



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Facultad de Químico-Farmacobiología.

Aislamiento de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* de *Leucena* sp y análisis de su efecto de inoculación en sorgo (*Sorghum vulgare* L) y soya (*Glycine max* L).

T E S I S

Presenta:

Martha Elizabeth Vargas Hernández

Para optar al título de:

Química Farmacobióloga

Director de Tesis: Doctor en ciencias especialidad en microbiología Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Morelia, Mich. Octubre de 2013.



Laboratorio de Microbiología Ambiental

Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de teocintle y leguminosas silvestres” (2013), con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez.



“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e innovación del Estado de Michoacán” con folio: BT-12-2-571.

Contenido

Resumen	x
Summary	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Hipótesis.....	4
4. Objetivos generales	4
5. Material y métodos.....	4
5.1. Origen y aislamiento de <i>Azospirillum</i> sp <i>Leu 32</i> y <i>Rhizobium</i> sp <i>Leu 34</i>	4
5.2. Solarización del suelo para el experimento.	5
5.3. Preparación del sistema hidropónico de Jarra de Leonard.....	6
5.4. Inoculación de sorgo y soya con aislados <i>Leu 32</i> y <i>Leu 34</i>	4
5.5. Siembra de sorgo y soya en jarras de Leonard.	5
5.6. Variables respuesta usadas para el efecto de los <i>Leu 32</i> y <i>Leu 34</i> en sorgo y soya....	5
5.7. Análisis estadístico de resultados.....	5
5.8. Identificación Bioquímica de <i>Azospirillum</i> sp <i>Leu 32</i> y <i>Rhizobium</i> sp <i>Leu 34</i>	6
6. Resultados y discusión	7
6.1. Aislamiento de posibles cepas de <i>Azospirillum</i> sp <i>Leu 32</i> y <i>Rhizobium</i> sp <i>Leu 34</i>	7
6.2. Análisis de la inoculación del sorgo con <i>Azospirillum</i> sp <i>Leu 32</i> y <i>Rhizobium</i> sp <i>Leu 34</i>	11
6.3. Análisis de la inoculación de soya con <i>Azospirillum</i> sp <i>leu 32</i> y <i>Rhizobium</i> sp <i>leu 34</i>	18
7.- Conclusión	25
8.- Literatura citada	25

Resumen

El cultivo de sorgo (*Sorghum vulgare* L) y de soya (*Glycine max* L) son de alto consumo en México y el mundo, para abastecer esta demanda se usa fertilizante nitrogenado (FN), que aplicado en exceso provoca la degradación de suelo. Una alternativa de solución a hiperfertilización es la inoculación de sus semillas con géneros de promotores de crecimiento vegetal (BPCV) como: *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp. La hipótesis de este trabajo fue que *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp aisladas de *Leucena* sp serían benéficas para el crecimiento de soya y sorgo a dosis reducida de FN. Por lo que los objetivos generales de esta investigación fueron: aislar *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp de *Leucena* sp y analizar el efecto de inoculación de ambas BPCV en sorgo y soya. El objetivo - específico fue: evaluar la respuesta del sorgo y soya a la co - inoculación con *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp a dosis del 50% N. El aislamiento de *Azospirillum* sp en agar Doberainer y Day (D Y D) y agar extracto de levadura manitol y rojo congó (AELMRC) para *Rhizobium* sp. Estas BPCV se inocularon en sorgo y soya en sistema hidropónico jarras de Leonard, bajo un diseño experimental de bloques al azar. El sorgo y soya inoculados con *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp se alimentaron con solución mineral (SM) con Nitrógeno (N) en forma de NH_4NO_3 al 50% de su concentración recomendada para estos cultivos vegetales; mientras que el sorgo y soya sin inocular se usó como control relativo (CR), ambas se alimentaron con solución mineral completa (SMC). La misma gramínea y leguminosa sin inocular se usaron como control absoluto (CA) se fueron irrigados solo con agua corriente. Las variables respuestas para medir el efecto de BPCV en ambas plantas fueron: porcentaje (%) de germinación; la fenotípica aérea y radical: altura de la planta (AP), longitud de raíz (LR) y la biomasa: peso fresco y seco de parte aérea y radical. Los datos se analizaron por el método estadístico de Tukey.

Los resultados mostraron que el porcentaje % de germinación en el sorgo y soya coinoculados con *Azospirillum* Leu 32 y *Rhizobium* Leu 34 fue de 100%, estadísticamente diferente significativo respecto a la semilla de su homólogo no inoculado usado como CR con un 75%. A nivel de plántula el peso seco aéreo (PSA) del sorgo coinoculado con *Azospirillum* Leu 32 y *Rhizobium* Leu 34 fue de 0.90g valor estadístico diferente al sorgo CR con 0.35g de

PSA. A nivel de floración el sorgo coinoculado con ambas BPCV alcanzo 3.17g de peso seco radical (PSR), valor estadísticamente diferente significativo comparado a 1.59g de PSR del sorgo sin inocular usado como CR. A nivel de plántula la soya coinoculada con dos géneros de BPCV alcanzó una LR de 42.2 estadísticamente significativo a la LR de su homólogo sin inocular usado como CR con 15.7cm de LR. A nivel de floración la soya coinoculada con BPCV causo 2.44g de PST estadísticamente significativo respecto a la soya sin inocular, usada como CR con 1.04g de PST. Se concluyó que *Leucena sp* es una fuente de BPCV del tipo *Azospirillum sp* y *Rhizobium sp* para sorgo y soya a dosis reducida de FN.

Palabras clave: fitohormona, leguminosa, efecto rizosfera, colonización.

Summary

Sorghum (*Sorghum vulgare* L) and soy (*Glycine max* L) cultivation are of high consumption in Mexico and in the world, to supply this demand nitrogen fertilizer is used (NF), that applied in excess provokes the degradation of the soil. A hyper-fertilization alternative solution is the inoculation of this seeds with Plant growth-promoting bacteria (PGPB) like: *Azospirillum sp* and *Rhizobium sp*. The hypothesis of this work was that *Azospirillum sp* and *Rhizobium sp* isolated from *Leucena sp* would be beneficial for the growth of soybeans and Sorghum at a reduce dosage of FN. So the general objectives of this research were: To Isolate *Azospirillum sp* and *Rhizobium sp* from *Leucena sp* and analyze the inoculation effect of both PGPB on sorghum and Soybeans. The Specific objective was: To Evaluate the response of sorghum and soy to the co-inoculation with *Azospirillum sp* and *Rhizobium sp* at a 50% dose. The isolation of *Azospirillum sp* in Dobereiner y Day agara and Yeast Extract Mannitol Agar Congo red (AELMRC) for *Rhizobium sp*. This PGPB where inoculated in sorghum and soy in a Leonard jars hydroponic system, under a random experimental block design. The Inoculated Sorghum and soy with *Azospirillum sp* and *Rhizobium sp* were feed with mineral solution (MS) with Nitrogen (N) in the form of NH_4NO_3 at 50% of the recommended concentration for this vegetable crops; while non-inoculated sorghum and soy was used as relative control (RC), both where feed with full mineral solution (FMS). The same non inoculated grass and legume were used as absolute control (AC), were irrigated with

tap water only. The Variables responses to measure the effect of PGPB on both plants were: germination percent (%); The shoot and root phenotyping: height of the plant (HP), root length (RL) y biomass; The fresh and dry weight of shoot and root part. The data were analyzed by the sadistic Turkey method.

The results showed that the germination percent % in the sorghum and soy co-inoculated with *Azospirillum* sp *Leu* 32 and *Rhizobium* sp *Leu* 34 was of 100%, statistically significantly different regarding the seed of his non-inoculated counterpart used like RC with a 75%. At level of seedling shoot dry weight (SDW) the sorghum inoculated with *Azospirillum* sp *Leu* 32 and *Rhizobium* sp *Leu* 34 was of 0.90g, different statistical value to sorghum RC with 0.35g of SDW. At flowering level, inoculated sorghum with both PGPB reached 3.17g of radical dry weight (RDW), different statistically significant value compared to 1.59g of SDW of inoculated sorghum used as RC. At seedling level the inoculated soy with two genres of PGPB reached a RL of 42.2 statistically significant to the RL of its non-inoculated counterpart used as RC with 15.7cm of RL. At flowering level the inoculated soy with PGPB caused 2.44g of Total Dry wheight (TDW) statistically significant compared to the non-inoculated soy, used as RC with 1.04g of TDW. It was concluded that *Leucena* sp is a source of PGPB of the *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp type for sorghum and soy at reduce NF dosage.

Keywords: phytohormone, legume rhizosphere effect, colonization.

1. Introducción

El sorgo (*Sorghum vulgare* L) es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas (SAGARPA, 2012). Es el cuarto cereal por su alto consumo y producción con 63×10^6 ton/año México es el tercer productor de sorgo en el mundo con 6.20×10^6 ton/año. Guanajuato así como Tamaulipas son los estados de mayor producción del país (Fernández y Venegas., 2010).

