

RESPUESTA A LA INOCULACION DE TRIGO CON *AZOSPIRILLUM* EN LA ZONA SEMIARIDA. TRES AÑOS DE ENSAYOS A CAMPO.

G. Pozzo Ardizzi¹ ; H. Giorgetti² ; B. Martinez^{1,3} ; F. Margiotta³
 G. Aschkar¹ ; S. Polo² ; Montenegro¹ ; N. Cifone¹.

- 1- Centro Universitario Regional Zona Atlántica- C.U.R.Z.A. Universidad Nacional del Comahue- cc 149- Viedma- Rio Negro.
- 2- Estación Experimental Patagones- Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.
- 3- IDEVI - Viedma - Rio Negro.

RESUMEN

Varios experimentos se realizaron durante tres años (87-88-89) en suelos del partido de Patagones (condiciones áridas). Catorce genotipos de trigo fueron probados para observar su respuesta en rendimiento a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. Sólo seis cultivares respondieron con incrementos significativos de 18 a 54%. Cinco cultivares fueron seleccionados e inoculados con varias cepas de *Azospirillum* y sus respuestas en rendimiento se compararon con controles no inoculados. Los incrementos en rendimiento en grano, obtenidos por inoculación con cepas nativas alcanzaron significancia de un 60% ; con las cepas brasileñas llegaron a un 30% pero no fueron significativas. La aplicación de 60 Kg N/ha produjo incrementos inferiores a lo obtenidos por inoculación con cepas nativas. La cepa sp 111 mostró la mejor asociación con raíces, multiplicándose y formando agregados sobre la superficie radical, como pudo observarse por microscopía electrónica de barrido en raíces provenientes de los ensayos a campo.

SUMMARY

Several field experiments were conducted during 3 years (87-88-89) in soils from Patagones (arid conditions). Fourteen wheat genotypes were tested for their yield response to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Only six cultivars responded by a significant yield increase of 18 to 54%. Five cultivars were selected and they were inoculated with various strains of *Azospirillum* and their yield response were compared with non inoculated controls. Grain yield increases with native strains were significant and were up to 60%; with Brazilian strains they were up to 30% but were not significant. The application of 60 Kg N/ha produced yields less than inoculation with native strains. Strain sp 111 showed the best establishment within roots where they multiplied and formed aggregates on the root surface as was viewed by Scanning electron microscopy.



INTRODUCCION

Durante los años 87,88 y 89, nuestro grupo de trabajo ha realizado ensayos de inoculación a campo con *Azospirillum* sobre numerosas variedades de trigo de cultivo regional en el partido de Patagones, donde las condiciones climáticas son semiáridas, con escasas precipitaciones y numerosas heladas durante el período de cultivo de trigo. Estas líneas de trigo exhiben una amplia variabilidad respecto a rendimiento y asociación bacteria-raíz.

Los resultados obtenidos en 1987 muestran incrementos que llegan a un 54% en la variedad Cooperación Bahía, 33% en Chasicó Inta, 28% en Buck Manantial, hasta 0% en Buck Pucará, observándose en otras variedades que el rendimiento se deprime respecto al testigo por efecto de la inoculación con *Azospirillum*. (Pozzo Ardizzi et al 1987) Esta respuesta estaría sustentada por el concepto de que el material genético de la planta huésped cumple un importante rol en el establecimiento de una asociación bacteria-raíz satisfactoria y efectiva. Posiblemente debido al estímulo en la producción de sustancias reguladoras de crecimiento que la asociación bacteria-planta provocaría, generando un incremento en el número de pelos radicales, aumentando así la superficie radical y por ende el volumen de suelo explorado por las raíces en busca de agua y nutrientes disponibles. (Morgenstern et al 1987; Kapulnik et al 1988) La información colectada durante los tres años de ensayos a campo se presenta en este trabajo, ella comprende un detalle de parámetros de rendimiento medidos y posteriormente analizados.

Los datos obtenidos como rendimiento en grano y proteína, se analizaron respecto a la asociación efectiva bacteria-raíz, que fue evaluada por recuento de *Azospirillum* en raíz y por observación directa de las características morfológicas de las raíces y la efectiva presencia de *Azospirillum* adherido a ellas mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido SEM, en plantas inoculadas y cultivadas a campo. (Lozano et al)

