

Respuesta de Tres Híbridos Comerciales de Maíz a la Inoculación con *Azospirillum*¹

I. García de Salamone*, M.A. Monzón de Asconegui**,
M. Zawosnik**, M. Zanchetti**

ABSTRACT

In order to analyse the influence of *Azospirillum* inoculation interacting with nitrogen fertilization on corn, a field trial using three bacterial strain and Dekalb 3F-22, Cargill R-157 and Continental RF-88 corn hybrids was carried out. Yield and its components, biomass and nitrogen content in the grain, were the parameters assessed. Among them, only the yield component 1000-kernel weight showed significant differences for the "hybrid x strain x fertilization" interaction. While Dekalb 3F-22 and Cargill R-157 reached the highest 1000-kernel weights with nitrogen supplied and when inoculated with strains 10M and 59, respectively, Continental RF-88 reached its highest weight with strain 7M and without fertilization. Field nitrogen fixation, which was estimated considering the acetylene reduction activity exhibited by samples taken at the flowering stage, was significantly higher for inoculated treatments, exceeding that of the control unit in 91% in case of unfertilized plots. The most remarkable effect of inoculation, however, was noticed in terms of root development by means of a pot experiment, which showed an increase of 100% and 150% in the root surface area of Dekalb 3F-22 plants inoculated with strains 7M and 10M, respectively.

Key words: Maize, *Azospirillum*, inoculation, nitrogen fertilization, nitrogen fixation.

COMPENDIO

Para determinar la influencia de la inoculación con *Azospirillum* en interacción con la fertilización nitrogenada sobre el cultivo de maíz, se realizó un ensayo de campo empleando tres cepas bacterianas y los híbridos Dekalb 3F-22, Cargill R-157 y Continental RF-88. Los parámetros evaluados fueron el rendimiento y sus componentes, la biomasa y el contenido de proteína en el grano. De ellos, el único que mostró diferencias significativas, para la interacción híbrido x cepa x fertilización, fue el componente del rendimiento peso de 1000 semillas; alcanzando el Dekalb 3F-22 y el Cargill R-157 los valores máximos con agregado de N e inoculados con cepas 10M y 59, respectivamente. Por el contrario, Continental RF-88 presentó el pico para peso de 1000 granos sin fertilización y en interacción con la cepa 7M. La fijación del N al campo, estimada con base en la actividad de reducción del acetileno y determinada en muestras tomadas en floración, fue significativamente mayor en los tratamientos inoculados, y superó a la del control en 91% en las parcelas sin fertilizar. Sin embargo, el efecto más destacado de la inoculación se obtuvo en el desarrollo radical en un ensayo en macetas; observándose para el híbrido Dekalb 3F-22 incrementos en su superficie radical del 100% con la cepa 7M y del 150% con la cepa 10M.

Palabras clave: Maíz, *Azospirillum*, inoculación, fertilización nitrogenada, fijación de nitrógeno.

INTRODUCCION

Diversos autores han expuesto los efectos benéficos en los rendimientos por asociación de bacterias del género *Azospirillum* con raíces de gramíneas forrajeras y de grano en condiciones de campo (1, 17, 20). En la mayoría de los casos, los incrementos hallados fueron alrededor del 20%, sin embargo en algunos trabajos se señalan aumentos de hasta un 60% (19).

Azospirillum es un activo fijador de N en condiciones de laboratorio microaeríferas. Por ello, en general, se atribuye como respuesta la inoculación a la fijación biológica de N atmosférico (FBN); no obstante existen opiniones dispares en este sentido. Según Von Bullow y Dobereiner (23) y Rennie (21), la fijación de N en el cultivo de maíz desempeña un papel importante, pero se manifiesta en forma diferente de acuerdo con el genotipo considerado. Asimismo, Dobereiner y Baldani (7), y Freitas *et al.* (9) observaron mayor rendimiento y acumulación de N en el grano al inocular maíz con cepas obtenidas de raíces esterilizadas de este cereal frente a otras aisladas de suelo rizosférico.

