

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TRUJILLO**

ESCUELA DE POSTGRADO

SECCIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*Maestría en Ciencias, Mención en Biotecnología Agroindustrial y
Ambiental*



TESIS

Efecto de *Azospirillum* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L.
“maiz”, en invernadero

AUTOR: Br. LIZBETH MARIBEL CÓRDOVA ROJAS

ASESOR: Dra. CARMEN ROSA CARREÑO FARFÁN

Trujillo – Perú
2015

Nº de registro:

JURADO EXAMINADOR

Dr. Juan José Guevara González
Presidente

Dr. Luis Alberto Llenque Díaz
Secretario

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
Miembro

DEDICATORIA

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan, por sus consejos, sus valores, por la motivación que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su paciencia y amor.

Benito y Orfelinda

Por la confianza y empuje que me expresan, siendo lo mejor que me ha regalado Dios y la fuente de inspiración para superarme cada día.

Mary, Etelvina, Anderson y Michael

A mi segunda madre por brindarme su cariño y todas las enseñanzas de la vida, demostrándome con ejemplo el verdadero significado de un te amo.

Eufelia

Gracias por tenerme siempre presente y ser parte de cada triunfo en mi vida, los llevo siempre en mi corazón.

Selene, Franklin y Jaquelin

A mis mejores amigos por estar siempre a mi lado en cada logro que doy y ser parte de mi vida apoyándome, entendiéndome y aconsejándome para ser mejor cada día.

Dahana, Franco y Eslin

Lizbeth Maribel

AGRADECIMIENTO

Agradezco a **Dios** por guiarme por el buen camino, dándome la sabiduría y la fuerza necesaria para seguir adelante y no desmayar ante los problemas, enseñándome a encarar las adversidades y no desfallecer en el intento.

A mis padres; Benito Córdova Pinella y Orfelinda Rojas López, gracias por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles.

A mi asesora de tesis, Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán, infinitas gracias por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y sus consejos, ayudaron a formarme como persona e investigadora.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto. Por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de nuestras vidas.

La autora.

Índice

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
	iii
	iv
	1
	5
	8
	10
	11
	16
	16
	16
	16
	16
	16
	16
	17
	17
	17
	17
	17
	20
	25
	26
	26
	26
	26
	26
	29
INDICE.....	
RESUMEN.....	
1. INTRODUCCIÓN.....	

2.	MARCOCONCEPTUAL-TEÓRICO-FILOSÓFICO.....	
2.1	Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, PGPR.....	
2.2	El género <i>Azospirillum</i>	
2.3	El cultivo de <i>Zea mays</i> L. “maíz”.....	
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	
3.1	Materiales.....	
3.1.1	Material biológico.....	
3.1.2	Población universal.....	
3.1.3	Población muestral.....	
3.1.4	Unidad muestral.....	
3.2	Métodos.....	
3.2.1	Variables en estudio.....	
3.2.2	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	
3.2.3	Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado.....	
3.2.4	Segunda fase: Efecto de rizobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de maíz.....	
3.2.5	Análisis estadístico de los datos.....	
4.	RESULTADOS.....	
4.1	Características de <i>Azospirillum</i> spp. nativas.....	
4.2	Análisis del suelo experimental.....	
4.3	Condiciones meteorológicas.....	
4.4	Porcentaje de germinación.....	

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas constituyen biofertilizantes para los cultivos agrícolas, disminuyéndose el uso de fertilizantes sintéticos. Se realizó un ensayo con el objetivo de determinar el efecto de diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en la altura, biomasa aérea y radicular de *Zea mays* L. “maíz” en condiciones de invernadero. Las bacterias previamente aisladas en la rizósfera de maíz, se cultivaron en caldo nutritivo por 24 horas y con el sobrenadante se obtuvo el inóculo estandarizado a 9×10^8 celmL⁻¹, que se sembró en caldo extracto de suelo 10%, caldo tripticasa soya suplementado con triptófano y caldo Sundara Rao y Sinha Medium, para