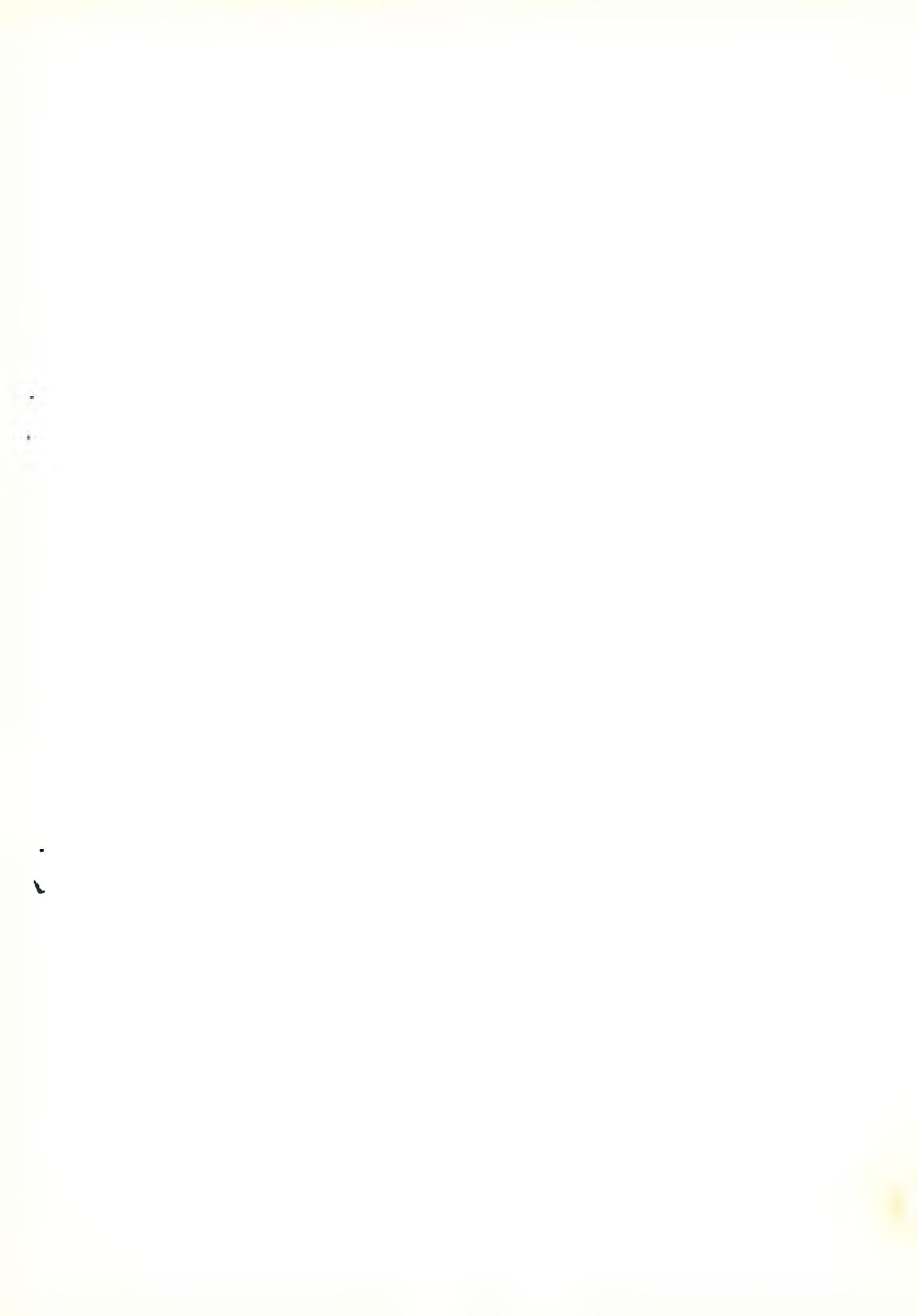
MATERIALES Y METODO

EXPERIENCIAS A CAMPO

Caracterización agroecológica del sitio de ensayos:

Localización: Las experiencias de campo se llevan a cabo en la chacra Experimental de Patagones del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Pcia. de Buenos Aires. Ubicada a 40° 39' Latitud Sur y 62° 54' Longitud Sud Oeste. A 40 metros sobre el nivel del mar.

Clima: Las características climáticas del ciclo 1988 incluyeron frecuentes y rigurosas heladas, desde el mes de mayo a septiembre inclusive; sobre 153 días se registraron 144 días con heladas (94 %) con temperaturas mínimas absolutas de -14,5 C a -21,8 C. Este panorama se completó con la escasez de precipitaciones del período siembra-cosecha donde se registraron 141,5 mm de lluvia que provocó el aborto floral, muerte de macollos y disminución general del tamaño de espigas.



El año 1989, en contraste con el año anterior, se destacó por presentar un invierno más templado con sólo 58 días de heladas y 194 hs. con registros por debajo de los 0,0 C. Esto indica además de baja frecuencia de heladas poca intensidad de las mismas.

La ocurrencia en septiembre de 11 días con heladas y 14 hs. con temperaturas inferiores a 0,0 C y 6 heladas en octubre, con una última ocurrida el 30 de octubre, esto más la situación de stres hídrico provocó como el año anterior aborto florales y muerte de macollos.

El régimen pluviométrico con 257,5 mm, un 22,2 % menor que la media para el partido de Patagones (331,0 mm) pero con una distribución en el año de más del 50 % en el primer semestre que permitió una buena implantación del trigo, aunque una brusca disminución de las precipitaciones en primavera generó severo stress durante la floración del cereal.

Suelos: Los suelos del sector destinado a los ensayos presentan textura franco-arenosa; pH entre 7 y 7,4; Carbono Orgánico promedio de 0,98 %; Nitrógeno promedio de 0,06 % y Fósforo promedio 15 ppm, expresado como P₀ (Bray-Kurtz). La población bacteriana total promedio obtenida por recuento (NMP) en suelo seco al aire se estimó en 1,5 10 u.f.c./g de suelo seco.

El número total de bacterias crecidas en medio libra de nitrógeno (Nfb) fue 2 . 10 u.f.c./g de suelo seco.

