 M), adicionado con 20 µg mL⁻¹ de ácido nalidixico y 10 µg mL⁻¹ de tetraciclina (Caballero-Mellado *et al.*, 1992). Lugo *et al.* (2001), identificaron los aislamientos fijadores de N en el medio NFB (5 g de ácido málico y malato de sodio, 5 mL de K₂HPO₄ 10%, 2 mL de MgSO₄ 7H₂O 10%, 1 mL de NaCl 10%, 2 mL de CaCl₂ 1%, 2 mL de NaMoO₄ 2H₂O 1%, 1 mL de MnSO₄ 2H₂O 1%, 2 mL de azul de bromotimol 5%, 0.4 g de FeSO₄ 7H₂O, 4 g de KOH, 0.8 mL de NH₄NO₃ 10 mM, 1 mL de Biotina y Piridoxal, y 33 g de dextrana), mientras que la capacidad para producir sideróforos se determinó con el método cromozurol (Schwyn y Neilands, 1987).

Caracterización *in vitro* de cepas de *A. brasilense*

Las cepas aisladas se desarrollaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) adicionado con triptófano (0.1 g L⁻¹) y se incubaron a 29 °C y 200 rpm de agitación constante. Se tomaron muestras del cultivo a las 24, 48 y 72 h en incubación y se centrifugaron a 1942 g por 30 min, en cada una se determinó la concentración de ácido 3-indol-acético (AIA) y triptófano por cromatografía de líquidos (HPLC, High Pressure Liquid Chromatograph, Hewlett Packard modelo 1100). Para la separación se utilizó una columna RP-18 (Beckman Ultrasphere) de 150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil consistió en acetonitrilo-fosfatos 30/70 y detector de muestras de 20 mL de volumen de inyección, ajustado a 220 nm de longitud de onda. El equipo se calibró con la mezcla de estándares triptófano, AIA y ácido-indol-butírico (IBA) (Sigma-Aldrich Co., San Luis, Missouri, EUA), cuyos tiempos de retención

fueron de 2.6, 6.4, y 15 min, respectivamente. El análisis se realizó por triplicado y se determinó la media y el error estándar de cada tratamiento (cepa), en cada tiempo de muestreo.

Efecto de *A. brasilense* en sorgo

Experimento en invernadero. El experimento se llevó a cabo en un invernadero del Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Reynosa, Tamaulipas, durante el ciclo otoño-invierno de 2004, en charolas de plástico de 38 orificios en sustrato de turba (Redi Earh Scott[®]) con pH 6.8. Se inoculó con la aplicación de 1 mL de cultivo bacteriano, cultivado en medio líquido PY (Döbereiner *et al.*, 1976) y suplementado con CaCl₂ 0.04%, durante 48 h a 32 °C y 200 rpm de agitación constante. Al momento de aplicarse, cada muestra tenía 1x10⁸ unidades formadoras de colonia (ufc) mL⁻¹. Al testigo se le aplicó agua destilada estéril. Se utilizó el híbrido comercial de sorgo DK-54 (Dekalb[®]). Se empleó un diseño experimental completamente al azar, con 16 repeticiones y la unidad experimental fue de dos plantas. A los 7, 12, 15 y 23 días después de la siembra se cortó la parte aérea de las plantas de cuatro repeticiones, mismas que se secaron en estufa a 60 °C por 48 h. Se calcularon las medias y el error estándar para cada uno de los tratamientos en cada fecha de corte.

Experimento en campo. El estudio se realizó en condiciones de temporal durante los ciclos otoño-invierno de 2002-2003 y 2003-2004 en la localidad de Villa Cárdenas, Matamoros, Tamaulipas (97° 49' LN; 25° 55' LO y 11 msnm), donde el suelo tiene textura franco-limosa, pH de 8.1, conductividad eléctrica de 0.5 mmhos cm⁻¹ a 25 °C, contenido de materia orgánica de 1.4% y altos contenidos de N inorgánico (NO₃) (11.5 ppm), P (P₂O₅) (11.5 ppm) y K (550 ppm). Durante el desarrollo de los experimentos, se registraron temperaturas medias de 22.3 °C (2002-2003) y 21.8 °C (2003-2004), con una precipitación pluvial total de 164 mm (2002-2003) y de 429 mm (2003-2004).