La soya (*Glycine max* L) es una leguminosa (Triana., 2009), herbácea anual de un alto valor nutricional fuente de proteína, y económica (Jaramillo., 2006).

La producción de sorgo y soya en los últimos años ha disminuido su rendimiento a causa de infertilidad del suelo (Cuadrado *et al.*, 2009) por la hiperfertilización, una solución para este problema es la inoculación de sorgo y soya con *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp para su sano crecimiento (González Arias., 2012) a dosis reducidas de FN (Ferlini., 2005). En general se conocen diferentes mecanismos de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) para estimular un desarrollo vegetal sano que conserve la fertilidad del suelo (Sánchez Yañez., 2004) Las ampliamente conocidas BPCV son aquellas que inoculadas a la siembra de la semilla, inducen su germinación para luego colonizar la raíz, en donde al transformar sus exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (SPCV) causan un efecto similar a las fitohormonas aplicadas comercialmente a las semillas y plantas: como una mayor proliferación de pelos radicales, mejora la absorción de nitratos (NO_3), amonio (NH_4), fosfatos (PO_4) y otros minerales (García – Gonzalez *et al.*, 1995). A pesar de que se reduce las dosis del fertilizante nitrogenado (FN) y/o Fertilizante fosforado (FP) sin de afectar el sano crecimiento del cultivo vegetal. Algunos ejemplos de estas bacterias son: *Azotobacter beijerinckii*, *Azospirillum brasilense* o *A. lipoferum* *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* spp (Sánchez – Yañez., 2004)

2. Antecedentes

Benintende y Ulrich., 2005. Analizaron la respuesta positiva de la soya a la coinoculación con *B. japonicum* sp y *A. brasiliense* sp a nivel de campo, bajo un diseño experimental: soya coinoculada con *B. japonicum* sp + *A. brasiliense* sp; soya sin inocular utilizado como CR con cuatro repeticiones. Los resultados mostraron que la soya coinoculada alcanzo un 29% de PST más en comparación con la soya empleada como CR.

García – Olivares *et al.*, 2006. Demostraron la respuesta positiva del sorgo a la inoculación con *A. brasiliense* sp, en invernadero, bajo un diseño experimental: sorgo inoculado con *A. brasiliense* y sorgo, sin inocular usado como CR. Los resultados mostraron que la inoculación con *A. brasiliense* incremento la producción de biomasa un 50% más que el sorgo sin inocular utilizado como CR.

Zago *et al.*, 2006. Analizaron la respuesta favorable del sorgo a la coinoculación con *Azospirillum* sp + *Rhizobium* sp, a nivel de campo. Bajo un diseño experimental: sorgo coinoculado con *Azospirillum* sp + *Rhizobium* sp; sorgo inoculado con *Azospirillum* sp y sorgo sin inocular. Los resultados mostraron que la respuesta positiva del sorgo coinoculado con *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp incrementó un 47% el PST estadísticamente superiores a su homólogo empleado como CR.

Diaz –Franco *et al.*, 2008. Analizaron la respuesta positiva del sorgo a la inoculación con *A. brasiliense*, a nivel de campo, bajo un diseño experimental: sorgo inoculado con *A. brasiliense* y sorgo sin inocular utilizado como CR. Los resultados mostraron que la respuesta del sorgo a la inoculación con *A. brasiliense* alcanzó 107cm de altura de la planta (AP) estadísticamente significativo comparado con su homólogo usado como CR que alcanzó 101cm de AP. En madurez fisiológica el sorgo inoculado con *A. brasiliense* alcanzó 3,725 Kg/ha⁻¹) mientras que su homólogo usado como CR que obtuvo 2715 Kg/ha⁻¹.

Askary *et al.*, 2009. Analizaron la respuesta positiva de la soya a la coinoculación con *A. brasiliense* y *Rh. Meliloti*, a nivel de invernadero. El experimento se realizó con 4 tratamientos y

5 repeticiones: soya inoculada simple y dual con *A. brasiliense* y *Rh. meliloti*, así como soya sin inocular utilizada como CR. Los resultados mostraron que la coinoculación de soya con *A. brasiliense* y *Rh meliloti* alcanzó un incremento en su biomasa del 22% más comparado con su homóloga empleado como CR.

Benintende *et al.*, 2010. Compararon la respuesta positiva de soya coinoculada con *B.japonicum* y *A. brasiliense* con relación a la inoculación simple con *B. japonicum* en soya. Realizaron un experimento con un diseño experimental de soya inoculada solo con *B. japonicum* y coinoculada con *B. japonicum* y *A. brasilense* y soya sin inocular. Los resultados mostraron que: la coinoculación de *B. japonicum* + *A. brasiliense* causó un mejor desarrollo vegetal superior del 30% a la inoculación con *B. japonicum* y su homólogo sin inocular designado como CR.

3. Hipótesis

Cepas de los géneros *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp aisladas de *Leucena* sp serán benéficas para el crecimiento del sorgo y soya a dosis reducida de FN al 50%.

4. Objetivos generales

- a) Aislar cepas de *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp de *Leucena* sp
- b) Analizar el efecto de inoculación de cepas de *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp en sorgo y soya.

4.1. Objetivo específico

Evaluar la respuesta del sorgo y soya a la co - inoculación con *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp a dosis reducida de FN al 50%.

5. Material y métodos

5.1. Origen y aislamiento de *Azospirillum* sp Leu 32 y *Rhizobium* sp Leu 34.

Azospirillum sp y *Rhizobium* sp se aislaron de las raíces de *Leucena* sp, crecida en suelo rojo ferralítico pobre en materia orgánica durante 45 días, en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH en Morelia, Mich. (Sánchez – Yañez., 2007).

El aislado sospechoso de *Azospirillum* sp se codificó como *Leu 32* y el de *Rhizobium* sp como *Leu 34*. De la leguminosa *Leucena* sp se colectó y se eliminó el suelo, se enjuagó con detergente la Corona^{MR} 1% (p/v) y se lavó con agua potable; hipoclorito de Sodio (Clorox^{MR}) al 6% (v/v) /10 minutos y se lavó 5 veces con agua potable estéril, posteriormente con alcohol al 70% (v/v) /5 min; y se lavó 5 veces; se tomó 2.0g de raíz y se suspendieron en 5.0 mL de solución salina (SSD) NaCl 0.85% (p/v); detergente 1% (p/v). En un mortero la raíz se trituró y se sembró en caldo Doberainer y Day (D y D) (g/L): Ácido Málico 10.0 (esterilizado por filtración con una membrana millipore de 2µ); K₂HPO₂ 2.0; KH₂PO₂ 2.0; MgSO₄ 3.0; además solución de oligoelementos 1.0mL/L; con la siguiente composición (g/L): H₃BO₃ 2.86; ZnSO₄ 7H₂O 0.22; MnCl₂ 7H₂O 1.81; K₂MnO₄ 0.09; agua destilada a pH 6.8-7.0; para *Leu 32*; para inhibir el crecimiento de hongos se agregó el antifúngico Tecto 60^{MR} (Syngenta) 2% (p/v) 1.0mL/L de D y D; para *Leu 34* caldo extracto de levadura manitol y Rojo Congo (CELMRC) (g/L): Manitol 10.0g; K₂HPO₂ 2.0; MgSO₄ 0.2; solución de Rojo Congo 1:400 10ml; NaCl 0.1; extracto de levadura 10g/L; solución de oligoelementos; agua destilada a pH = 6.5 – 6.7; para inhibir el crecimiento de hongos se agregó un antifúngico Tecto 60^{MR} (Syngenta) 2% (p/v) 1.0mL/L de CELMRC. Los tubos de D y D y AELMRC se incubaron por 24 h. y como evidencia de crecimiento se observó turbidez en ambos, se realizó tinción de Gram para observar su morfología, para la purificación de los aislados a la misma fórmula líquida de D y D se agregó 18g/L de agar bacteriológico, el AD y D y AELMRC se incubaron por 48/72h, posteriormente se realizó una tinción Gram para observar (Sánchez – Yañez., 2007).

5.2. Solarización del suelo para el experimento.

Para solarizar el suelo por acción del calor solar para eliminación de fitopatógenos; plagas vegetales; 60 Kg de suelo se extendió uniformemente y se cubrió con un plástico oscuro; al día siguiente se humedeció con agua potable y se cubrió nuevamente con el plástico oscuro, al

tercer día, se destapo y uso el suelo para el llenado de las jarras de Leonard (Rámirez y Sáinz, 1995)

5.3. Preparación del sistema hidropónico de Jarra de Leonard.

El experimento se realizó en invernadero del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB en jarras de Leonard para la medición de la respuesta del sorgo y soya a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*, constituido por la parte inferior de media botella de PET, con la solución mineral completa (SMC) para alimentar el sorgo y soya usados como control relativo (CR), con la siguiente composición química (g/L): NH_4NO_3 12.0; KH_2PO_4 3.0; K_2HPO_4 3.5; MgSO_4 1.5; CaCl_2 0.1; FeSO_4 0.5 mL/L y solución de oligoelementos 1.5 mL ; Con la siguiente composición : (g/L) ; H_3BO_3 2.86; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81, K_2MnO_4 0.09; agua destilada pH 6.8-7.0) 1000 mL, pH 6.4-6.7 (Sánchez – Yañez., 2007).