Por otra parte, en plantas de trigo, Kapulnik *et al.* (10) verificaron la existencia de un marcado efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre el largo, área y grado de ramificación radical, aspectos relacionados con la producción de sustancias hormonales, tales como

¹ Recibido para publicación el 15 de enero de 1991.
Los autores agradecen al Ing. Agr. E. Dellepiane por su colaboración en el manejo del cromatógrafo de gases.
Este trabajo fue subsidiado por la SECYT (res 275/86) y apoyado por la empresa Ryzobacter Argentina S.A.
* Cátedra de Cerealicultura; Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires; Av. San Martín 4453, (1417) Capital Federal, Arg.
** Cátedra de Microbiología; Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires; Av. San Martín 4453, (1417) Capital Federal, Arg.

auxinas, giberelinas y citoquininas (22). Esta estimulación en el desarrollo radical podría implicar un considerable incremento en el potencial de absorción de agua y nutrimentos por parte de la planta.

Dobereiner (8) señala que *Azospirillum* reduce activamente el NO_3 , facilitando, de esta manera, su asimilación desde el suelo. Se supone que esta activa reducción de nitratos en las raíces de plantas inoculadas puede atribuirse a la actividad de la enzima nitrato reductasa de la bacteria (3). Esto podría relacionarse con el aumento de la eficiencia de los fertilizantes nitrogenados en formas nítricas y amoniacales, que, en el caso de maíz, puede oscilar alrededor de un 40% (6). En este sentido Millet y Feldman (14), Pacovsky *et al.* (18) sugieren la posibilidad de combinar los efectos, aún no definidos, de la inoculación con *Azospirillum* y la práctica de la fertilización, pues han observado una mejor respuesta a la inoculación cuando se aplica un fertilizante nitrogenado en condiciones de campo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum* spp. sobre varios atributos de tres híbridos comerciales de maíz de amplia difusión, en la zona maicera núcleo de Argentina. Para ello se realizaron dos experimentos, uno de campo y otro en macetas.

MATERIALES Y METODOS

Experimento de campo

En el campo experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Arg., se efectuó el experimento de campo. El lote considerado pertenece a la serie Pergamino, con alteraciones debidas al uso intensivo del suelo, durante 15 años de cultivo de maíz; el contenido de nitratos al momento de la siembra fue de 65 partes por millón.

El experimento tuvo un arreglo factorial $3 \times 4 \times 2$, donde las variables consideradas fueron tres híbridos de maíz, cuatro tratamientos de inoculación y dos niveles de fertilización nitrogenada. El diseño estadístico esco-

gido fue de bloques completos alatorios con cuatro repeticiones.

Los híbridos de maíz empleados fueron Dekalb 3F-22, Cargill R-157 y Continental RF-88. (Para facilitar la lectura del texto, se designan a los híbridos como: Dekall, Cargill y Continental).

Los cuatro tratamientos de inoculación corresponden a tres cepas de *Azospirillum* y un testigo sin inocular. Las cepas utilizadas fueron las nativas 7M y 10M, identificadas como *A. brasilense*, y la cepa 59 de *A. lipoferum* proporcionada por el Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (CNPBS) de la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA), Río de Janeiro, Bra. Las cepas 7M y 10M fueron aisladas de raíces esterilizadas de cultivos de maíz ubicados en la localidad bonaerense de Junin, según la metodología descrita por Okon *et al.* (16).

Los dos niveles de fertilización nitrogenada considerados fueron 0 kg y 100 kg, como urea al volco, 23 días después de la siembra (21 de octubre de 1987). Cada unidad experimental, de 21 m², constaba de cuatro hileras distanciadas a 0.70 m; la distancia entre plantas fue de 0.26 m, representando una densidad de 52 000 plantas por hectárea.