cuantificar el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado, respectivamente. En invernadero, el ensayo fue conducido como un diseño completamente aleatorio, con doce tratamientos, diez correspondientes a los cultivos de *Azospirillum*, un testigo químico (240N:80P:80K) y un testigo absoluto (agua destilada). El inóculo bacteriano (4mL por plántula) se aplicó en la rizósfera de plántulas de maíz, 7 días después de la siembra. Los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas fijaron nitrógeno como amonio (3,2-32,1ppm), produjeron ácido indolacético (2,8-35,3ppm) y solubilizaron fósforo (0,05-3,41ppm), destacando *Azospirillum* sp. 77 en la fijación de nitrógeno (32,10ppm) y producción de ácido indolacético (35,3ppm) y *Azospirillum* sp. 65 en la solubilización de fósforo (3,41ppm). Los diez cultivos de *Azospirillum* incrementaron la altura (IE=0,73-13,75%) y biomasa aérea (IE=18,86-23,34%). Asimismo, ocho cultivos de *Azospirillum* spp. incrementaron la biomasa radicular (IE= 10,79-63,31%). *Azospirillum* sp. 65 superó al testigo químico en los IE en la altura a los 25 y 50 días, biomasa aérea y radicular a los 75 días. Se demostró el potencial de *Azospirillum* spp. para incrementar el desarrollo vegetativo en el cultivo de maíz.

Palabras clave: *Azospirillum*, maíz, desarrollo vegetativo, rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas

ABSTRACT

The rizobacterias promoters of growth in plants are biofertilizers for agricultural crops, reducing the use of synthetic fertilizers. A trial was conducted With the objective of determining the effect of ten crops of *Azospirillum* spp. native to the height, aerial biomass and root of *Zea mays* L. "maíz" in greenhouse conditions. The previously isolated bacteria in the rizósfera of maize, were grown in nutritive broth for 24 hours and with the supernatant was obtained the inoculant standardized to 9×10^8 celmL⁻¹, which was planted in broth soil extract 10%, tripticasa soya broth supplemented with tryptophan and broth Sundara Rao and

Sinha Medium, to quantify the nitrogen fixed, indolacetic acid produced and phosphorus solubilised, respectively. In the greenhouse, the test was conducted as a completely random design with twelve treatments ten corresponding to the crops of *Azospirillum*, a chemical control (240N:80P:80K) and an absolute control (distilled water). The bacterial inoculum (4mL per seedling) was applied in the rhizosphere of corn seedlings, 7 days after sowing. The ten crops of *Azospirillum* spp. native fixed nitrogen as ammonium (3,2-32,1ppm), produced indolacetic acid (2,8-35,3ppm) and solubilized phosphorus (0,05-3,41ppm), highlighting *Azospirillum* sp. 77 in nitrogen fixation (32,10ppm) and production of indolacetic acid (35.3ppm) and *Azospirillum* sp. 65 in the solubilization of phosphorus (3.41 ppm). The ten crops of *Azospirillum* increased the height (IE=0,73-13,75%) and aerial biomass (IE=18,86-23,34%). In addition, eight crops of *Azospirillum* spp. increased root biomass (IE= 10,79-63,31%). *Azospirillum* sp. 65 exceeded the witness chemical in the EI in height at 25 and 50 days, aerial and root biomass to 75 days. *Azospirillum* spp. potential was demonstrated to increase vegetative growth in corn cultivation

Key words: *Azospirillum*, corn, vegetative development, rizobacterium growth promoters in plants.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Zea mays* L. “maíz” es el más importante entre los cereales, superando a *Triticum aestivum* L. “trigo” y *Oryza sativa* “arroz”. En el Perú como en otros países, el rendimiento está muy relacionado con la aplicación de fertilizantes sintéticos; sin embargo, el rendimiento promedio es 4,2 tha⁻¹ y la oferta no satisface la demanda, por lo que la importación se ha incrementado en forma sostenida los últimos años, alcanzando más del 17 % de las importaciones¹.

Los fertilizantes sintéticos representan 20 – 30% de los costos de producción de un cultivo y cuando son correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad; no obstante, cada año se incrementa la cantidad de fertilizante por aplicar, debido a la menor eficiencia de adsorción en el suelo y absorción por la planta. Según la asociación internacional de la Industria de Fertilizantes entre 1996 – 2008, el consumo se incrementó en 31% en el mundo y 56 % en los países en vías de desarrollo, así como también el precio de algunos fertilizantes se triplicó, disminuyendo la rentabilidad del cultivo².