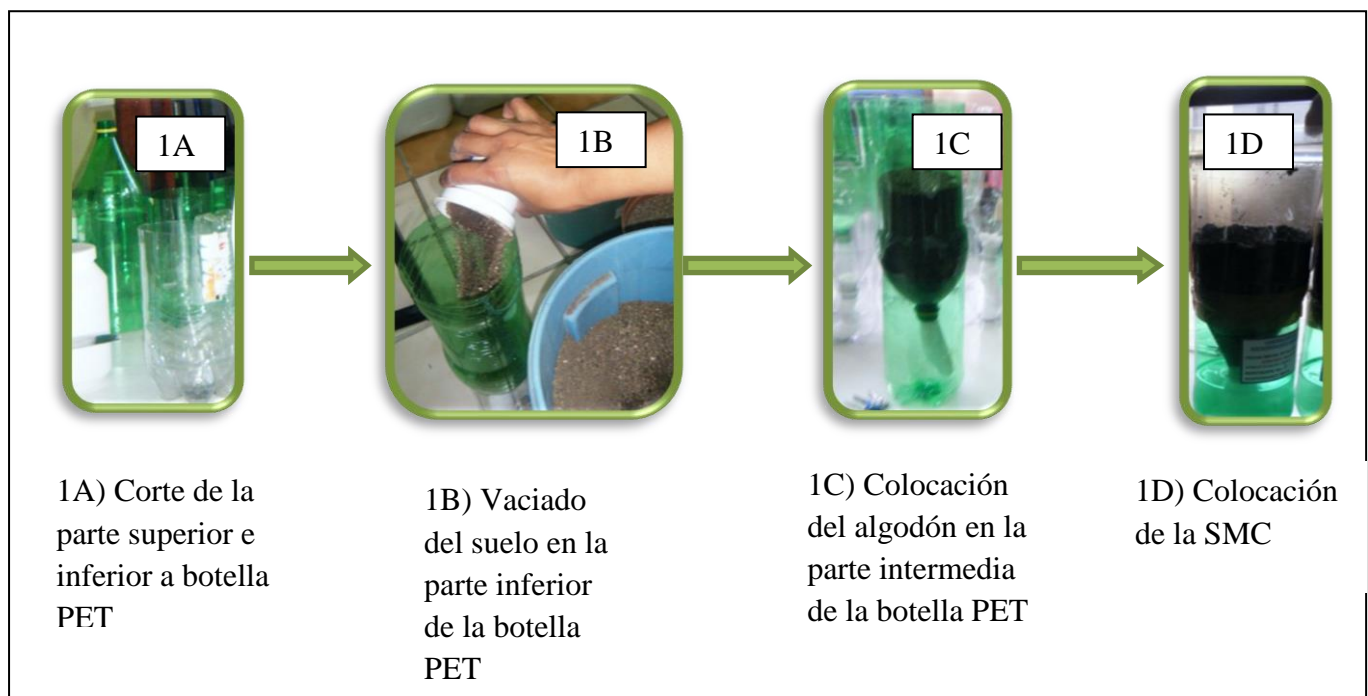


Figura 1. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard

Para alimentar el sorgo y soya inoculados se usó la misma SM con reducción de N al 50% en forma de NH_4NO_3 ; para el sorgo y soya usados como CA se irrigan solo con agua potable, la parte superior de la botella de PET con 1.5 kg de suelo, conectado con algodón para la alimentación por capilaridad desde la base del recipiente que contenía agua ó la SM como se muestra en el cuadro 1.0 (Luna y Sánchez-Yáñez, 1991). Preparadas las jarras de Leonard como se muestra en el cuadro 1 se sembró el sorgo y soya de acuerdo a los siguientes tratamientos: I) sorgo / soya inoculados con aislado *Leu 32*, II) sorgo /soya inoculados con aislado *Leu 34*, III) sorgo /soya coinoculados con aislados *Leu 32* y *Leu 34* y alimentados con SM 50% NH_4NO_3 , IV) sorgo /soya alimentado con SMC usados como CR, V) sorgo /soya irrigado con agua potable usados como CA y etiquetarlas de acuerdo a cada tratamiento, con 5 repeticiones como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Diseño experimental, para analizar la respuesta de sorgo y soya a la inoculación con aislados *Leu 32* y *Leu 34*.

Tratamiento	<i>Leu</i> <i>32</i>	<i>Leu</i> <i>34</i>	Soya	Sorgo	Agua	Solución mineral con N en
						forma de NH_4NO_3
1.- Agua (Control Absoluto)	-	-	+	+	+	-
2.- Solución mineral (Control Relativo)	-	-	+	+	-	+100%
3.- I	-	+	-	+	-	+50%

4.-II	-	+	+	-	-	+50%
5.- III	+	-	-	+	-	+50%
6.- IV	+	-	+	-	-	+50%
7.- V	+	+	-	+	-	+50%
8.- VI	+	+	+	-	-	+50%

Simbología: + = Si se aplicó - = No se aplicó. +50% NH₄NO₃ = 50% +100% NH₄NO₃ = (SMC)