Todos estos recuentos fueron realizados en el horizonte superficial (0-20 cm)

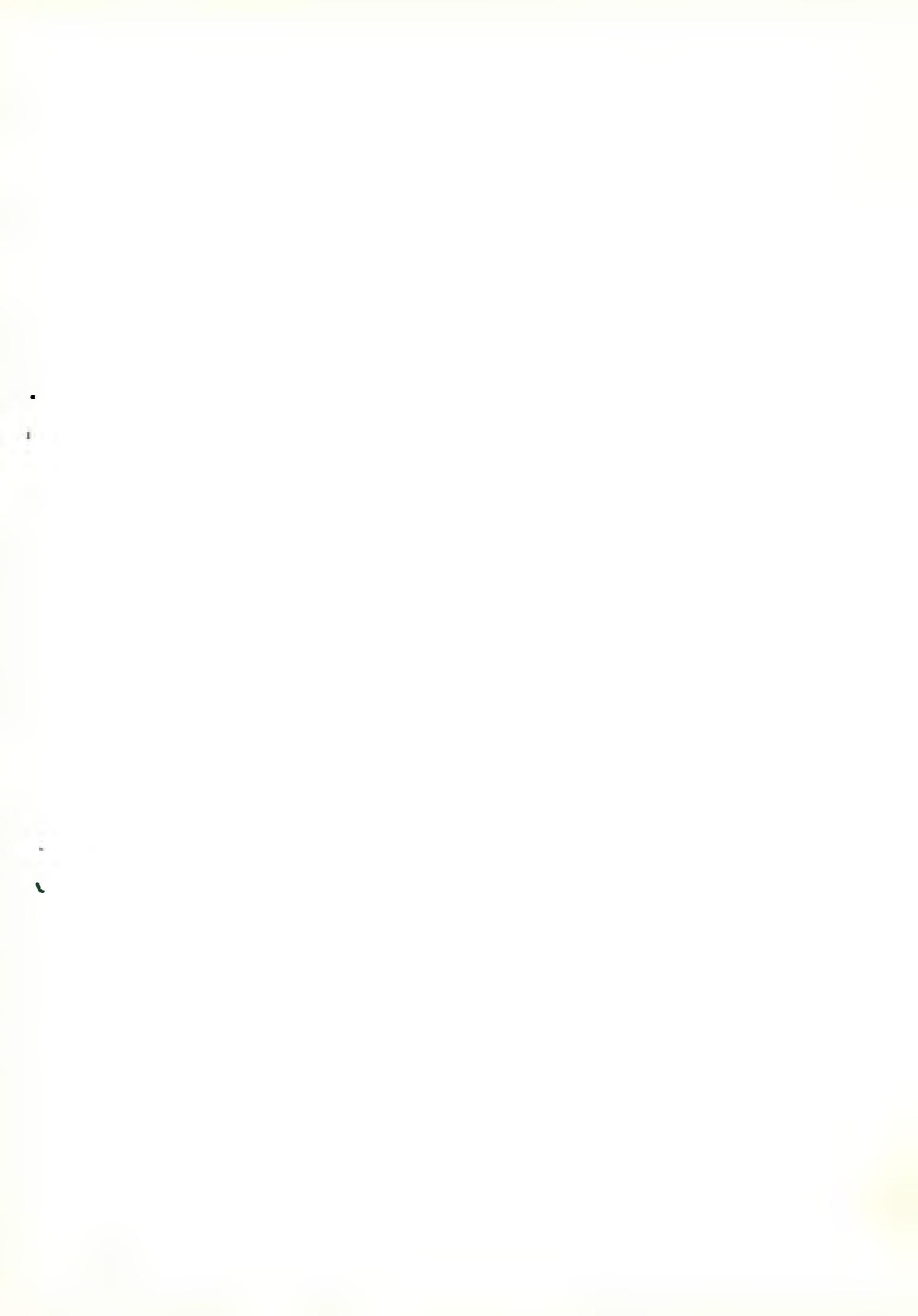
No se detectó presencia de *Aspergillum* nativo en los suelos delimitados para los ensayos.

Antecedentes del lote y tareas culturales:

Ciclo 1988: Los antecedentes de cultivo avena, vicia en 1986 y avena más vicia pastoreada durante 1987. Luego se barbechó a partir de octubre de 1987, con tres pasadas de cultivador de campo hasta el momento de la siembra.

Ciclo 1989: El lote utilizado provenía de trigo año por medio con incorporación del ganado y malezas del suelo en una serie de labores que se iniciaron en febrero del año 1988 con arado de discos múltiples, tareas que se repitió en junio. Luego se hizo el mantenimiento del barbecho con cuatro pasadas de cultivador de campo. En las dos últimas se incorporó un herbicida de pre-siembra, Trifluralina a razón de 0,5 lt/ha, destinado a controlar Avena fatua. Previo a la siembra en ambos ciclos se efectuó un análisis edafológico del sitio de los ensayos.

Análisis de suelos	Año		
	1987	1988	1989
-Ph (1:2,5)	7.4	7.0	7.1
-Carbono organico, Walkley-Black	1.2	0.81	0.93
-Nitrógeno total, Kjeldhial	0.05	0.06	0.08
-Fósforo, Brody-Kurtz	15	16	15
-Textura, Bouyoucos	FA	FA	FA



Ensayos:

Durante los años 1988 y 1989 se realizaron tres tipos de experiencias denominadas Ensayos de Cepas, Red Nacional y Variedades, que se describen a continuación.

***RED NACIONAL:** Este ensayo surge de la discusión de los distintos grupos que componían el proyecto de Fijación no simbiótica de Nitrógeno" a nivel nacional.

El objetivo de esta experiencia fue observar la respuesta a la inoculación con *Azospirillum* en trigo en distintas condiciones agroecológicas.

***ENSAYO de VARIEDADES:** Consistió en la prueba de distintos materiales con el objetivo de seleccionar aquellos que expresen una mayor afinidad a la inoculación con *Azospirillum*.