La inoculación se realizó con la siembra, colocando al costado de la semilla una dosis masiva de inoculante preparado con base en turba estéril impregnada con el correspondiente caldo bacteriano. Para obtener el caldo bacteriano, cada cepa se cultivó por espacio de 36 h en malato líquido (16), con 1 g l⁻¹ de cloruro de amonio (NH_4Cl), a 30°C bajo agitación continua.

El contenido de humedad del inoculante fue del 50% y la concentración bacteriana fue de 4×10^7 ufc por gramo de producto.

Entre las labores culturales aplicadas se incluye una escardillada y un aporque; el control de malezas se realizó en forma manual.

En el Cuadro 1 se presentan los datos de precipitaciones a lo largo del ciclo del cultivo.

Cuadro 1. Precipitaciones durante el ciclo del cultivo.

| | Set. | Oct. | Nov. | Dic. | Enero | Feb. | Marzo | Abril |
|--------------------|------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|
| Agua caída | 12.9 | 120.7 | 129.5 | 92.6 | 71.3 | 63.2 | 382.2 | 53.9 |
| Días precipitación | 2 | 10 | 9 | 12 | 8 | 10 | 18 | 7 |

El efecto de la inoculación fue estimado en función de la medida del rendimiento y de sus componentes, del contenido proteico del grano y de la producción de biomasa. Este último parámetro fue evaluado en floración y después de la madurez fisiológica.

Para calcular el rendimiento en grano se contaron las espigas de la parcela cosechable de 10 m²; y se estimó el número de hileras por espiga, el de granos por hilera y el peso de 1000 granos (P-1000), con base en cuatro plantas de cada parcela tomadas al azar. También se calculó el número de espigas por planta.

El porcentaje de proteína del grano se estimó de acuerdo con el contenido de N determinado por el método microkjeldahl (15).

La biomasa producida se estimó calculando el peso seco de cuatro plantas tomadas de una de las hileras centrales de cada parcela, secando el material vegetal en estufa a 70°C hasta obtener un peso constante.

Con el fin de evaluar la capacidad del método de reducción de acetileno para detectar diferencias en la FBN en condiciones de campo, se comparó la producción de etileno por planta y por hora de cuatro tratamientos incluidos en el experimento. Estos tratamientos fueron del híbrido Dekalb sin inocular e inoculado con la cepa 7M, con y sin aplicación de fertilizante nitrogenado. Para ello se emplearon cilindros metálicos de 14.5 cm de diámetro y 21 cm de altura. Los mismos fueron introducidos en el suelo, a través de la planta en floración; posteriormente se extrajeron con ayuda de una pala. Las muestras así obtenidas se humedecieron hasta capacidad de campo. Transcurridos tres días, se cortó y se descartó de las muestras la parte aérea; luego se incubaron en invernáculo durante 24 h con 10% de gas acetileno, calculado sobre un tercio del volumen del cilindro vacío. En cada extremo del cilindro, se le adosó en forma hermética una tapa metálica; de ellas, la superior tenía una válvula que permitía la inyección del gas. Después de la incubación, se determinó la producción de etileno en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 881.

Experimento en macetas

Se utilizaron macetas de polietileno color negro de 15 l de capacidad con vermiculita estéril como soporte. En cada una de ellas se

sembraron tres semillas del híbrido Dekalb, raleándose a una planta por maceta después de la emergencia. Los tratamientos considerados fueron las cepas nativas de *A. brasilense* 7M y 10M que se utilizaron en el experimento de campo, y un testigo constituido por una mezcla de ambas cepas esterilizada por autoclave.

Se empleó un diseño estadístico aleatorio con siete repeticiones por tratamiento, sometiéndose los resultados al análisis de variancia (ANVA).

Cada cepa fue multiplicada durante 24 h en las mismas condiciones que las empleadas en la obtención de los caldos bacterianos. La inoculación se hizo con 5 ml de suspensión bacteriana, que se depositaron en el cuello de la plántula en el momento del raleo. Periódicamente se regó con agua destilada y solución de Hoagland y Arno, con 50% del N indicado para la solución completa en el primer riego y con 5% en los posteriores, para evitar grandes déficit que hicieran peligrar el éxito del experimento (11).