Los fertilizantes sintéticos son concentrados y tienen buena solubilidad en agua; no obstante, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta, es en promedio 50, 30 y 60% para el N,

P, K. Los nitrogenados por su solubilidad y carga negativa se pierden por volatilización, desnitrificación, lixiviación y erosión^{3,4}. Las emisiones de amoníaco liberadas hacia la atmosfera, causan lluvia ácida y los óxidos nítrico y nitroso liberados por desnitrificación, destruyen la capa de ozono. Las escorrentías agrícolas originan eutrofización de aguas superficiales y los lixiviados contaminan los mantos freáticos causando enfermedades en los seres vivos⁵.

En la búsqueda de soluciones a la problemática expuesta se realizan investigaciones con las denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). Las PGPR benefician a los cultivos agrícolas a través de mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la síntesis de reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas), solubilización de minerales como los fosfatos, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y estimulación del sistema de absorción de iones como los nitratos⁶⁻⁸. Entre los mecanismos indirectos o de biocontrol se encuentran la competencia por un nicho ecológico o por nutrientes, la interacción directa con el patógeno (parasitismo y lisis enzimática), antibiosis, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica en las plantas⁶⁻¹⁰.

Ejemplos por excelencia de las PGPR son las especies de *Azospirillum*^{11,12}. Estas bacterias son cosmopolitas y son reconocidas mayoritariamente por la fijación de nitrógeno y la producción de reguladores del crecimiento vegetal. En condiciones adversas utilizan los gránulos de reserva del tipo polihidroxialcanoato, producidos y acumulados y sobreviven formando quistes o formas "C" que conducen a la agregación celular¹³. Ensayos realizados en diferentes cultivos de importancia económica demostraron 5 – 30% de

incremento en el rendimiento, así como, la disminución de 25 – 50% de la dosis del fertilizante químico¹⁴⁻¹⁸ y hasta 36% de aumento en la rentabilidad¹⁹; sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios, en los que no se obtuvo la respuesta positiva esperada, posiblemente porque las bacterias no se adaptaron a las condiciones del suelo, muy diferentes a las de su procedencia, no compitieron exitosamente con la biota nativa o no fueron capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables^{20,21}.

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, se han realizado estudios para aislar *Azospirillum* spp. de raíces de maíz en Lambayeque¹² y se ha demostrado *in vitro* que tienen potencial como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas¹³; sin embargo, no se ha investigado el efecto de estas bacterias nativas en el desarrollo vegetativo del maíz en condiciones de invernadero. En el desarrollo sustentable, la biofertilización resurge como una práctica factible y necesaria en los sistemas de producción agrícola del Perú⁵⁻¹⁰. El encarecimiento de los fertilizantes sintéticos^{2,3} y la preocupación de la sociedad por consumir alimentos libres de químicos, producidos con el menor impacto ambiental, justifica la investigación de bacterias promotoras de crecimiento como *Azospirillum* spp., estableciendo las ventajas y alcances, pero también las limitaciones del empleo de microorganismos en la agricultura.

La investigación de bacterias promotoras de crecimiento como *Azospirillum* spp. requiere en primer lugar el aislamiento y caracterización en el laboratorio, para luego determinar el efecto en invernadero y campo y posteriormente investigar el incremento masivo para la comercialización⁶⁻¹⁰. Los cultivos de maíz serán favorecidos con la aplicación de las bacterias nativas,

después que sean caracterizadas en laboratorio, invernadero y campo, requisitos para garantizar su efectividad en el incremento del rendimiento agrícola.

Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación, cuyo problema fue:
¿Cuál es el efecto de diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas sobre la altura, biomasa aérea y radicular de maíz amarillo duro en condiciones de invernadero?
La hipótesis planteada fue: Los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas incrementan la altura, biomasa aérea y radicular de maíz amarillo duro en invernadero.

2. MARCO CONCEPTUAL- TEÓRICO-FILOSÓFICO

Entre los efectos de las PGPR se mencionan el incremento de la germinación, desarrollo del sistema radical, nutrición mineral y la utilización del agua. Se investigó la influencia de la inoculación independientemente y en conjunto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* sobre la germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. "frijol común". Las bacterias cultivadas en agar nutritivo, a 30°C y con una concentración de 10^8 UFCmL⁻¹ se inocularon a las semillas previamente desinfectadas, determinándose que no existieron diferencias significativas en el número de semillas germinadas, ni en la longitud de la raíz principal, pero si en el número de raíces laterales, cuantificándose en promedio 10,5 con *Azospirillum*, frente a 7,10 con el testigo no inoculado y 7,55 con *Azotobacter*²².