Para ello se ensayaron catorce variedades de trigo y luego se seleccionaron cinco, se trabajó sobre una parcela principal con subtratamientos de inoculación en parcelas divididas en bloques al azar, con cuatro repeticiones.

***ENSAYO DE CEPAS:** Tiene como objetivo probar la inoculación del trigo con distintas cepas de *Azospirillum*.

La siembra se efectuó el 24 de mayo de 1988, en surco profundo a 25 cm. El trigo utilizado fue Euck Manantial. La densidad de 2 -> siembra alcanzó en ambos ciclos 180 plantas / m (62.4 kg ha) Las parcelas experimentales fueron de 7m x 1,75 m y los tratamientos efectuados sobre un diseño de bloque al azar, con cuatro repeticiones; fueron los siguientes: tres cepas de *Azospirillum brasilense* sp.7, sp.iii y Sp.245, más un control sin inocular.

EXPERIENCIAS EN LABORATORIO

ENSAYOS DE TRIGO INOCULADO EN LABORATORIO:

En frascos Pyrex de 250 cc, se colocaron 150 cc. de suelo extraído del sector donde se realizan los ensayos de campo.

Se esterilizó el suelo en autoclave a 1 atm. de presión durante una hora repitiendo esta operación cuatro veces. Se agregó agua a ese suelo hasta el 50 % de su capacidad de retención de agua, previamente determinado.

Se practicaron cuatro perforaciones por frasco de 1 cm. de diámetro por 3 cm. de profundidad. Se agregó el mismo inoculante usado para los ensayos de campo.

Se introdujo en cada orificio una semilla esteril de trigo variedad Manantial, y se cubrió con tierra. Se mantuvo la humedad al 50 % de la capacidad de retención de agua. Se realizó igual tratamiento para obtener plantas testigos, pero sin agregar inoculante, se colocó igual proporción de turba en el medio de cultivo esteril.

Al mes de sembradas se extrajeron las cuatro plantas de cada frasco, se lavaron para eliminar el suelo rizosférico, se cortaron en trozos de aproximadamente de 1 a 1,5 cm., se mantuvieron sumergidas en FAA (solución fijadora al 5 % de Formol; 5 % de Acido acético glacial y 90 % de alcohol étílico de 96) durante una noche. Luego se lavo con buffer fosfato, (tres veces durante 15 min.)

Se conservó en heladera sumergido en buffer hasta su posterior preparación para la observación con microscopio electrónico de barrido.

Inmediatamente antes de metalizar la muestra se deshidrató con lavados de 15 min. de solución de alcohol étilico de 96 (100 %); luego solución alcohol-acetona (50 % y 50 %) y por último solución de acetona (100 %)

Las raíces se llevaron a punto crítico, se montaron sobre tacos y se metalizaron con oro previa a la observación con microscopio electrónico de barrido.

Se utilizó el Servicio de Microscopia electrónica del Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca. UNS-CONICET. Bajo el asesoramiento y conducción técnica de la profesora Viviana S. de Lozano.

-RECUENTO DE *Asospirillum* EN RAICES: A los 40 días de sembradas las semillas de trigo, inoculadas con una suspensión de *Asospirillum*, se extrajeron plantas por cada parcela, muestreadas al azar. Las plantas se tomaron tratando de extraer completamente la raíz junto con el suelo rizoférico adherido a ellas.

En el laboratorio se separó el suelo de la raíz por lavado bajo canilla, se secaron con papel de filtro, se dejaron al aire por media hora y se pesó 1 gr. de raíces.

Se disgregó la raíz en mortero junto con 9 ml de solución de sacarosa estéril al 40 %. Se efectuaron diluciones y se realizó recuento por NMP, sembrando por cada dilución tres tubos de medio Nfb libre de nitrógeno, específico para *Asospirillum*. Se incubaron a 30 °C durante 48 hs. y se determinó el número de *Asospirillum* por gramo de raíz. En base al número de tubos que acusaron desarrollo positivo y consultando las tablas de Mc. Crady.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ciclo 1987

Los ensayos realizados durante el ciclo 1987 fueron de carácter preliminar, en ellos se analizó la respuesta a la inoculación con *Asospirillum brasilense* (cepa sp 7) obtenido sobre catorce variedades de trigo de interés regional (Tabla I). En estos cultivos se midieron parámetros de rendimiento en parcelas inoculadas vs parcelas testigo sin inocular.

Ciclos 88-89

Los resultados obtenidos durante los ciclos 88 y 89 se presentan en las tablas II, III y IV. Debe aclararse que durante el ciclo 88 las experiencias a campo sufrieron daños por acción de las liebres por cuanto de algunos ensayos solo se obtuvieron resultados parciales, los que fueron usados en forma comparativa con los obtenidos en 1987 y 1989 pero no se presentan en este trabajo.

La tabla II muestra los resultados obtenidos en el ensayo de variedades ciclo 89.



Tabla I: Efecto de la inoculación en trigo (*Triticum aestivum*) con *Asopirillum brasiliense* sp sobre el rendimiento en grano y la producción de proteína.