Las plantas crecieron al aire libre durante 45 días. Las mismas fueron cosechadas cuando tenían ocho hojas emergidas. Las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar todo resto de vermiculita que pudiera alterar la estimación de la superficie radical, siguiendo el método gravimétrico de Carley y Watson (5).

RESULTADOS

El Cuadro 2 muestra los rendimientos medios obtenidos para cada uno de los tratamientos del ensayo de campo. Puede observarse que las diferencias significativas registradas ($\leq 5\%$) son atribuibles únicamente al genotipo vegetal; y también que, contrariamente a lo esperado, la aplicación de 100 kg N ha⁻¹ a la siembra no incrementó en forma estadísticamente significativa el rendimiento en grano.

Cuadro 2. Rendimientos medios en grano (kg ha⁻¹).

| | | Tratamientos inoculados | | | |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|-------|-------|---------|
| | | 7M | 10M | 59 | testigo |
| No fertilizados (0 kg • N/ha) | Dekalb | 6 332 | 5 997 | 6 075 | 5 865 |
| | Cargill | 6 712 | 6 547 | 6 765 | 6 402 |
| | Continental | 7 065 | 7 025 | 6 985 | 7 062 |
| Fertilizados (100 kg • N/ha) | Dekalb | 6 132 | 6 100 | 5 990 | 5 935 |
| | Cargill | 6 765 | 6 680 | 6 725 | 6 335 |
| | Continental | 6 745 | 7 117 | 6 175 | 6 702 |

Diferencia mínima significativa (DMS) = 604
Coeficiente de variación (CV) = 7.7%

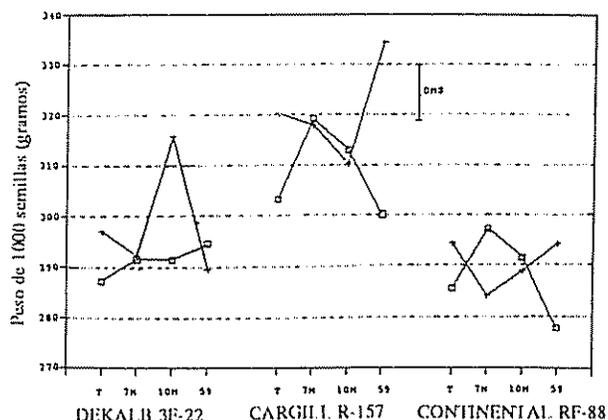


Fig. 1. Interacción cepa-fertilización para el peso de 1000 semillas de tres híbridos comerciales de maíz.

En la Fig. 1 se observa el peso de 1000 semillas, único componente del rendimiento que mostró diferencias significativas entre tratamientos, no sólo a causa del híbrido sino también como respuesta a la inoculación y a su interacción con el factor "fertilización nitrogenada".

Para los tratamientos sin fertilización sólo la cepa 7M produjo respuestas destacadas respecto del testigo para el P-1000, en el caso de Cargill y de Continental.

En relación con las de parcelas fertilizadas con N, la inoculación incidió de modo diferente. El híbrido Dekalb, que sin fertilización no respondió, produjo un P-1000 significativamente mayor que el control correspondiente al ser inoculado con la cepa 10M, en tanto que el Cargill lo hizo con la cepa 59. Se hace notar la marcada interacción negativa que tuvo lugar en el híbrido Continental al ser fertilizado e inoculado con la cepa 7M, lo que se tradujo en un P-1000 notoriamente inferior al obtenido con la misma cepa, pero sin fertilización.

Independientemente de las interacciones específicas, se debe destacar la superioridad del híbrido Cargill sobre los otros dos en relación al atributo que se analiza (Fig. 1). También se puede visualizar que el peso de 1000 semillas respondió positivamente al agregado de N en los tres híbridos empleados, de ellos el Cargill fue el que demostró tener mayor potencial de repuesta.