Las cepas se cultivaron en 250 mL de medio líquido PY, suplementado con CaCl₂ 0.04% a 32 °C por 48 h y 200 rpm de agitación. Posteriormente, los cultivos se

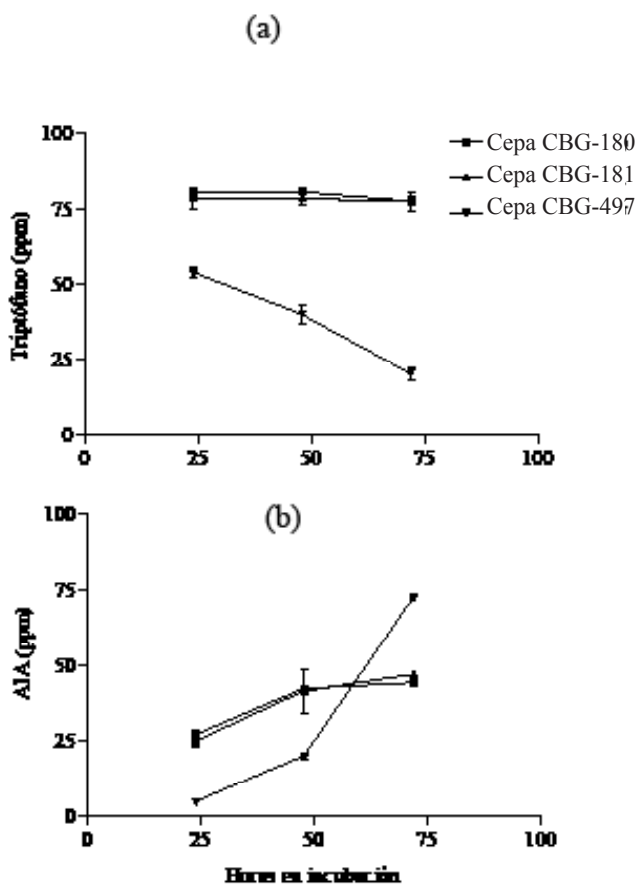
mezclaron con 500 g de turba estéril (Redi Earh Scott[®]) con pH 6.8. Las mezclas se incubaron por siete días a 32 °C en bolsas de polietileno, bajo condiciones asépticas. Antes de sembrarse, la semilla se mezcló con el inóculo (1 kg de inóculo por 14 kg de semilla, 6x10⁷ ufc por semilla) y se agregó solución acuosa de goma arábiga 20% (40 mL kg⁻¹ de semilla) como adherente. La semilla inoculada y sin inocular se sembró inmediatamente después de la inoculación.

Los tratamientos (cepas de *A. brasilense*) se establecieron en parcelas de 24 surcos de 20 m de largo, y separados entre sí a 0.86 m, con una densidad de siembra de 220 000 plantas/ha. Al testigo no se le aplicó bacteria ni fertilización química, ya que en el norte de Tamaulipas es común no fertilizar el sorgo en condiciones de temporal. En cada parcela se tomaron cinco muestras de plantas a la cosecha, a partir de cinco surcos de 8 m de largo (34.4 m²) y se determinó el rendimiento de grano al 14% de humedad, expresado en toneladas por hectárea. Se calcularon las medias y el error estándar para cada tratamiento y experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización *in vitro* de cepas de *A. brasilense*

Las cepas CBG-180 y CBG-181 presentaron menor producción de triptófano, precursor del AIA en *A. brasilense* (Van de Broek *et al.*, 1999), que CBG-497 a las 24, 48 y 72 h en incubación; mientras esta última presentó la mayor producción de AIA (Figura 1). La relación directa entre la asimilación de triptófano y la producción de AIA en *A. brasilense* fue observada por Khawas y Adachi (1999) y Martínez-Morales *et al.* (2003). Lo mismo ocurre en otras especies de *Azospirillum* (Han y New, 1998; Holguin *et al.*, 1999) y en otras bacterias tales como *Rhizobium meliloti*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas syringae* pv. *fluorescens* y *Agrobacterium tumefaciens* (Caballero-Mellado, 1999; Zakharova *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2000). La producción de altas cantidades de AIA *in vitro* es un parámetro apropiado en la selección de mejores cepas nativas de *A. brasilense*, para producir biofertilizantes de plantas cultivadas (Van de Broek *et al.*, 1999).