Asoc.	Rend. en	Proteína (4)	Proteína	Rend. en	Asoc.
grano	[kg/ha]	(%)	[kg/ha]	grano	[kg/ha]
1	814	80613	96113	63112	11
2	954	95413	97113	30133	12
3	656	67813	90112	82	13
4	746	99812	00112	21	14
5	772	91313	38113	701103	15
6	1020	87813	95114	291142	16
7	1050	86413	73113	501144	17
8	598	82014	96114	54	18
9	871	112613	25114	61115	19
10	960	12214	21113	321136	20
11	958	79414	20114	00138	21
12	190	108813	22111	921104	22
13	738	78614	32114	221105	23
14	802	114814	64113	991130	24

Notas: I) Variedades comerciales - Trigos duros; II) Intermedio; III) Intermedio-corto; IV) Intermedio-corto; V) Intermedio-corto.

(2) I: Testigo; II: Inoculado con *A. brasiliense* sp. durante 24 hrs. en suspensión bacteriana; Test. traza: Miento; Gero con agua destilada esteril; recibieron los testigos.

(4) El rendimiento en grano se obtuvo luego de cosechar manualmente todas las parcelas experimentales (5m c/a y se calculó a 1% de humedad. La determinación de nitrógeno proteico en granos se realizó por método instrumental con analizador infra-rojo, método adoptado por la Junta Nacional de Granos Recientes por NMF en medio N16 semisólido, libre de Nitrógeno, sobre raíces lavadas de trigo al momento de cosecha.

- No se observó presencia de *Asopirillum* sp. sin embargo en algunas muestras se observó presencia de *Asoto-bacter* nativo y *Clostridium*.

+ Presencia de *Asopirillum brasiliense* en número hasta 1.10 a u.f.c./gr de raíz.

++ Presencia de *Asopirillum brasiliense* en número de 1.10 a 1.10 u.f.c./gr de raíz.



! Tabla II: Ensayo comparativo de cinco variedades de trigo y su
! respuesta a la inoculación con *Azospirillum brasilense* sp7-
! ciclo 1989.

Variedad	Incremento-Rend. % [Kg/ha] Inoc. vs Testigo	Asociación <i>Azospirillum</i> - raíz (1)
1. Buck Manantial	+ 11,88	+ + +
2. Cochicó Inta	+ 22,52	+ + +
3. Coop. Cabildo	- 10,49	+ +
4. Buck Pucará	- 15,89	+
5. Buck Poncho	+ 9,20	+

! Nota:

- (1) Recuentos por NMP en medio Nfb semisólido, libre de Nitrógeno, sobre raíces lavadas de trigo al momento de cosecha.
- No se observó presencia de *Azospirillum* sp. sin embargo en algunas muestras se observó presencia de *Asotobacter* nativo y *Clostridium*.
 - + Presencia de *Azospirillum brasilense* en número hasta ² 1. 10 a u.f.c./gr de raíz.
 - ++ Presencia de *Azospirillum brasilense* en número de ³ 1.10 a ⁴ 1.10 u.f.c./gr de raíz.

Las variedades Buck Manantial y Cochicó Inta se comportaron con igual tendencia a incrementar el rendimiento en grano, comportamiento igual al observado en el ciclo 87 y a los rendimientos parciales obtenidos en el ciclo 88 (datos no publicados); resultados que se podrían vincular a la eficiencia observada en la asociación rizosférica *Azospirillum*-raíz. Buck Pucará presentó muy baja asociación con la bacteria usada como inoculante y su rendimiento resultó deprimido en relación a los controles, iguales observaciones se realizaron años anteriores.

Sin embargo las variedades Cooperación Cabildo y Buck Poncho no mostraron el comportamiento esperado acorde a años anteriores. Buck Poncho, que según ensayos preliminares debía comportarse como Buck Pucará, presentó un incremento del 9,20 % respecto a su control, a pesar de haber asociado muy débilmente con el inoculante, sin embargo el análisis bacteriológico efectuado a las raíces permitió establecer una importante asociación con otros diazotrofos nativos del suelo tales como *Asotobacter* sp. y *Clostridium* sp., los que podrían haber contribuido a ese incremento observado.

Cooperación Cabildo si bien presentó niveles medios de asociación bacteriana, su rendimiento se vio deprimido con relación al control; esto podría explicarse pensando que el microorganismo asociado a la raíz ha cubierto en este habitat sus necesidades nutricionales pero no ha logrado estimular en la planta los mecanismos necesarios para aumentar el rendimiento, por el contrario tendría en este caso un efecto "parásito" sobre el vegetal.

Vinculando el comportamiento de esta variedad con los resultados obtenidos en el Ensayo de Cepas (Tabla III), tenemos mas argumentos para proponer la necesidad de chequear variedades vs cepas de *Asospirillum* a fin de encontrar y entonces recomendar la dupla óptima.

Tabla III. Ensayo comparativo del grado de asociación entre tres cepas de *Asospirillum brasiliense* y raíces de trigo Buck (Manantial) Ciclo 1988-89.

Cepa	Ciclo 1988	Ciclo 1989
sp III	933 a *	1590 b
sp I	976 a	977 b
sp 245	1558 ab	883 c
control	958 b	991 b

Nota: Las cepas sp I y sp 245 son de origen Brasileño (Provetas) por gentileza de la Dra. Johanna Döbereiner y su equipo. La cepa sp III es una cepa nativa aislada de raíces de crecimiento espontáneas de la zona.

*Las medias de cada columna con una letra común no difieren estadísticamente. Test de Duncan al 5 %.

Como se observa en la tabla III el mejor rendimiento lo presenta la variedad Buck Manantial al ser inoculado con la cepa nativa sp III, obteniéndose incrementos del 63 % y 60 % con relación al control en los ciclos 88 y 89 respectivamente.