En el cultivo de *Capsicum annum* L. "pimiento pimentonero", se observó disparidad en la energía germinativa de un mismo lote de semilla, por lo que se investigó el efecto de *Azospirillum brasilense* en la germinación, emergencia y desarrollo de plantas. En el ensayo de germinación los tratamientos fueron: *A. brasilense* Pi3 (T1), *A. brasilense* Op8 (T2), tratamiento con KNO₃ al 0,2% (T3) y el testigo con agua destilada (T4). En el bioensayo de emergencia, se investigó: inoculación al momento de la siembra (T1), a la siembra y a los 7 días (T2), a los 7 días de la siembra (T3) y testigo no inoculado (T4). A los 7 días se determinó 12% de incremento en las semillas germinadas con T2, en comparación con KNO₃ y 7,0% en comparación con el testigo. En cuanto a las plantas emergidas, no se observaron diferencias a los 7 días, pero si a los 14 días alcanzando 78,6% con T1; 85,6% con T2; 81,6% con T3 y 76,3% con el testigo. Respecto a

la altura de las plantas, a los 40 días se alcanzaron 11,77cm con T2; con diferencias significativas frente a T3 (8,40cm), T1 (9,40cm) y el testigo con 9,35cm²³.

El efecto del inoculante comercial *Azospirillum brasilense* Az39 con 3×10^8 bacterias mL⁻¹ se investigó en *Setaria lachnea*. Los tratamientos fueron: inoculante y testigo, realizándose las evaluaciones durante la germinación y floración. Las semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio 0,5% v/v se inocularon con 1mL del inoculante por gramo de semilla y se mantuvieron en estufa a 25°C, considerándose inicio de germinación la extrusión de la radícula con una longitud mínima de 2mm. A su vez, las semillas pregerminadas se sembraron, en el tratamiento correspondiente se aplicó 1mL del inoculante y las plantas permanecieron en cámara de crecimiento, a 28°C, durante 60 días. El poder germinativo de las semillas fue 14, 8 y 14, 6% para los tratamientos testigo e inoculado, respectivamente; no obstante, las raíces de las semillas inoculadas mostraron mayor proliferación de pelos absorbentes. A la floración en las plántulas inoculadas se incrementó la materia seca de raíces, hojas e inflorescencias, longitud radicular y área foliar, aumentando también el contenido de nitrógeno en hojas (25%) y raíces (82%)²⁴.

La afinidad y efecto de *Azospirillum* spp. se investigó en maíz. Colectándose raíces de Teocintle y maíz Palomero, Toluqueño, Cocahuacintle, Cónico, Chalqueño y H-28. Después de aislar y seleccionar las bacterias con mayor actividad nitrogenasa se re-inocularon en plántulas de las mismas variedades en hidroponía. A los 60 días se determinó que *Azospirillum* no influyó en el volumen radicular en comparación con la fertilización nitrogenada. La mayor población se obtuvo con *Azospirillum* sp. de H-28 inoculada en maíz

Chalqueño, H-28 y Cónico. Los mayores valores en actividad nitrogenasa se alcanzaron con *Azospirillum* spp. de H-28, Palomero, Toluqueño y Chalqueño inoculadas en maíz Chalqueño, concluyéndose que existió afinidad entre *Azospirillum* obtenido de maíces H-28 y Chalqueño y su re-inoculación en estas mismas variedades²⁵.

La aplicación dual de rizobios y *Azospirillum* sp. induce una nodulación más temprana, incrementando el número de nódulos, tasa de fijación de nitrógeno y desarrollo radical. Se investigó la co-inoculación de *Bradhyrizobium japonicum* y *A. brasilense* sobre la nodulación de un cultivo de *Glycine max* L. "soya". El ensayo se realizó en franjas con tres tratamientos (testigo no inoculado, inoculado con *B. japonicum* y co-inoculación *B. japonicum* + *A. brasilense*). Se determinó efecto positivo de la aplicación simple y combinada de rizobios + *A. brasilense* en las variables número y peso de nódulos, incrementándose en 12% el peso de los nódulos respecto de la aplicación simple de rizobios²⁶.