Diagrama 1. Aislamiento de *Leu 32* y *Leu 34* de raíz de *Leucena sp*

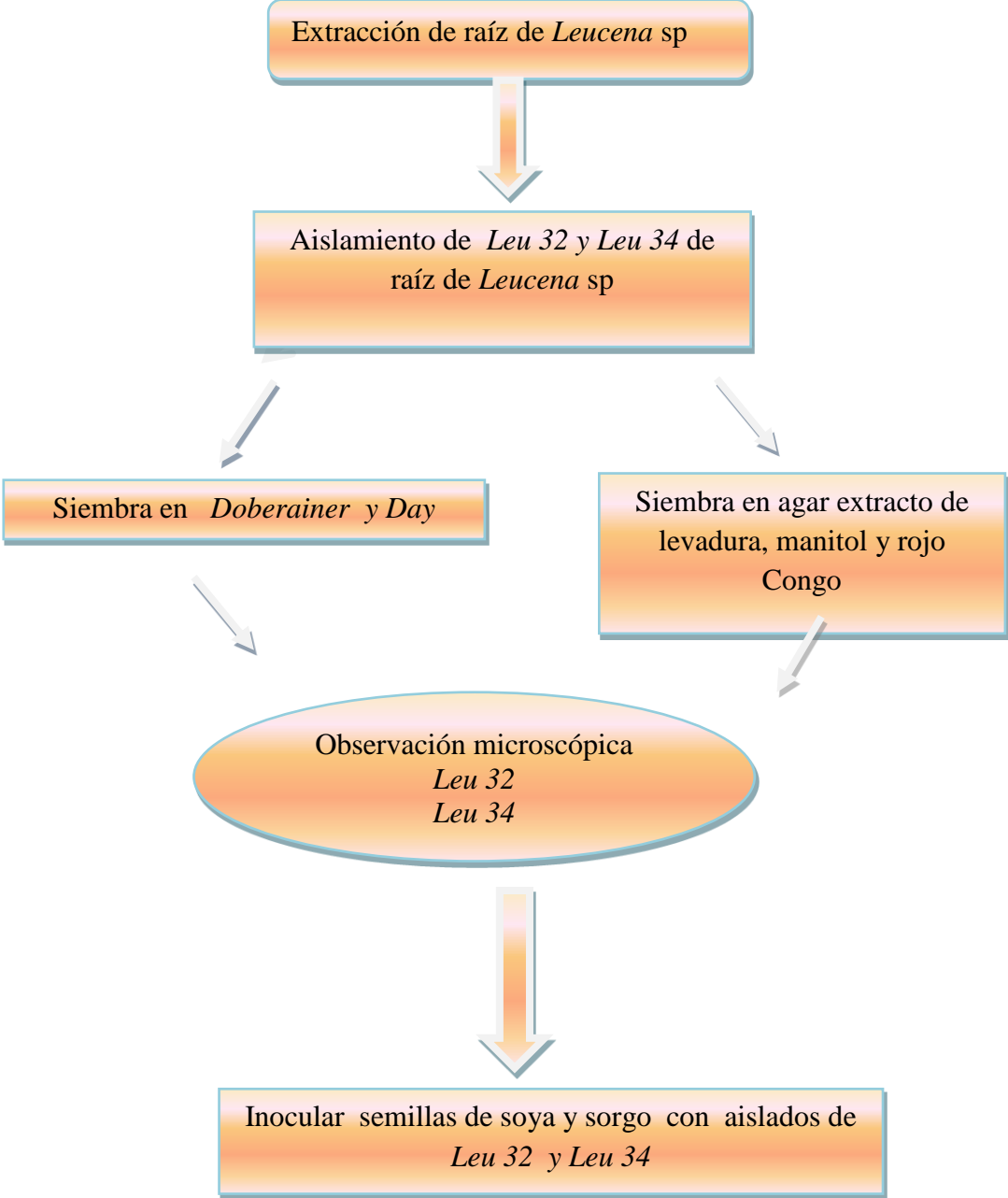
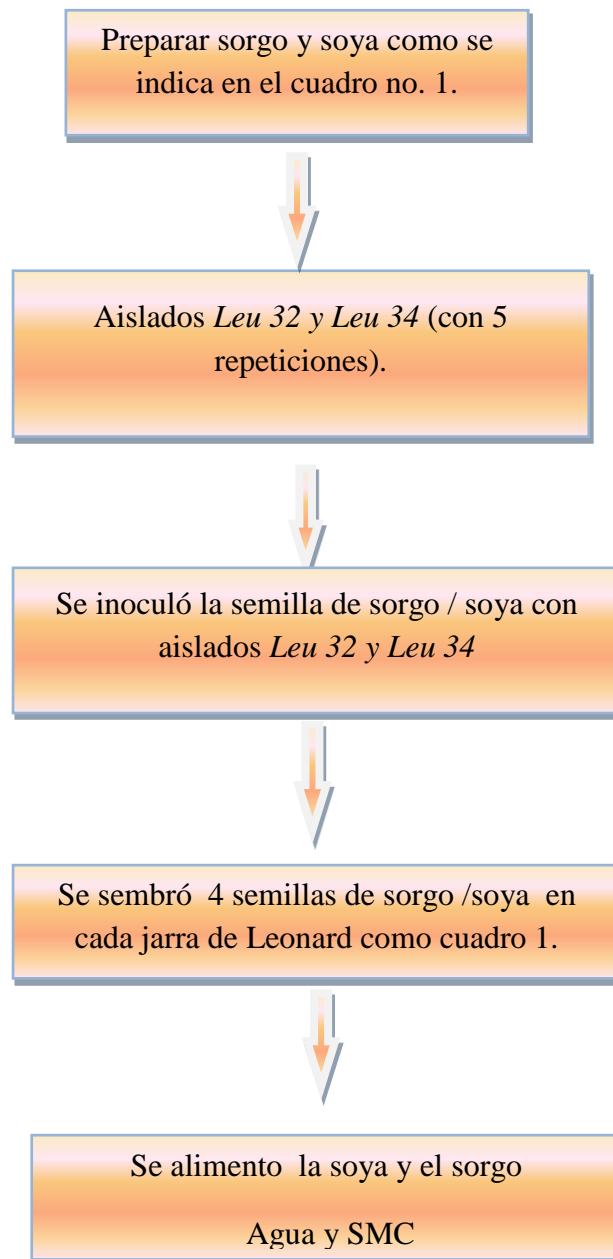
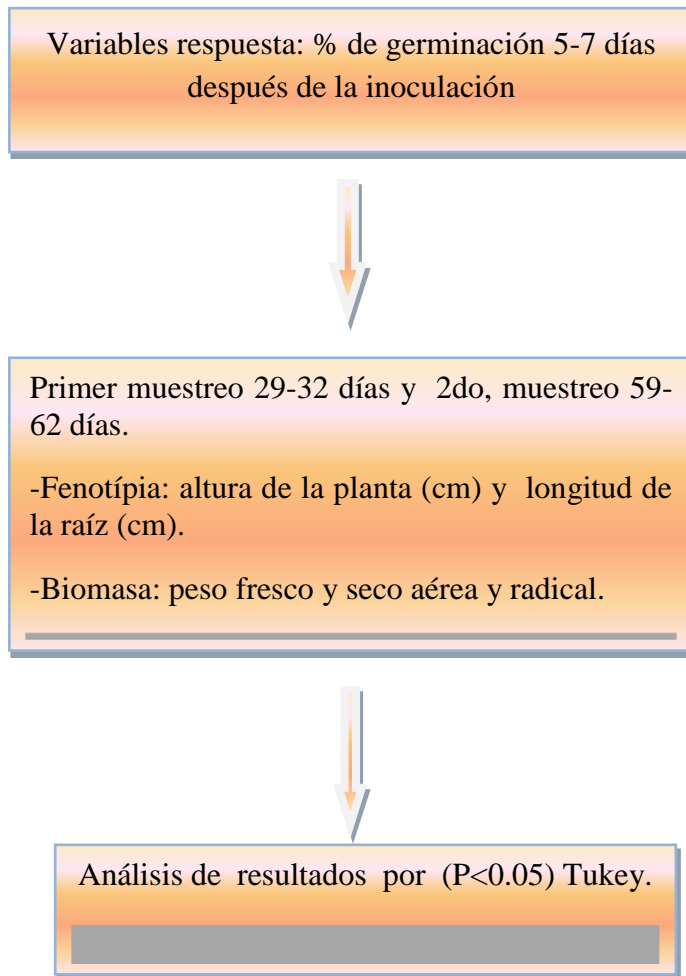


Figura 2. Diagrama Para evaluar la respuesta de sorgo y soja a la inoculación con aislados *Leu 32* y *Leu 34*.

Diagrama 2. Para evaluar la respuesta de sorgo y soya a la inoculación con aislados Leu 32 y Leu 34.





5.4. Inoculación de sorgo y soya con aislados *Leu 32* y *Leu 34*

Las semillas de sorgo y/o soya sembradas, se desinfectaron en Hipoclorito de sodio (Clorox^{MR}) al 6% (v/v)/10 minutos; se lavaron 6 veces con agua potable estéril, se dejaron en alcohol al 70% (v/v) 5 minutos y se enjuagaron con agua corriente estéril 6 veces Sánchez - Yáñez, 2007; se desinfectaron pinzas con Cloro al 3% (v/v) y Alcohol al 70% (v/v), para depositar semillas de sorgo y soya en bolsas de plástico de 250g; de acuerdo a los tratamientos del cuadro 1 posteriormente con una pipeta estéril de los aislados: *Leu 32* y *Leu 34* crecido en D

y D y ELMRC; inoculo un volumen de 1.0mL por cada 100 semillas, se mezclaron vigorosamente/20 min (Sánchez - Yáñez, 2007).

5.5. Siembra de sorgo y soya en jarras de Leonard.

Se depositaron 4 semillas de sorgo y soya en el suelo en jarras de Leonard como se indica en la figura 1c, posteriormente se colocaron en el solárium para su germinación por 5 - 7 días; figura 1e; al emerger las primeras dos hojas verdaderas se trasladaron al invernadero, donde crecieron 3 meses (Luna y Sánchez-Yáñez, 1995).

5.6. Variables respuesta usadas para el efecto de los *Leu 32* y *Leu 34* en sorgo y soya

Se consideró el porcentaje (%) de germinación de semillas del sorgo y de soya a los 11 días, luego se realizó el aclareo de plantas, que consistió en dejar dos plantas por jarra de Leonard, a plántula 32 días después de la siembra y en floración a los 62 días posteriores a su siembra; se midió la fenotípia aérea y radical de el sorgo y soya; altura de la planta (AP) y longitud radical (LR); además de la biomasa, el peso fresco aérea (PFA) y radical (PFR), posteriormente ambas partes se secaron en horno por 48/70 °C y se determinó el peso seco de la parte aérea (PSA) y radical (PSR) según (Sánchez-Yáñez., 2007).

5.7. Análisis estadístico de resultados.

Los resultados fueron sometidos al método de Tukey o Diferencia Mínima significativa (DMS) 0.05% (García *et al.*, 2001).

5.8. Identificación Bioquímica de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*

Se identificaron los aislados de *Leu 32* y *Leu 34*, mediante el sistema bioquímico API20NE, para bacterias Gram negativas, de 21 pruebas: reducción de nitrato (NO₃), triptófano (TRP), fermentación de glucosa (GLU), arginina dehidrolasa (ADH), ureasa (URE), hidrólisis de esculina (ESC), gelatinasa (GEL), β-galactosidasa (PNPG), D-glucosa (GLU), L-arabinosa (ARA), D-manosa (MNE), D-manitol (MAN), N-acetil-D-glucosamina (NAG), maltosa (MAL), D-gluconato (GNT), caprato (CAP), adipato (ADI), L-malato (MLT), citrato (CIT), fenilacetato (PAC). Se sembraron los aislados sospechosos de *Leu 32* y *Leu 34* en D y D y AELMRC. Se tomó una asada de cepas aisladas, se suspendió en 5 mL de sln NaCl al 0.85% de concentración. Se pusieron a agitar a 200 rpm por 48h; luego se tomó 0.1 mL (100 µL) suspensión de solución salina con el inóculo de *Leu 32* y *Leu 34* y se colocó en cada uno de los micro tubos, se incubaron las API20NE por 48 h a 32°C, se registraron los resultados (Salazar *et al.*, 2008).