El Cuadro 3 muestra la biomasa producida en floración. El hecho más notorio es la pronunciada interacción negativa en los tres híbridos al inocular con la cepa 7M en parcelas fertilizadas con N. Por otra parte permite apreciar que la biomasa, a diferencia del rendimiento en grano, sí respondió positivamente al agregado de N. Es notorio que, contrariamente a lo encontrado para otras variables, la biomasa en floración tuvo poca influencia del genotipo vegetal. La biomasa durante la madurez fisiológica no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

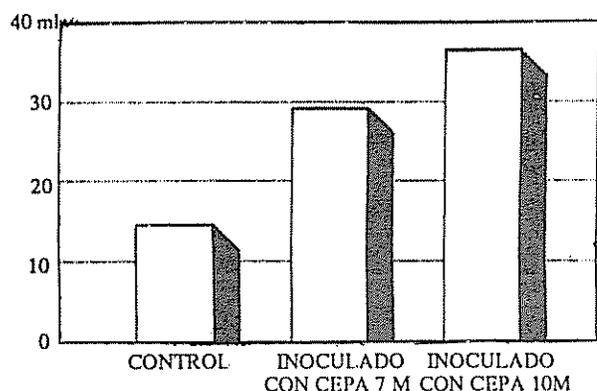
En el Cuadro 4 se presentan, para los cuatro tratamientos escogidos, los nanomoles de etileno producidos por planta y por hora de muestras de Dekalb extraídas en floración por medio de cilindros metálicos. Se puede apreciar que el método de reducción de acetileno a etileno aplicado sobre esas muestras permitió encontrar diferencias significativas en la FBN entre tratamientos inoculados (en este caso con la cepa 7M) y sus respectivos controles sin inocular.

Por último, en la Fig. 2 se muestran los valores medios de álcali consumido, en la estimación del área radical correspondiente al material vegetal cosechado en el ensayo en macetas. Es fácil visualizar que la inoculación del híbrido Dekalb con organismos vivos de las cepas nativas 7M y 10M de *A. brasilense* tuvo un destacado efecto favorable sobre el desarrollo del radical, con incrementos sobre el testigo del 100% y 150%,

Cuadro 3. Materia seca en floración (kg ha⁻¹)

| | | Tratamientos inoculados | | | Testigo |
|-----------------|-------------|-------------------------|---------|----------|----------|
| | | 7M | 10M | 59 | |
| No | Dekalb | 5 481 a | 5 383 a | 5 269 ab | 5 173 ab |
| Fertilizados | Cargill | 5 538 a | 5 508 a | 5 247 ab | 5 233 ab |
| (0 kg • N/ha) | Continental | 5 613 a | 5 430 a | 5 274 ab | 5 203 ab |
| | Dekalb | 4 798 b | 5 676 a | 5 269 ab | 5 676 a |
| Fertilizados | Cargill | 4 839 b | 5 669 a | 5 296 ab | 5 567 a |
| (100 kg • N/ha) | Continental | 4 823 b | 5 698 a | 5 309 ab | 5 598 a |

Las medias con igual letra no difieren estadísticamente del 5% según la prueba de rango múltiple de Duncan (12). Diferencia mínima significativa (DMS)= 522. Coeficiente de variación (CV)= 8.6%



Diferencia mínima significativa (DMS) = 7.5 Coeficiente de variación (CV) = 6.6%

Fig. 2 Consumo de NaOH (ml) en la estimación del área radical del híbrido Dekalb por el método de Carlet y Watson.

respectivamente. La diferencia registrada entre los dos tratamientos inoculados con bacterias vivas alcanzó una magnitud estadística importante, demostrando, de ese modo, que el genotipo bacteriano está implicado en este mecanismo de respuesta a la inoculación.