La cepa de *Asospirillum* sp III es una cepa nativa que fue aislada a partir de raíces de vegetación espontánea que crece en suelos del Valle Inferior del Rio Negro. Se eligió esta cepa pues sus cultivos en medio NFB al ser sometida el test de Reducción acetileno-etileno presentaron elevada actividad nitrogenasica. El recuento bacteriano realizado en raíces usando medio selectivo para *Asospirillum* mostró que en las plantas inoculadas con la cepa sp 245 no prosperó la asociación a nivel rizosférico en ninguno de los dos ciclos de cultivo; en las plantas inoculadas con cepa sp I la población rizosférica de *Asospirillum*, se evaluó en promedio de 5,9 . 10 u.f.c./gr de raíz para el ciclo 88 y 3,2 . 10 u.f.c./gr de raíz para el ciclo 89; pero en las raíces de plantas inoculadas con cepa nativa sp III se obtuvieron recuentos de hasta 9,6 . 10 u.f.c./gr de raíz en los dos ciclos de cultivos. Estas determinaciones se realizaron en raíces de plantas muestreadas a los cuarenta días de emergencia, con el fin de verificar la eficiencia de la inoculación traducida en efectiva asociación bacteria-raíz.

Comparando los rendimientos obtenidos con los niveles de asociación logrados se observa una correlación directa entre ellos. En el ensayo llamado Red Nacional, se observó el comportamiento del cultivo con relación a la inoculación y a la fertilización.

Tabla IV: Rendimientos en grano obtenidos en el ensayo red nacional con variedad Buck Manantial, Ciclo 1989.

Tratamiento	Rendimiento [Kg/ha]	% Incremento vs Control
I sp III	1466,1	+ 67,59
I sp 7	1069,7	+ 22,27
F	1155,9	+ 32,13
F + I sp III	1140,6	+ 30,36
F + I sp 7	1134,2	+ 29,65
Control	874,8	0

Note: I: Inoculado con la cepa indicada; F: fertilizado. * Test Student - Newman - Keuls, 0,95 %.

La tabla IV muestra los rendimientos obtenidos para la variedad Manantial. Como en los ensayos anteriores la cepa sp III muestra un comportamiento diferencial con relación a los tratamientos alcanzando un rendimiento 67 % mayor que el obtenido para el control y superando ampliamente el efecto producido por el tratamiento fertilizado (32 % de incremento) y por el tratamiento combinado de inoculación y fertilización (30 % de incremento).

En el laboratorio se realizaron cultivos in-vitro de trigo variedad Buck Manantial los que se inocularon en condiciones axénicas con *Asospirillum brasilense* sp III. La foto 1 muestra la gran cantidad de pelos radicales que desarrollan en las raíces inoculadas en comparación con las raíces sin inocular. La foto 2 muestra el mismo efecto observado en raíces de Buck Manantial cultivado a campo en condiciones de secado. En la foto 3 vemos los microorganismos adheridos a la superficie radical en forma individual o formando racimos de bacterias. En la foto 4 muestra idéntica morfología, distribución y adherencia microbiana que la observada en raíces de plantas cultivadas in-vitro, pero esta vez las raíces provienen de plantas cultivadas a campo previamente inoculadas con *Asospirillum brasilense* sp III.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados usando microscopía electrónica muestran idéntica población y distribución bacteriana en raíces de plantas cultivadas en condiciones controladas in-vitro que las detectadas en raíces de trigo inoculado y cultivado en condiciones de campo. Estas observaciones permiten visualizar la existencia de elementos de adhesión extracelular como son las fimbrias (Bashan *et al* 1986), fijación tan firme esta que les permite mantenerse adheridas a pesar del tratamiento agresivo que sufren durante la preparación previa a la observación por SEM. (Bae *et al* 1972)

La relación comparativa entre rendimientos en granos versus asociación bacteriana a nivel rizosférico, especialmente teniendo en cuenta las características agroecológicas marginales del Partido de Patagones, nos permiten aportar nuevos datos que apoyan las experiencias realizadas por otros investigadores (Jagnow 1987; Baldani *et al* 1983, 1987; Bashan *et al* 1987) proponen que el efecto fundamental que se logra a partir de la inoculación con *Asospirillum* estaría en relación con el mayor desarrollo radicular causado por un estímulo mutuo (planta-bacteria) en la producción de sustancias reguladoras de crecimiento; este incremento observado en el número de pelos radicales permite a la raíz una mejor y mayor exploración del suelo circundante optimizando el uso del agua y de los nutrientes disponibles en el suelo. (Kapulnik *et al* 1983; Harari *et al* 1989; Hartman 1989)

Los incrementos en rendimiento en grano obtenidos sobre las variedades de trigo inoculadas con cepas nativas, como la variabilidad observada en las asociaciones entre variedades versus cepas, nos permiten pensar en la necesidad de orientar los estudios a fin de obtener las cepas nativas que asocien más eficientemente con las diversas variedades de trigo de interés regional, considerando el material genético de la planta en relación a cepas nativas de la región de cultivo, (Ela *et al* 1982; Fogher 1987).

Los resultados observados en nuestros ensayos demuestran que no sería conveniente recomendar cepas de *Asospirillum* que pudieran ser usados en la producción de inoculantes con criterio universal para cualquier variedad de trigo.

AGRADECIMIENTOS

- A la Lic. Viviana S. de Losano, por su dirección y asesoramiento en los trabajos de Microscopía Electrónica.