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento de posibles cepas de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*.



Figura 2. *Azospirillum* sp *Leu 32* de *Leucena* sp, tinción Gram 100 X 48h/32°C en agar Doberainer y Day.

En la figura 2 se muestra el aislado de *Azospirillum* sp *Leu 32* en las raíces de *Leucena* sp, como bacilo corto o curvado Gram negativo en Agar D y D con colonias redondas, brillantes (Díaz-Franco y Ortigón-Morales., 2006)

Cuadro 2. Perfil bioquímico API 20NE de *Azospirillum* sp aislada de *Leucena* sp y *Azospirillum* spp reportada en la Literatura.

Pruebas bioquímicas	<i>Azospirillum</i> sp (aislada de <i>Leucena</i> sp)	<i>Azospirillum</i> spp (referencia)
Reducción de nitrato	+	+
Triptófano	+	+
Fermentación de glucosa	-	-
Arginina dehidrolasa	-	-
Ureasa	+	+
Hidrólisis de esculina	-	-
Gelatinasa	+	A
β-galactosidasa	+	A
Pruebas de asimilación de fuentes de carbono		
D-glucosa	-	-
L-arabinosa	+	A
D-manosa	+	A
D-manitol	-	-
N-acetil-D-glucosamina	+	A
Maltosa	-	-
D-gluconato	+	A
Caprato	+	+
Adipato	+	A
L-malato	+	A
Citrato	-	-
Fenilacetato	+	A
Producción de quiste	-	-

* Reacción (+)= positiva y Reacción (-)= negativa. *A= no considerada para el género

En la figura 3. Se muestra la morfología microscópica de *Rhizobium* sp *Leu 34*, aislada de la leguminosa *Leucena* sp orgánica del laboratorio del IIQB

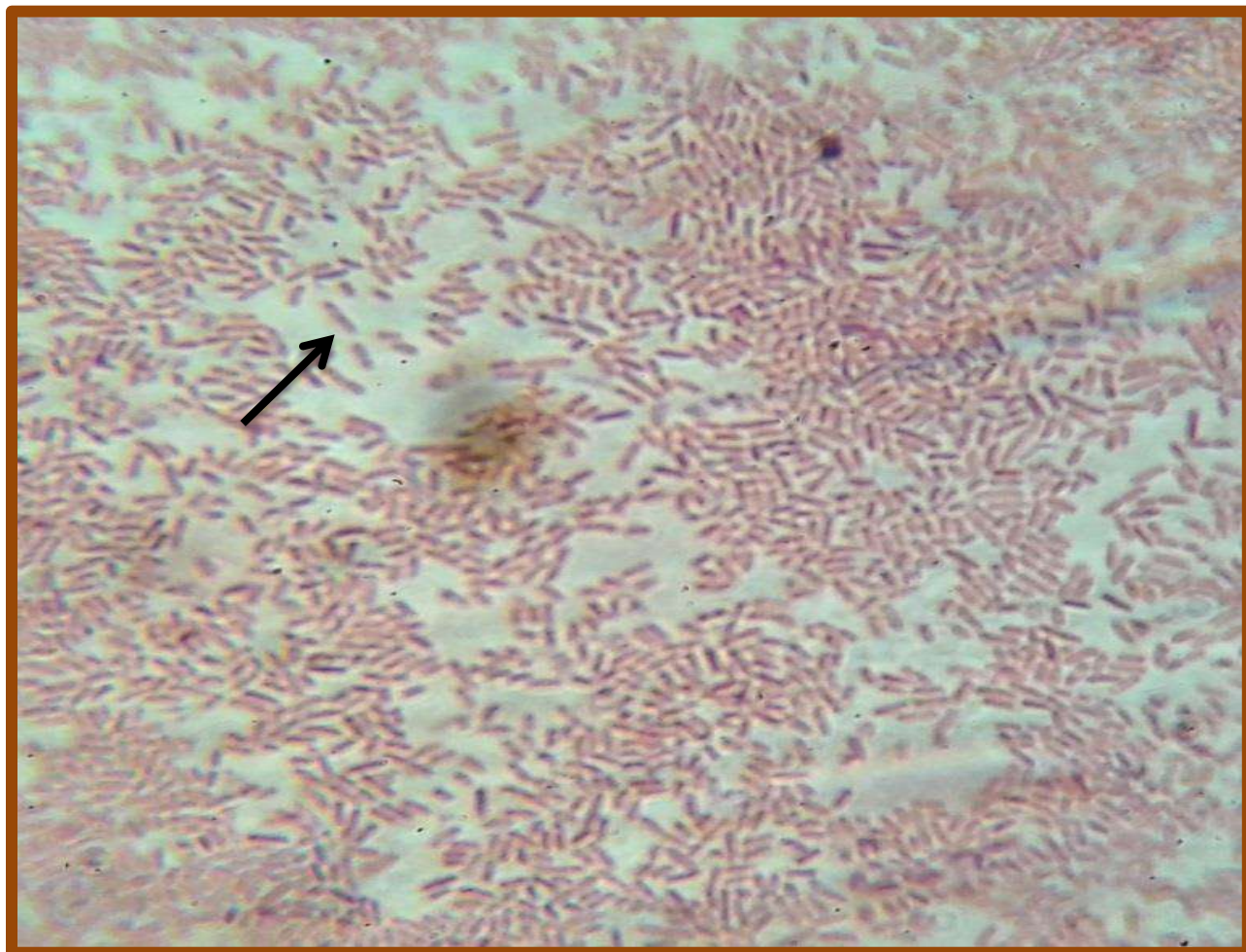


Figura 3. Morfología de *Rhizobium* sp *Leu 34* de *Leucena* sp a 100 X crecido en agar Extracto de Levadura Manitol y Rojo Congo 30h/32°C.

El género *Rhizobium* es un bacilo corto algunas veces pleomorfo, Gram negativo, aerobio, no forma espora, móvil por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral (Sánchez – Yañez., 2004)

Cuadro 3. Perfil bioquímico API 20 NE de *Rhizobium* sp aislada de *Leucena* y *Azospirillum* spp reportada en la Literatura.

Pruebas bioquímicas	<i>Rhizobium</i> sp (aislada de <i>Leucena</i> sp)	<i>Rhizobium</i> sp (Reportado en la literatura)
Reducción de nitrato	+	+
Triptófano	+	+
Fermentación de glucosa	+	+
Arginina dehidrolasa	+	+
Ureasa	+	+
Hidrólisis de esculina	+	A
Gelatinasa	+	A
β-galactosidasa	+	A
Pruebas de asimilación		
D-glucosa	+	+
L-arabinosa	+	+
D-manosa	+	+
D-manitol	+	A
N-acetil-D-glucosamina	+	A
Maltosa	-	-
D-gluconato	+	A
Caprato		A
Adipato		A
L-malato	+	+
Citrato	+	+
Fenilacetato		A

* Reacción (+)= positiva y Reacción (-)= negativa. *A= no considerada para el género.

6.2. Análisis de la inoculación del sorgo con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*

Cuadro 4. Respuesta de la semilla de sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas

Tratamiento del sorgo	Día	Porcentaje de germinación (%)
Control Absoluto	7 ^c	65 ^d
Control Relativo	6 ^b	75 ^c
<i>Azospirillum</i> sp	5 ^{a*}	100 ^{a*}
<i>Rhizobium</i> sp	6 ^b	90 ^b
<i>Rhizobium</i> sp + <i>Azospirillum</i> sp	5 ^a	100 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05% según Tukey. SMC: Solución mineral completa

En el cuadro 4, se muestra la respuesta del sorgo en función a los días de germinación: donde se observó que el coinoculado con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* germinó en 5 días; mientras que el empleado como CR sin inocular en 6 días, en tanto que en el % de germinación el sorgo coinoculado con los dos géneros de BPCV y su homólogo solo con *Azospirillum* sp *Leu 32* fue del 100%; mientras que el utilizado como CR fue solo del 75%. Lo anterior sugiere que efecto positivo de *Azospirillum* sp *Leu 32* y de la mezcla de este género y *Rhizobium* sp *Leu 34* fue debido a la transformación de algunos azúcares y aminoácidos liberados por la semilla o del llamado efecto esfermosfera en SPCV como lo reporta Askary *et al.*, 2009 en trigo en donde la coinoculación de *A. brasiliense* + *Rhizobium meliloti*, causaron una rápida y mayor de germinación de esta semilla, al igual Bécquer *et al.*, 2011 con la inoculación de *Rhizobium* en sorgo.

- Respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas a nivel de plántula.

Cuadro 5. A nivel de plántula: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre su fenotípia.