Cuadro 4. Producción de etileno a partir de acetileno para el híbrido Dekalb (nanosoles, planta⁻¹, hora⁻¹).

| | Testigo | Inoculado (cepa 7M) |
|-------------------------------|---------|---------------------|
| No fertilizados (0 kg • N/ha) | 89.6 c | 168.9 a |
| | 92.5 c | 171.8 a |
| | 89.2 c | 178.9 a |
| | 89.6 c | 106.8 b |
| Fertilizados (100 kg • N/ha) | 83.7 c | 109.9 b |
| | 82.7 c | 108.9 b |

Cada valor es promedio de cuatro datos correspondientes a cuatro cilindros de muestra por parcela. Las medias con igual letra no difieren estadísticamente al 5% según la prueba de rango múltiple de Duncan. Diferencia mínima significativa (DMS)= 12.3. Coeficiente de variación (CV)= 2.7%.

DISCUSION

Si bien los resultados expuestos corresponden a un sólo año de experimento, es importante destacar que la interacción cepa-fertilización modificó, de manera estadísticamente significativa, un componente del rendimiento tan estable como el peso de 1000 semillas. No obstante, es preciso señalar que el tipo y magnitud de la respuesta estuvieron marcadamente influenciados por el genotipo vegetal.

La aplicación de 100 kg N ha⁻¹ en la siembra no incrementó en forma significativa el rendimiento en grano. Esto no era lo esperado considerando los años agrícolas previos, el tipo de cultivo antecesor y el nivel del aporte nitrogenado, el cual representa un valor promedio para la zona en estudio. En tal sentido Miguens *et al.* (13) observaron una respuesta positiva a la fertilización nitrogenada con niveles semejantes de nitratos a la siembra. Asimismo, Barrios *et al.* (2) obtuvieron un incremento en el rendimiento del grano de maíz, que varió entre un 28% y un 30% según el híbrido y la cepa bacteriana empleados, trabajando en condiciones experimentales similares.

Es posible suponer que los aumentos en el peso de 1000 semillas de los híbridos Cargill y Continental al ser inoculados con la cepa 7M y con la 10M, sin aplicación de fertilizante (Fig. 1), estén asociados a los aumentos de biomasa registrados para los tratamientos inoculados con estas cepas (Cuadro 3) y que obedezcan a una mejora en el N disponible para la planta vía FBN. La tasa de reducción de acetileno medida para tratamientos inoculados con la cepa 7M (Cuadro 4) demuestra que la FBN en el campo podría ser considerable, sobre todo en ausencia de fertilización nitrogenada. Nótese que la respuesta a la inoculación no fue significativa en rendimiento, pero en el nivel de la nitrogenasa la sensibilidad de respuesta fue considerable.

Sin embargo, el haber alcanzado notorios incrementos en el peso de 1000 granos en parcelas inoculadas y fertilizadas con N (Fig. 1), en las que la biomasa no aumentó sino que sufrió mermas (Cuadro 3), evidencia que la presencia de este microorganismo puede desencadenar otros mecanismos de respuesta, además de los ya señalados. Los resultados del experimento en macetas demuestran que el aumento de la superficie radical es uno de los efectos asociados a la interacción *Azospirillum*-maíz (10) que, al igual que en otras especies vegetales, fue particularmente evidente en la combinación Dekalb-cepa 10M (Fig. 2). Es importante destacar que las cepas 10M y 59 produjeron incrementos significativos en el peso de los 100 granos de los híbridos Dekalb y Cargill, pero sólo en parcelas fertilizadas (Fig. 1), lo que permite plantear como hipótesis que en estas cepas la respuesta involucraría un mejor aprovechamiento del N presente en el suelo. Este tipo de interacción ha sido documentada por diversos autores (3, 14).