- A la firma RIZOBACTER, por su interés manifestado en brindar continuidad a esta investigación, apoyo que se ha concretado a partir de los ensayos del ciclo 1990.

BIBLIOGRAFIA

BAE, H.C., COTA ROBLES, H., CASIDA JR. L.E. 1972. Microflora of soil as viewed by Transmission Electron Microscopy- App. Microbiol. 23:637-648

BALDANI, V., BALDANI, I., DOBEREINER, J., 1983. Effects of *Asospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Can. J. Microbiol. 29:924-929.



- BALDANI, V., BALDANI, I., DOBEREINER, J., 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fertil. Soils*-4:37-40
- BASHAN, Y., LEVANONY, H., KLEIN, E., 1986. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. *J. Gen. Microb.* 132:3069-3073
- ELA, S. W., ANDERSON, M. A., BRILL, W. J., 1982. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation *Plant Physiol.* 70:1564-1567.
- FOGHER, C., 1987. Breeding for associative nitrogen fixation in maize Abstr. Fourth Int. Sym. on Nitrogen Fixation with nonlegumes. Rio de Janeiro.
- HARARI, A., KIGEL, J., OKON, Y., 1989. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers. p. 123-136.
- HARTMANN, A. 1987- Ecophysiological aspects of grown and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. Nitrogen fixation with non-legumes Kluwer Academic Publishers. p 123-136.
- JAGNOW, G., 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria. *Z. Pflanzenernähr-Bodenk.* 150:361-363.
- KAPULNIK, Y., OKON, Y., HENIS, Y., 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation - *Can J. Microbiol.* 31:811-887.
- LOZANO, V.S. de, MORALES, A. Introducción a la microscopía electrónica. Ed. CRIBBAB.
- MORGENSTERN, E., OKON, Y., 1987. The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanese*. *Arid Soil Res. Rehabil.* 1:115-127.
- POZZO ARDIZZI, G., GIORGETTI, H., MARTINEZ, R., IGLESIAS, H., MARGIOTTA, F., MONTENEGRO, O. 1987. Effect of inoculation with *Azospirillum* spp on field-grown wheat in Arid Soils. Abstr. Fourth Int. Sym. on Nitrogen Fixation with non-legumes. Rio de Janeiro.

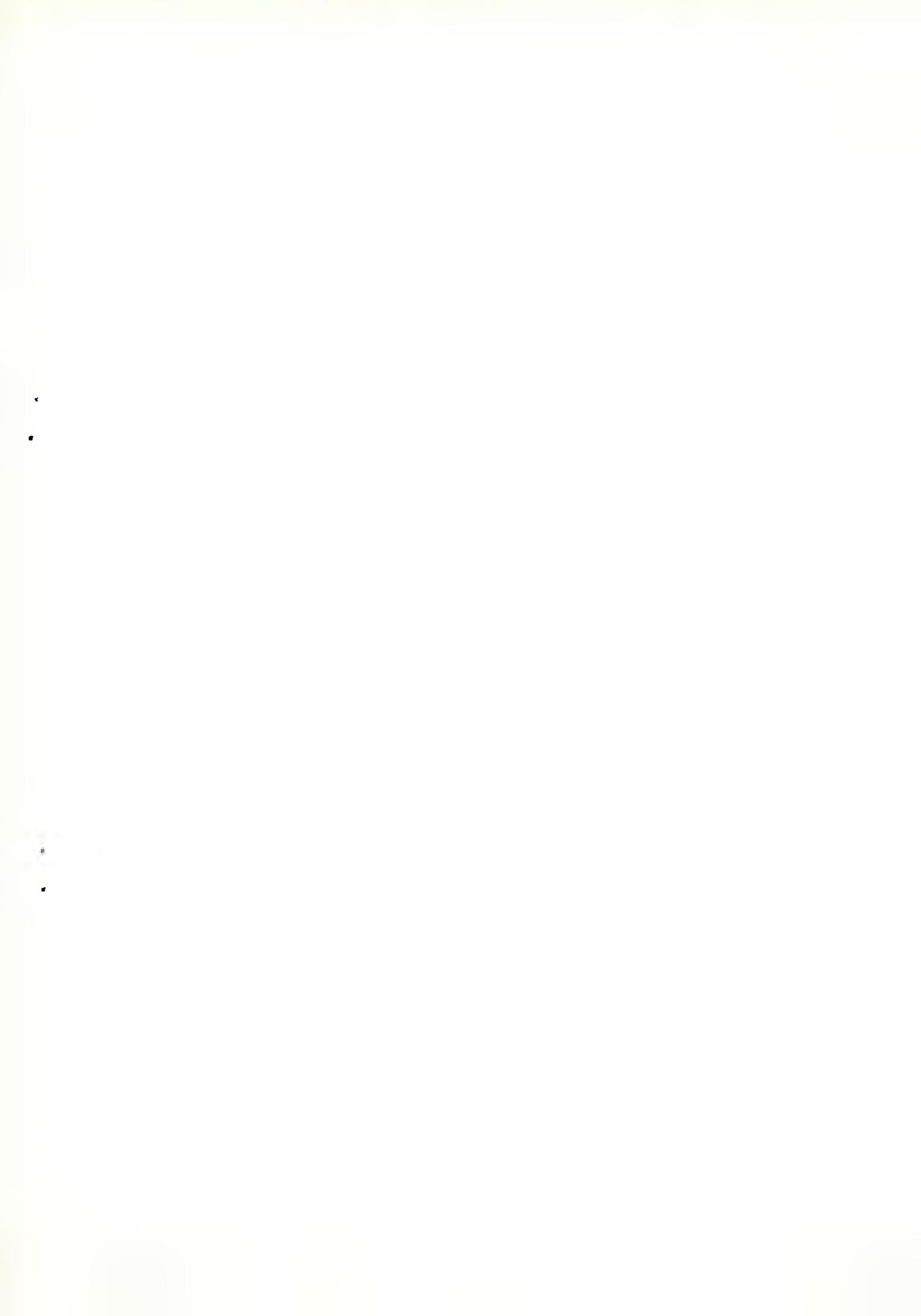


Foto 21 Trozos de raíz de trigo inoculado con *Ascopiriillum* sp III, cultivado a campo en condiciones de secano. LZX. Se observa proliferación de pelos radicales.