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud Radical (cm)
Control absoluto (agua)	22.8 ^e	21.8 ^d
Control relativo (SMC)**	29.8 ^d	25.2 ^c
<i>Azospirillum</i> sp	39.5 ^b	30.6 ^b
<i>Rhizobium</i> sp	33.5 ^c	30.3 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	48 ^{a*}	32.3 ^{a*}

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05%segun Tukey.** SMC = solución mineral completa

En el cuadro 5, a nivel de plántula se muestra la respuesta positiva del sorgo a la mezcla con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* en función de la altura de planta (AP) con 48cm; así como de la misma gramínea inoculada solo con *Azospirillum* sp *Leu 32* que registro una AP de 39.5cm; en tanto que con *Rhizobium* sp *Leu 34* la AP fue de 33.5 cm, estos valores fueron estadísticamente significativos al del sorgo utilizado como CR alimentada con una SMC con un AP de 29.8 cm. Respecto a la longitud radical (LR) del sorgo la mezcla de ambos géneros de BPCV causo una LR de 32.3cm valor estadístico significativo comparado con su homólogo tratado con *Azospirillum* sp *Leu 32* con una LR de 30.6cm. Cercano al valor de LR con 30.3 cm del sorgo inoculado con *Rhizobium* sp *Leu 34*, estos valores fueron estadísticamente significativos comparados con los del sorgo sin inocular empleado como CR con una LR de 25.2cm. La respuesta positiva del sorgo a *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*, sugieren que ambas BPCV transformaron sus exudados de raíz en SPCV (Bashan *et al.*, 2007), las que estimularon la elongación de esas raíces lo que mejoro la absorción del FN reducido al 50%, este resultado fue análogo a lo reportado por Benintende y Urlich., 2005 en soja coinoculado con *Bradyrhizobium japonicum* + *Azospirillum brasiliense*.

Cuadro 6. A nivel de plántula: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre su biomasa.

Tratamiento	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco radical (g)
Control absoluto (agua)	0.44 ^e	0.23 ^e
Control relativo (SMC)**	1.50 ^d	0.82 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	3.50 ^b	2.06 ^b
<i>Rhizobium</i> sp	2.19 ^c	1.59 ^c
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	3.73 ^a	2.85 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05% según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 6. A nivel de plántula se muestra la respuesta positiva del sorgo inoculado con *Azospirillum* sp *Leu 32*, en función de su peso fresco aéreo (PFA) con 3.50g, en tanto que su homóloga tratada con ambas BPCV tuvo un PFA de 3.70g; y la inoculada con *Rhizobium* sp *Leu 34* registro un PFA de 2.19 g; estos valores fueron estadísticamente significativos comparados con el sorgo sin inocular empleado como CR alimentado con una SMC con un PFA de 1.50 g. Mientras que el sorgo coinoculado con las ambas BPCV en su peso fresco radical (PFR) registro 2.85 g su homóloga tratada con *Azospirillum* sp *Leu 32* alcanzo un PFR de 2.06g ; y con *Rhizobium* sp *Leu 34* causo un PFR de 1.59 g; estos valores fueron estadísticamente significativos en comparación el sorgo no inoculado utilizado como CR con un PFR de 0.182g. El efecto positivo de *Azospirillum* sp *Leu 32* individualmente y mezcla con *Rhizobium* sp *Leu 34*, en sorgo sugiere que sus exudados radicales, fueron convertidos en SPCV lo que mejoro la absorción del FN al 50%, análogo a lo reportado por García *et al.*, 2005 en trigo y Santillán *et al.*, 2005 en tomate donde demostraron que este tipo de BPCV son útiles para reducir la dosis de FN sin afectar el crecimiento vegetal.

Cuadro 7. A nivel de plántula: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre la biomasa.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Control absoluto (agua)	0.18 ^e	0.19 ^e
Control relativo (SMC)**	0.35 ^d	0.41 ^c
<i>Azospirillum</i> sp	0.61 ^b	0.59 ^b
<i>Rhizobium</i> sp	0.41 ^c	0.22 ^d
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	0.90 ^{a*}	0.84 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05% según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 7. a nivel de plántula se muestra la respuesta positiva del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32*, en su peso seco aéreo (PSA) con 0.61 g mientras que su homólogo coinoculado este género y *Rhizobium* sp *Leu 34* alcanzó un PSA de 0.90 g, valores estadísticamente significativo comparados con el sorgo no inoculado empleado como CR alimentado con un PSA de 0.35g en contraste con la misma gramínea tratada con *Azospirillum* sp *Leu 32* con un PSA de 0.61g en tanto que sorgo coinoculado con las dos BPCV tuvo un PSR de 0.84 g; estos resultados indican que esta clase de géneros bacterianos asociados a plantas, al colonizar y dominar las raíces de esta gramínea mantuvieron con la síntesis de SPCV a pesar de reducir la dosis del FN al 50% resultado análogo a lo reportado por Benintende *et al.*, 2010 en soya coinoculada con *Bradyrhizobium japonicum* + *A. brasiliense*, al igual que Ferlini., 2005 en sorgo tratado con *A. brasiliense*.

Cuadro 8. A nivel floración: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas en su fenotípica.

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud Radical (cm)
Control absoluto (agua)	34.3 ^e	27.9 ^d
Control relativo (SMC)**	35.5 ^d	29 ^c
<i>Azospirillum</i> sp	49 ^b	36 ^b
<i>Rhizobium</i> sp	46 ^c	35 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	60 ^a	38.5 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05%segun Tukey.**SMC = solución mineral completa

En el cuadro 8. Se muestra a nivel de floración la respuesta positiva del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* en función de su AP con 49 cm y de LR con 36 cm, la misma gramínea tratada con *Rhizobium* sp alcanzo una AP de 46 cm, una LR de 35cm mientras que su homólogo coinoculado con ambos géneros de BPCV la AP fue de 60 cm y la LR de 38.5 cm, ambos valores fueron estadísticamente significativos comparada con la AP de 35.5 cm y la LR con 29 cm de la misma gramínea utilizada como CR tratada con una SMC. En este cuadro fue evidente el efecto positivo de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* en la fenotípica del sorgo, porque existe evidencia que demuestra que ambos géneros utilizan los exudados generados en su rizosfera para su conversión en SPCV, con lo que se obtiene una respuesta de la planta positiva al igual que lo reportado Santillán *et al.*, 2005 en inoculado con esta clase de BPCV tomate.

Cuadro 9. A nivel floración: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas en su biomasa.

Tratamiento	Peso fresco aéreo(g)	Peso fresco radical (g)
Control absoluto (agua)	2.74 ^e	1.41 ^e
Control relativo (SMC)**	7.44 ^c	4.75 ^b
<i>Azospirillum</i> sp	7.54 ^b	3.67 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	5.00 ^d	1.4 ^d
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	11.55 ^a	5.76 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05%segun Tukey.**SMC = solución mineral completa

En el cuadro 9. Se muestra la respuesta del sorgo a nivel de floración a la coinoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* en donde el valor del PFA fue de 11.55 g, valor estadísticamente diferente a la misma sin inocular empleada como CR alimentada con una SMC con un PFA de con 7.44 g. Mientras que el PFR del sorgo coinoculado con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* fue de 5.76 g, valor estadísticamente significativo en comparación con el PFR con 4.75 g del sorgo sin inocular utilizado como CR tratado con una SMC: estos resultados sugieren que *Azospirillum* sp *Leu 32* tuvo una afinidad por los exudados radicales del sorgo para su conversión en SPCV; mientras que el efecto positivo de la coinoculación en la gramínea con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* al 50% el FN lo que sugiere que en el rizoplano del sorgo el tipo de SPCV generadas, por ambos géneros de BPCV favoreció un desarrollo radical acelerado con una mejor capacidad de captación del FN y otros minerales para un crecimiento sano de esta gramínea análogo a lo reportado por Sánchez *et al.*,(2006) en trigo coinoculado con este tipo de BPCV, y Benintende Y Ulrich.,(2005) en soya coinoculada con *Bradyrhizobium japonicum* + *A. brasiliense*.

Cuadro 10. A nivel floración: respuesta del sorgo a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas en su biomasa.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Control absoluto (agua)	0.52e	0.32e
Control Relativo (SSMC)**	1.59c	0.53d
<i>Azospirillum</i> sp	1.79b	1.10b
<i>Rhizobium</i> sp	1.07d	0.79c
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	3.17 ^a	1.62 ^a

*Valores con letras distintas tuvieron diferencia estadística ($P < 0.05$) según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 10. A nivel floración el sorgo tuvo una respuesta positiva a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32*, en función de su PSA con 1.79g, mientras que su homólogo coinoculado con este género y *Rhizobium* sp *Leu 34* registro un PSA de 3.17g, valores estadísticamente significativos y distintos comparado con el sorgo no inoculado empleado como CR alimentado con una SMC tuvo un PSA de 1.59g; en contraste con la misma gramínea tratada con *Azospirillum* sp *Leu 32* que un PSR registro 1.10g en tanto que el sorgo coinoculado con las dos BPCV alcanzo un PSR de 1.62g; estos resultados indican que *Azospirillum* sp *Leu 32* individual y *Rhizobium* sp *Leu 34*, causaron un efecto benéfico en el sorgo, debido a la conversión de sus exudados radicales en SPCV, las que mejoraron la absorción de las raíces del FN reducido al 50%, no obstante hubo un incremento en la biomasa de la gramínea, análogo a lo reportado por Benintende *et al.*, (2010) al obtener el efecto positivo de la coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasiliense* en soya.