Los datos obtenidos en este trabajo permiten inferir que al asociarse *Azospirillum* a las raíces de plantas de

maíz, varios mecanismos de respuesta podrían desencadenarse. De un modo muy general puede afirmarse que la fijación de N atmosférico llevada a cabo por la bacteria tiene lugar en un sistema radical mejor desarrollado, probablemente como consecuencia de un mayor abastecimiento de hormonas promotoras del crecimiento, y capaz de asimilar el N presente en el suelo de un modo más eficiente. Aún así, no siempre se encuentra respuesta a la inoculación en el rendimiento en grano, el cual es el resultado de numerosos y complejos mecanismos fisiológicos condicionados por aspectos ambientales y genéticos. El análisis de aspectos tales como intensidad de colonización y distribución relativa de microorganismos, mediante futuros experimentos que incluyan el estudio detallado de los mecanismos de respuesta, suministraría, quizás, elementos necesarios para intentar explicar la especificidad genotipo vegetal-genotipo bacteriano encontrada en el presente trabajo.

LITERATURA CITADA

1. ALBRECHT, S.L.; OKON, Y.; LONQUIST, J.; BURRIS, R.H. 1981. Nitrogen fixation by com-*Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Science* 21:301-306.
2. BARRIOS, S.Z.; POTENZA, A.; LOPEZ, M.V. 1988. Respuesta diferencial en zeacultivo de biofertilizantes diazotrofos rizosféricos. Congreso Nacional de Maíz (4., Pergamino, Arg.). *Actas* 2:24-30.
3. BOODEY, R.M.; BALDANI, V.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. 1986. Effect of inoculation with *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. *Plant and Soil* 95:109-121.
4. BODDEY, R.M. 1987. Method for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 6(3):209-266.
5. CARLEY, H.E.; WATSON, R.D. 1966. A new gravimetric method for estimating root surface areas. *Soil Science* 102:289-291.
6. DELWICHE, C. 1977. Nitrogen fertilization in com. *Applied Environmental Microbiology* 24:967-980.
7. DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. 1982. Bases científicas para una agricultura biológica. *Ciencia e Cultura* 34:869-881.
8. DOBEREINER, J. 1985. Frontier research on nitrogen fixation in cereals and other Gramineae. In Conference organized by Third World Academy of Sciences. Proceedings. Hamenade, Hassan, Phna (Eds.). Trieste, Italia.
9. FREITAS, J. L. M.; DA ROCHA, R.; PEREIRA, P. A. A.; DOBEREINER, J. 1982. Materia orgánica e inoculação com *Azospirillum* spp. incorporação de N pelo milho. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 17:1423-1432.
10. KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany* 63:627-634.
11. LEDGARD, S.; SIMPSON, J.R.; FRENEY, J.; BERGENSEN, F. 1985. Field evaluation of ¹⁵N techniques for estimating nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 17:317-322.
12. LITTLE, I.; HILLS, F. 1983. Métodos estadísticos para la investigación en agricultura. Méx., Trillas. 270 p.
13. MIGUENS, M.; ROJAS, A.; CASAS, G. 1987. Producción de maíz. Convenio AACREA-Cargill. Cuaderno de Actualización Técnica no 42. 127 p.
14. MILLET, E.; FELDMAN, M. 1984. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant and Soil* 80:255-260.
15. MITCHELL, H.T. 1972. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *Journal Association of Agricultural Chemistry* 55:1-3.
16. OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied Environmental Microbiology* 33:85-88.
17. OKON, Y. 1982. *Azospirillum*: Physiological properties, mode of association with roots and its applications for the benefit of cereal and forage grass crops. *Israel Journal Botany* 31:214-220.
18. PACOVSKY, R.S.; PAUL, E.A.; BETHERLINFALVAY, B.J. 1985. Nutrition of sorghum plant fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 85:145-148.
19. PATRIQUIN, D.G.; DOBEREINER, J.; JAIN, D.K. 1983. Sites and responses of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8):900-915.
20. RAI, S.A.; CAUR, A.G. 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. and effect of *Azospirillum lipoferum* on yield and N-uptake of wheat crop. *Plant and Soil* 69:233-328.
21. RENNIE, R.J. 1980. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Canadian Journal Botany* 58:21-24.
22. TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBELL, D.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied Environmental Microbiology* 37:1016-1024.
23. VON BULLOW, F.W.; DOBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Science* 72:2389-2393.