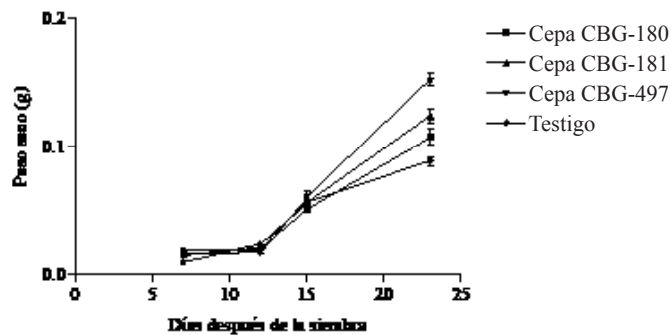
Las líneas verticales indican \pm error estándar.

Figura 1. Utilización de triptófano (a) y producción de ácido indolacético (b) en cepas de *Azospirillum brasilense* a diferentes horas de incubación.

Efecto de *A. brasilense* en sorgo en invernadero y en campo

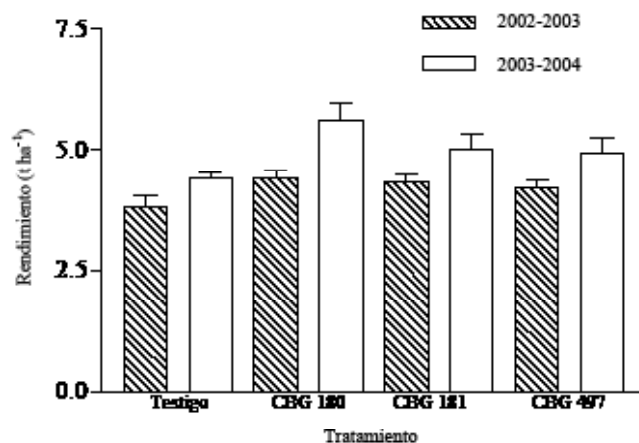
La inoculación con *A. brasilense* incrementó la producción de biomasa en sorgo a los 23 días después de la siembra, en comparación al testigo, y CBG-497 promovió la mayor producción de biomasa (Figura 2). En campo, las tres cepas incrementaron el rendimiento de grano en 500 kg ha⁻¹ en 2002-2003 y en más de 700 kg ha⁻¹ en 2003-2004 (Figura 3). Varios autores han reportado incrementos en el rendimiento en cultivos como maíz (*Zea mays* L.) (O'Hara *et al.*, 1981; Okon y Labandera-González, 1994; Bashan *et al.*, 1996; Fallik y Okon, 1997; Döbbelaere *et al.*, 2002; Holguin *et al.*, 2003; Irizar *et al.*, 2003; Aguirre-Medina, 2004), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Burdman *et al.*, 1996), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Döbbelaere *et al.*, 2002), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), haba (*Vicia faba*

L.) (Hamaoui *et al.*, 2001) pastos (*Setaria italica*) (Fallik y Okon, 1997) y sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] (Martínez-Medina *et al.*, 2004).



Las líneas verticales indican \pm error estándar.

Figura 2. Producción de materia seca del híbrido de sorgo DK-52 inoculado con cepas de *Azospirillum brasilense* en invernadero. Reynosa, Tamaulipas, México. 2004.



Las líneas verticales indican \pm error estándar.

Figura 3. Rendimiento de grano del híbrido de sorgo DK-52 inoculado con diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* en Villa Cárdenas, Matamoros, Tamaulipas, durante dos ciclos de cultivo (2002-2003 y 2003-2004).

Contrario a lo observado en invernadero, en el campo las cepas CBG-180 y CBG-181 incrementaron el rendimiento de grano respecto al testigo en 21.5% y 13.4%, respectivamente (Figura 3). La cepa CBG-497 ocasionó los mayores incrementos en la acumulación de biomasa en sorgo, cultivado en invernadero, lo que

probablemente se asocia con la mayor producción de AIA; resultados similares han sido reportados por Sumner (1990); Okon y Labandera-González (1994); Bashan y Holguin (1997) y Döbbelaere *et al.* (2002).

En general, la producción de grano fue mayor en 2003-2004 debido a que la precipitación pluvial fue mayor al ciclo anterior en 162%. Los resultados de este trabajo concuerdan con los de Okon *et al.* (1976), Levanony y Bashan (1991), Kanungo *et al.* (1997), Bashan (1998), Díaz-Franco *et al.* (2004) y Pecina-Quintero *et al.* (2005), quienes reportaron la interacción positiva entre el desarrollo y colonización de *A. brasilense* y el contenido de humedad en el suelo. Las cepas CBG-180 y CBG-181 alcanzaron los mayores incrementos en la producción de grano, en comparación con el testigo. Las diferencias entre cepas, respecto a la producción de la biomasa o grano, se deben principalmente al efecto de las condiciones ambientales variables en la colonización de cada cepa de forma específica (Pecina-Quintero *et al.*, 2004; 2005).