6.3. Análisis de la inoculación de soya con *Azospirillum* sp *leu 32* y *Rhizobium* sp *leu 34*.

Cuadro 11. Respuesta de la semilla de soya a la inoculación con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas

Tratamiento	Día	Porcentaje de germinación (%)
Control Absoluto (agua)	7 ^d	65 ^c
Control Relativo (SMC)**	6 ^c	75 ^b
<i>Azospirillum</i> sp	5 ^b	100 ^{a*}
<i>Rhizobium</i> sp	4 ^a	100 ^a
<i>Rhizobium</i> sp + <i>Azospirillum</i> sp	5 ^b	100 ^a

*Letras distintas indican diferencia significativa. al 0.05% según Tukey. SMC: Solución mineral completa

En el cuadro 11, se muestra la respuesta de la soya en función a los días de germinación: donde se observó que la inoculada con *Rhizobium* sp *Leu 34* germinó en 4 días, así como la soya coinoculada con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* germinó en 5 días; mientras que el usado como CR sin inocular en 6 días, en tanto que en él % de germinación de la soya coinoculada con los dos géneros de BPCV y su homólogo inoculado individual con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* fue del 100%; mientras la soya usada como CR fue solo del 75%. Lo anterior sugiere que efecto positivo de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34*, así como de la mezcla de ambos géneros fue debido a la transformación de algunos azúcares y aminoácidos liberados por la semilla o del llamado efecto espermosfera en SPCV como lo reporta Aksaray *et al.*, 2009 en trigo en donde la coinoculación de *A. brasiliense* + *Rhizobium meliloti*, causaron una rápida y mayor de germinación de esta semilla, al igual Bécquer *et al.*, 2011 con la inoculación de *Rhizobium* en sorgo.

Cuadro 12 .Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre la fenotípica de la soya a nivel de plántula.

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud Radical (cm)
Control absoluto (agua)	26.3 ^e	15.3 ^d
Control relativo (SMC)**	30.1 ^d	15.7 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	32.6 ^c	16.5 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	35b	17.5 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	38.7 ^a	42.2 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. ** SMC = solución mineral completa

En el cuadro 12. Se muestra el efecto positivo de la inoculación de *Rhizobium* sp *Leu 34* sobre la altura de la planta (AP) se soya con 35 cm, mientras que su homóloga coinoculada con este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* registro 38.7cm de AP, ambos valores fueron estadísticamente significativos comparados con la soya no inoculada y alimentada con la SMC empleada como CR con 30.1cm de AP, a pesar de reducir la dosis del FN al 50%. Respecto a la LR de la leguminosa se observó que *Rhizobium* sp *Leu 34* causo 17.5 cm de LR; cuando la homologa se coinoculo registro una LR de 42.2cm; estos resultados indican que *Rhizobium* sp y en combinación con *Azospirillum* sp *Leu 32*, indujeron un efecto positivo en la soya al transformar algunos de sus exudados radicales en SPCV como lo reporta Benintende *et al.*, 2010 demostraron que la coinoculación de soya con *Bradyrhizobium japonicum* y *A. brasiliense* mejoro su crecimiento como una opción adicional a solo emplear *B japonicum*.

Cuadro 13. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre la biomasa de la soya a nivel de plántula, con una dosis 50 % del FN.

Tratamiento	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco radical (g)
Control absoluto (agua)	1.20 ^e	0.64 ^d
Control relativo (SMC)**	1.26 ^c	0.66 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	2.27 ^c	0.80 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	2.32 ^b	0.88 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	5.62 ^a	1.96 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. ** SMC = solución mineral completa

En el cuadro 13. Se muestra el efecto positivo de *Rhizobium* sp *Leu 34*, en el PFA de la soya con 2.32g; mientras que su homóloga coinoculada con este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* tuvo un PFA de 5.62g, valor estadísticamente significativo comparado con la soya no inoculada empleada como CR con 1.26g de PFA; mientras que cuando la leguminosa se inoculó con *Rhizobium* sp *Leu 34* se registró un PFR de 0.88g; en tanto que la soya tratada con ambas BPCV tuvo un PFR de 1.96g superior a su homóloga sin inocular empleada como CR con 0.66g de PFR; lo anterior sugiere que los sus exudados radicales de la soya fueron convertidos en SPCV lo que mejoró la absorción del FN a pesar de reducirlo al 50% como se reportado en soya coinoculada (Askaray *et al.*, 2009; Benintende *et al.*, 2010 Bequer *et al.*, 2011).

Cuadro 14. Efecto de inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas sobre la biomasa de soya a nivel de plántula.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Control absoluto (agua)	0.31 ^d	0.07 ^d
Control relativo (SMC)**	0.63 ^c	0.09 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	0.33 ^d	0.27 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	1.63 ^b	0.41 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	1.80 ^a	0.75 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. ** SMC = solución mineral completa

En el cuadro 14. Se muestra el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sp *Leu 34* sobre el PSA de la soya con 1.63g mientras que la misma leguminosa inoculada con este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* registró un PSA de 1.80g; estos valores fueron estadísticamente significativos comparados con la misma leguminosa sin inocular usada como CR con 0.63g de PSA; en tanto que la soya tratada con *Rhizobium* sp *Leu 34* alcanzó 0.41g de PSR; la homóloga coinoculada con estos géneros de BPCV alcanzo 0.75g de PSR, mientras que la soya sin inocular usada como CR tuvo un PSR de 0.09g, lo anterior indica que *Azospirillum* sp y *Rhizobium* sp transformaron los exudados radicales de la soya en SPCV, para estimular la proliferación de pelos radicales y aumentar la absorción del FN a pesar de que se redujo al 50%, como se ha reportado tanto en gramíneas como leguminosas cuando se han empleado esta clase de géneros de BPCV (Askaray *et al.*, 2009; Bequer *et al.*, 2011)

Cuadro 15. Efecto de inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* sobre la fenotipia de soya a nivel de floración a dosis reducida del FN al 50%

Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud Radical (cm)
Control absoluto (agua)	33.9 ^c	24.5 ^d
Control relativo (SMC)**	39.3 ^c	25.7 ^c
<i>Azospirillum</i> sp	38 ^d	28.9 ^b
<i>Rhizobium</i> sp	43.3 ^b	34 ^a
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	44.7 ^a	33.8 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 15. Se muestra el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sp *Leu 34* en soya sobre su AP con 43.3cm, mientras que la homóloga coinoculada con *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* alcanzó una AP de 44.7 cm, ambos valores fueron estadísticamente significativos con su homóloga sin inocular utilizada como CR que alcanzó 39.3cm de AP. Respecto al sistema radical cuando *Rhizobium* sp *Leu 34* se inoculó en soya alcanzó 34 cm de LR, mientras que la soya coinoculada de este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* alcanzó 33.8 cm de LR; estos valores fueron estadísticamente significativos comparados con la misma leguminosa sin inocular usada como CR que alcanzo 25.7 cm de LR, lo anterior se sugiere que estos géneros de BPCV transformaron los exudados radicales de la soya en SPCV, las que mejoraron la absorción del FN reducido al 50% sin causar un impacto negativo en el crecimiento de la soya como lo reportan Santillan *et al.*, 2005 cuando se usa *Azospirillum* y *Rhizobium* en leguminosas como gramíneas con y sin reducción de la dosis del FN. Respecto al sistema radical cuando se coinoculo *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* en soya registro una LR de 33.8 cm, comparado con la homóloga sin inocular usada como CR que registro una LR de 25.7, lo cual indica que estos géneros de BPCV transformaron los exudados radicales de la soya en SPCV y como consecuencia incrementaron la capacidad de absorción radical de la leguminosa a pesar de reducir la dosis del FN al 50% (Benintende y Urlich., 2005)

Cuadro 16. Efecto de inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas en la biomasa de soya a nivel de floración

Tratamiento	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco radical (g)
Control absoluto (agua)	7.65 ^d	2.83 ^e
Control relativo (SMC)**	9.54 ^c	4.50 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	12.42 ^b	6.37 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	12.60 ^b	9.60 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	14.33 ^a	12.49 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 16. Se muestra el efecto que la inoculación de soya con *Rhizobium* sp *Leu 34*, donde se registró 12.60 g de PFA; en tanto que la coinoculación de este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* en soya registró 14.33 g de PFA, valores estadísticamente significativa a los de la misma leguminosa sin inocular utilizada como CR con 9.54 g de PFA; el efecto de coinoculación ambas BPCV en soya causó un 12.49 g de PFR, mientras que la misma leguminosa sin inocular empleada como CR solo causó 4.50 g PFR a una dosis del FN reducida al 50%, lo anterior indica que *Azospirillum* sp como *Rhizobium* sp se reportan con la capacidad de convertir los exudados radicales de la soya en SPCV (Askaray *et al.*, 2009; Bequer *et al.*, 2011)