Foto 17 La raíz de la izquierda pertenece a una planta de trigo inoculada con *Ascopiriillum* sp III; a la derecha se observan dos trozos de raíces no inoculadas; ambas plantas fueron cultivadas en laboratorio en condiciones de asepsia controlada. 60X

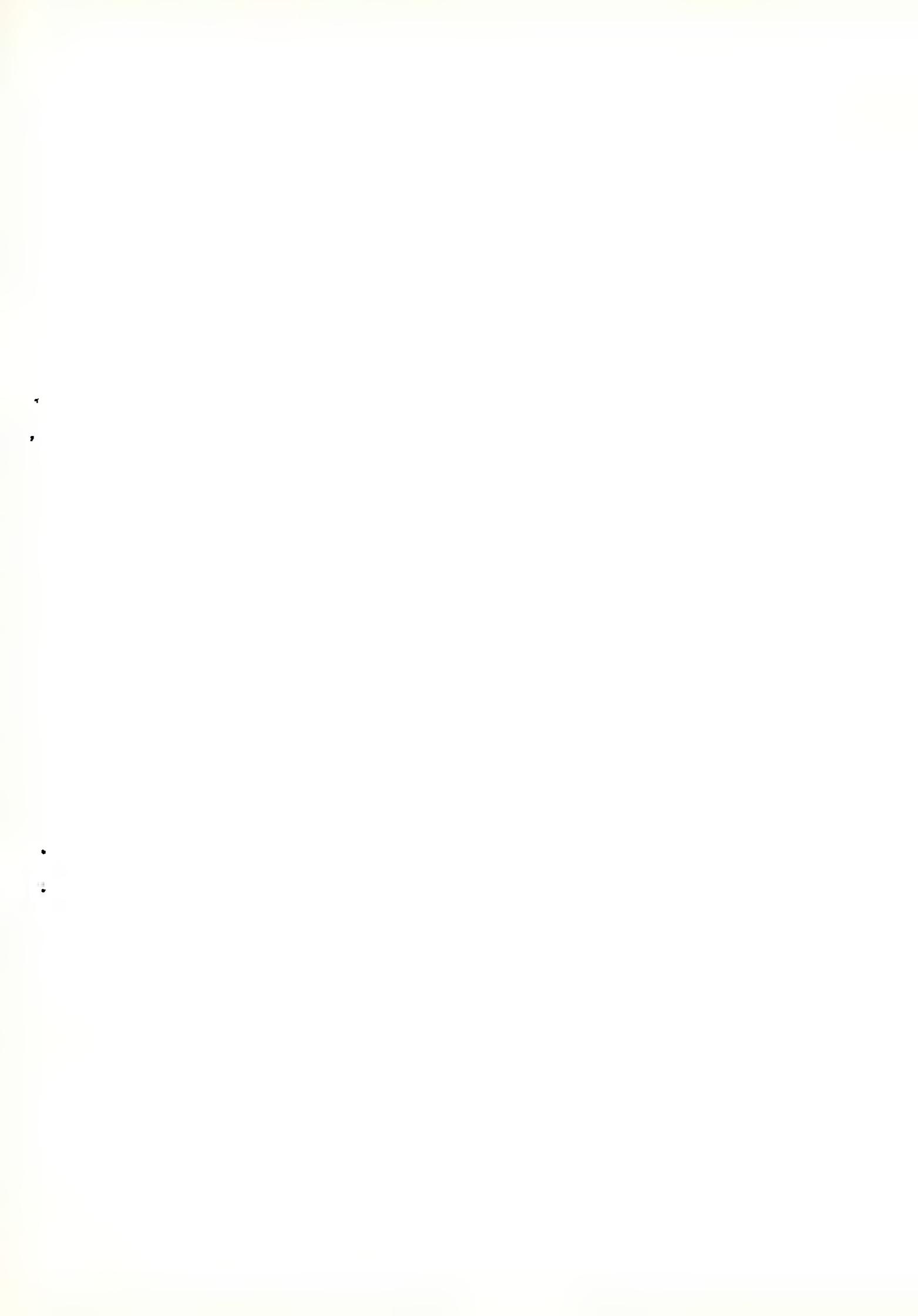


Foto 3: Sección de raíz inoculada con *Azospirillum* sp 111 localizado a la izquierda en la foto 1, observado con 4.800X. Se detectan bacterias adheridas por medio de fimbrias a la superficie radical.

Foto 4: Micrografía ampliada de la raíz de trigo inoculado con *Azospirillum* y cultivado a campo, presentada en la foto 2, observada con 4.800X, muestra igual distribución, morfología y adhesión bacteriana en la superficie radical que la raíz de la foto 3.



4
2

2
4