Las cepas CBG-180 y CBG-181 se aislaron de suelos franco-arenosos de Río Bravo, mientras que la cepa CBG-497 se aisló en Díaz Ordaz de suelos franco-arcillosos. Las condiciones del suelo del sitio de prueba [características físico-químicas del suelo, poblaciones nativas de *A. brasilense* y clima (Pecina-Quintero *et al.*, 2005)], probablemente favorecieron el efecto promotor del crecimiento vegetal en CBG-180 y CBG-181.

Los efectos positivos de *A. brasilense* en diversos cultivos se atribuyen principalmente al mejoramiento en el desarrollo de la raíz y al incremento subsecuente en el hospedante de la tasa de asimilación de agua y la utilización de minerales del suelo (Fallik y Okon, 1996; Burdman *et al.*, 1997; Hamaoui *et al.*, 2001; Döbbelaere *et al.*, 2002). La inoculación con *A. brasilense* ha incrementado los rendimientos de grano de cereales en condiciones de campo (mayores al 30%), así como el crecimiento y la acumulación de biomasa en invernadero para diversas especies de plantas (Sumner, 1990; Okon y Labandera-González, 1994).

A pesar de los resultados positivos, la inoculación con *A. brasilense* se asocia aún con la inconsistencia (Ramírez y Luna, 1995; Pecina-Quintero *et al.*, 2005), lo que restringe su desarrollo como inóculo comercial

en gran escala (Bashan y Holguin, 1997). Los factores responsables de tales irregularidades son difíciles de identificar, pero generalmente se atribuyen a lo variable de las condiciones ecológicas y ambientales, tales como físico y químicas del suelo, presencia de microorganismos en la rizósfera, genotipo del hospedante o la capacidad de la bacteria para establecerse y competir con la microflora nativa (Okon y Labandera-González, 1994; Ramírez y Luna, 1995; Döbbelaere *et al.*, 2002; Pecina-Quintero *et al.*, 2005). Las características básicas de la interacción *A. brasilense*-raíces y los diferentes parámetros críticos para obtener la inoculación exitosa, pueden mejorar la eficacia de los inóculos basados en *A. brasilense* bajo condiciones ambientales y del suelo variables, y de esta forma, estimular su utilización comercial en la producción agrícola en campo (Bashan y Holguin, 1997).

CONCLUSIONES

La cepa CBG-497 de *A. brasilense* logró los mayores incrementos en la producción de biomasa de sorgo en invernadero debido a su mayor producción de AIA.

Las cepas de *A. brasilense* nativas del norte de Tamaulipas incrementaron la producción de biomasa y el rendimiento de grano en sorgo.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo lo financió el Instituto Politécnico Nacional y su publicación el Fondo Mixto del Estado de Tamaulipas (Proyecto TAMPS-2003-C03-06).

LITERATURA CITADA

Aguirre-Medina, J. F. 2004. Biofertilizantes microbianos: Antecedentes del programa y resultados de validación en México. *In*: Díaz-Franco, A.; Mayek-Pérez, N; Mendoza, A. y Maldonado-Moreno, N. (eds.). Memoria del Simposio de Biofertilización. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tamaulipas, México. p. 71-87.

- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16(4): 729-770.
- Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). *J. Microbiol.* 43(2):103-121.
- Bashan, Y.; Holguin, G. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos *Azospirillum*. *Terra* 14(2):159-183.
- Burdman, S.; Kigel, J. and Okon, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* 29(5/6):923-929.
- Caballero-Mellado, J.; Carcaño-Montiel, M. G. and Mascarúa-Esparza, M. A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13(1-3):243-253.
- Caballero-Mellado, J.; López-Reyes, L. and Bustillos-Cristales, R. 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178(2):283-288.
- Döbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Okon, Y. and Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils* 36(4):284-297.
- Döbereiner, J.; Marriel, I. E. and Nery, L. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Microbiology* 22(10):1464-1473.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996. Inoculations of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28(1):123-126.
- Hamaoui, B.; Abbadi, J. M.; Burdman, S.; Rashid, A.; Sarig, S. and Okon, Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21(6-7):553-560.
- Han, S. O. and New, P. B. 1998. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbiol. Ecol.* 36(2):193-201.
- Holguin, G.; Patten, C. L. and Glick, B. R. 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fertil. Soils* 29(1):10-23.
- Holguin, G.; Bashan, Y.; Puente, E.; Carrillo, A.; Bethlenfalvay, G.; Rojas, A.; Vázquez, P.; Toledo, G.; Bacilio J., M.; Glick, B. R.; González de B., L.; Lebsky, V.; Moreno, M. y Hernández, J. P. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agric. Téc. Méx.* 29(2):201-211.
- Irizar G., M. B.; Vargas V., P.; Garza G., D.; Tut C., C.; Rojas M., I.; Trujillo C., A.; García S., R.; Aguirre M., D.; Martínez G., J. C.; Alvarado M., S.; Grageda C., O.; Valero G., J. and Aguirre M., J. F. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la Región Central de México. *Agric. Téc. Méx.* 29(2):213-225.
- Kanungo, P. K.; Ramakrishnan, B. and Rajaramamohan-Rao, B. 1997. Placement effects of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils. *Biol. Fertil. Soils* 25(2):103-108.
- Khawas, H. and Adachi, K. 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol. Fertil. Soils* 28(4):377-381.
- Levanony, H. and Bashan, Y. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. *Plant and Soil* 137(1):91-97.
- Lugo, B.; García, J.; Mendoza, A. y Barrera-Saldaña, H. 2001. Variabilidad simbiótica de cepas nativas de *Azospirillum* spp. en maíz y sorgo en zonas áridas del norte de Tam. *In:* García-Garibay, M. y Gutiérrez-López, G. (comps.). *Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Veracruz, México. Resumen CIV-31.
- Martínez-Medina, J. 2004. Respuesta de la biofertilización en el crecimiento y rendimiento de sorgo de grano en Linares, Nuevo León. *In:* Díaz-Franco, A.; Mayek-Pérez, N.; Mendoza, A. y Maldonado-Moreno, N. (eds.). *Memoria del Simposio de Biofertilización*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tamaulipas, México. p. 42-52.
- Martínez-Morales, L. J.; Soto-Urzúa, L.; Baca, B. E. and Sánchez, J. A. 2003. Indole-3-butyric acid

- (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 228(2):167-173.
- O'Hara, G. W.; Davey, M. R. and Lucas, J. A. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. Can. J. Microbiol. 27(9):871-877.
- Okon, Y. and Labandera-González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years' worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26(12):1591-1601.
- Okon, Y.; Albrecht, S. I. and Burris, R. H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 127(3):1248-1254.
- Pecina-Quintero, V.; Díaz-Franco, A.; Garza-Cano, I. y Magallanes-Estala, A. 2004. Respuesta del maíz y sorgo a la fertilización biológica. In: Díaz-Franco, A.; Mayek-Pérez, N.; Mendoza, A. y Maldonado-Moreno, N. (eds.). Memoria del Simposio de Biofertilización. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tamaulipas, México. p. 94.
- Pecina-Quintero, V.; Díaz-Franco, A.; Williams-Alanís, H.; Rosales-Robles, E. y Garza-Cano, I. 2005. Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en sorgo. Rev. Fitotec. Mex. 28(4):389-392.
- Ramírez, G. R. y Luna, B. M. 1995. Simbiosis asociativas. In: Ferrera-Cerrato, R. y Pérez M., J. (eds.). Agromicrobiología. Elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. p. 143-165.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160(1):47-56.
- Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). 1995. Proyecto de ordenamiento ecológico de la Región Fronteriza Norte. Estudio técnico SEDESOL-Instituto Nacional de Ecología. 55 p.
- Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2005. SIACON 1980-2004: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea] Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comanuar.html.
- Sumner, M. E. 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. In: Stewart, B. A. (ed.). Advances in Soil Sciences. Springer. Berlin. p. 53-123.
- Van de Broek, A.; Lambrecht, M.; Eggermont, K. and Vanderleyden, L. J. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 181(4):1338-1342.
- Vázquez, M. M.; César, S.; Azcón, R. and Barea, J. M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Appl. Soil Ecol. 15(3):261-272.
- Vivienne, N.; Matiru, F. D. and Dakora, S. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. Afr. J. Biotechnol. 3(1):1-7.
- Zakharova, E. A.; Alexander, A.; Shcherbakov, V.; Brudnik, V.; Nataliya, G.; Skripko, S. N.; Bulkhin, B. and Ignatov, V. I. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Eur. J. Biochem. 259(3):572-576.