Cuadro 17. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* y la mezcla de ambas en la biomasa de soya a nivel de floración.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Control absoluto (agua)	1.17 ^e	0.68 ^e
Control relativo (SMC)**	1.85 ^d	1.04 ^d
<i>Azospirillum</i> sp	3.57 ^b	1.09 ^c
<i>Rhizobium</i> sp	2.77 ^c	1.34 ^b
<i>Azospirillum</i> sp + <i>Rhizobium</i> sp	3.90 ^a	2.44 ^a

*Valores con diferentes letras con diferencia estadística (P<0.05) según Tukey. **SMC = solución mineral completa

En el cuadro 17. Se presenta el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sp *Leu 34* sobre la biomasa de soya, con 2.77g de PSA, mientras la coinoculación de este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* en esta leguminosa causo 3.90 g de PSA, valor estadísticamente significativo a la soya sin inocular utilizada como CR con 1.85 g de PSA; mientras que se registró un efecto positivo de la inoculación de *Rhizobium* sp *Leu 34* en soya con 1.34 g de PSR; la coinoculación de este género y *Azospirillum* sp *Leu 32* en esta leguminosa registró 2.44 g de PSR, valores superiores estadísticamente a la soya sin inocular, usada como CR con 1.04g de PSR, lo anterior indica que estos géneros de BPCV transformaron los exudados radicales de esta leguminosa en SPCV, lo que mejoro su capacidad de absorción del FN a no obstante que se redujo al 50%, hecho observado no solo con la inoculación de *Rhizobium* sp en leguminosas sino también con *Azospirillum* sp que también causa efecto benéficos en el crecimiento de gramíneas (Askaray *et al.*, 2009; Benintende *et al.*, 2010)

7.- Conclusión

Azospirillum sp *Leu 32* y *Rhizobium* sp *Leu 34* aisladas de *Leucena* sp han sido benéficas para el crecimiento del sorgo y soya. Los resultados mostrados indican que la doble inoculación mejoró en sorgo y soya la absorción radical del FN al 50%

8.- Literatura citada

Askary. M., Monstajeran. A., Amouaghaei. R., Mostajeran., 2009. Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on Grain Yield and N, P, K Content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). Journal Agriculture & Environmental Scientific 5: 296 - 307.

Bashan. Y., Holguin. G., and Bashan. L.E., 2004 *Azospirillum*. plant relation ships physiological, molecular, agricultura and environmental advances. Canadian Journal Microbiology. 50: 521-577

Bécquer c. j., Ávila U., Palmero L.A., Nápoles J. A., Ramos Y., Pasarònforraje I., Ulloa L. 2011. Efecto de la inoculación con *rizobios* procedentes de Alberta Canadá en sorgo (*Sorghum bicolor* L. *Moench*) en condiciones de campo. Revista pastos y Forraje 34 : 3

3.- Benintende S y Ulrich W., 2005. Aplicación de *A. brasiliense* en cultivo de soya en co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. Revista Científica Agropecuaria 9: 71-75.

4.- Benintende S., Uhrich W., Herrera M., Gangge F., Sterren M. y Benintende M. 2010 Comparación entre co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasiliense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soya. Revista ciencia del suelo 27 : 2

5.- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of soil Biology* 45: 28-35.

6.- Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Madrigal, T., Añorve-Morga, J., Beltrán-Hernández, R. 2008. Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. *Bioagro*. 20:201-208.

7.- Cuadrado B., Rubio G., Santos W., 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas* 38:78-104 .

8.- De Luna E.G., Peña C, J.J., Sánchez-Yáñez, J.M. 2006. Selección de aislados nativos de *Rhizobium etli* resistentes a Diazinon.. <http://www.monografias.com/trabajos34/raices-frijol/raices-frijol.shtm>

9.- Diaz –Franco. A., Gaza. I., Pecina. V., Montes. N., 2008. Respuesta del sorgo a *micorriza arbuscular* y *Azospirillum* en estrés hídrico. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 35 – 42..

Int edition. Lippincott William &Wilkins, pp. 66, 88, 124.

Diaz-Franco. A. y Ortegon-Morales. A., 2006. Effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* and chemical fertilization on canola (*Brassica napus*) growth and yield. 29(1): 63-67.

11.- Ferlini. H., 2005 Inoculación con *Azospirillum brasilense* sp en el cultivo de maíz.

Disponible en : www.ergomix.com/MA-agricultura/maiz/articulos/inoculaciòn-con-Azospirillum-brasiliense-t1158/417-p0htm

- 12.- García – González. M Sánchez-Yáñez. J., Peña-Cabriales. J. y Moreno-Zacarías. P., 1995. Respuesta del maíz (*Zea mays L.*) a la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno. *Terra* 13: 71-80
- 13.- García-González, M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales. J., Sánchez-Yáñez, J., 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra* 23:65-72
- 14.- Garcia, J.A., Castillo, A., Ramírez, M. E., Rendón, G., Larqué, M. U. 2001. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, HSU y Bechhofer para selección de medias. *Agrociencia* 35:79-86
- 15.- Garcia - Olivares J., Moreno – Medina V. R., Rodriguez – Luna I., Mendoza – Herrera A., Mayek –Perez N., 2007. Efecto de *Azospirillum brasiliense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Revista fitotecnica mexicana*. 30: 305-310.
- 16.- Gonzalez Arias G., 2012 Enfermedades virales cuarentenaras para Cuba en los cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris L*) y soya (*Glycine max L*). merr II). *Fitosanidad* 16 -1.
- 17.- Jaramillo C., 2006. Soya (*Glycine maxL*) Merrill). Alternativas para los sistemas de Producción de la Orinoquia Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Agricultura y desarrollo rural, Bogota (Colombia). pp 15 – 20,
- 18.- Luna, O.H.A. y Sánchez-Yáñez, J.M. 1995. Manual de prácticas de microbiología del suelo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1era. ed. Monterrey, N.L. México (Inédito).
- 19.- Martínez. D., Adriano. A., Figueroa. M., 2000. Caracterización bioquímica e isoenzimática de cepas de *Azospirillum* sp. Disponible en: www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_XII/CARTEL/CXII-7.pdf

20.- Perez – Castañeda L., Hernández C., Mendoza A., 2011. Variabilidad genética de aislamientos no-típicos de *Azospirillum brasilense* por análisis PCR-RFLP del ADN 16S ribosomal Revista International de botánica experimental international Journal of experimental Botany. 80: 27 – 34.

21.- Posada-Campos, S., Ramírez, C., Peña-Cabriales. J., FaríasRodríguez. R., y Sánchez-Yáñez. J., 2002. Aislamiento y efecto de inoculación de maíz con bacterias benéficas de raíz. Cuatro Vientos 30: 24-28

22.- Ramírez, J., Sáinz, R. A., 1995. La solarización como herramienta para el control de malezas, patógenos y plagas del suelo. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/solarizacion-malezas/solarizacion-malezas3.shtml>.

23.- SAGARPA., 2012. Disponible en: www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id255&Itemid=95.

Sánchez-Yáñez J. M., 2004. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos33/crecimiento-vegetal/crecimiento-vegetal.shtml>.

Sánchez – Yáñez J. M., García M., Carrillo A. 2006 *Azospirillum* spp coloniza la rizósfera de trigo (*Triticum aestivum* L) var pavón y promueve su crecimiento. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos40/colonización-rizosfera/colonización-rizosfera.shtml>

Sánchez-Yáñez J.M., 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. Microbiología ambiental, IIQB-UMSNH, COSUSTENTA, CUDEM pp: 127-135. ISBN: 978-970-95424-1-7. Morelia, Mich, México.

26.- Salazar, E. Z., Nieves, B., Ruíz, J., Vila, J. 2008. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Sociedad Venezolana de Microbiología. 28:89-95.

27.- Santillán N., Arellano C., Zúñiga D. 2005 Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum Miller*) Ecología Aplicada. 4(2)pp. 47-51,
de america latina, el Caribe, España y Portugal sistema de información científica. 4:47-51.

28.- Triana J., 2009. La soya.

Disponible en:

<http://books.google.es/books?id=Iqx3S3KhcRgC&printsec=frontcover&dq=soya&hl=es&a=X&ei=DyG9T7bQI4rysQLo5S0Cw&ved=0CEEQ6AEwAg#v=onepage&q=soya&f=false>

29.- Zago. M., Iglesias. M., Leconte. M., Lopez. J., 2006. Inoculación y co – inoculación de sorgo. Catedra de Microbiología agrícola. Universidad nacional del noreste, comunicaciones científicas y tecnológicas. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/05-Agrarias/2006-A-042.pdf>