En dos variedades de trigo se investigó la inoculación simple y combinada de *Azospirillum zeae* cepa N7 y *A. canadense* cepa DS2, así como *Sinorhizobium meliloti* cepas A2 y NRG34, cultivadas en medio líquido levadura manitol, hasta alcanzar 10^7 - 10^8 UFCmL⁻¹; el inóculo diluido 1:10 en NaCl 0,85% se aplicó a la siembra (1mL/semilla) y 5 días después de la siembra en 10 tratamientos: control fertilizado (NH₄.NO₃: 150ppm N/kg el suelo); inoculación con NRG34, A2, N7, DS2; co-inoculación con NRG34+N7, A2+N7, NRG3+DS2 y A2+DS2 así como el control absoluto. Se determinaron diferencias significativas entre las variedades de trigo, resultando superior Hoffman frente a Barrie; sin embargo, en esta última variedad se observó un efecto significativo

de la co-inoculación de *S. meliloti* NRG34 y *A. zeae* N7, alcanzando 0,88g en el peso aéreo y 0,60g en el peso radical; frente a 0,74g y 0,30g en el control fertilizado y 0,84g y 0,58g en el control absoluto, respectivamente²⁷.

Se evaluó el efecto de la inoculación de *Azospirillum* spp. en *Zea mays* L. "maíz". Tres cepas de estas bacterias: Patrón 9, IPN-33 e IPN-35 cultivadas en caldo Luria Bertani (10^9 UFCmL⁻¹), fueron inoculadas en las semillas 72 horas antes de la siembra. Transcurridos 30 días se determinaron diferencias significativas en el efecto entre cepas, correspondiendo los mayores valores a Patrón 9, con la que se alcanzaron 0,26g de peso en la raíz y 33,3cm de altura, en comparación con 0,22g y 29,76cm en el testigo, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el peso del follaje y en el índice de clorofila. *Azospirillum* sp. Patrón 9 se consideró promisorio para ser utilizada como biofertilizante²⁸.

2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, PGPR

En la rizósfera de las plantas se consideran tres componentes: el suelo rizosférico, el rizoplano y la raíz misma. El suelo rizosférico es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de exudados que afectan la actividad microbiana. El rizoplano es la superficie de la raíz, incluyendo las partículas fuertemente adheridas a la raíz. La raíz misma también es parte de la rizósfera, porque determinados microorganismos son capaces de colonizar los tejidos internos⁹.

El término rizobacterias se propuso¹⁰ para las bacterias del suelo que competitivamente colonizan las raíces, estimulan el crecimiento de las plantas y a la vez reducen la incidencia de las enfermedades. En 1981, se les denominó rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (Plant Growth – Promoting

Rhizobacteria, PGPR). En la actualidad, este concepto se usa para las bacterias que cumplen con dos de los tres criterios establecidos como son, colonización agresiva, estimulación del crecimiento vegetal y biocontrol.

Según los mecanismos de la PGPR involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas, se consideran biofertilizadores, bioestimuladores y biopesticidas. Los biofertilizadores son aquellos microorganismos que aplicados en la semilla, superficie de la planta o en el suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento, por el incremento de la disponibilidad de nutrientes primarios, a través de mecanismos, como la fijación biológica de nitrógeno y la utilización de formas insolubles de fósforo. Los bioestimuladores producen cambios en la concentración de los reguladores del crecimiento, a través de la producción de ácido indolacético, giberélico, citoquininas y disminución de la concentración de etileno en el interior de la planta. Los biopesticidas promueven el crecimiento de las plantas, a través del control de fitopatógenos, principalmente por la producción de antibióticos, sideróforos, cianuro de hidrógeno, HCH, enzimas que degradan la pared celular de los hongos, exclusión por competencia y resistencia sistémica inducida; no obstante, se debe tomar en cuenta que muchas PGPR tienen doble e incluso triple rol^{7,10}.

Las PGPR también pueden ser clasificadas en dos grupos: PGPRB y Biocontrol – PGPRB. El término PGPRB es aplicable a las bacterias que influyen directamente en el metabolismo de las plantas, promoviendo el aumento de la absorción de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y la estimulación de otros microorganismos benéficos presentes en la rizósfera. A su vez, el término Biocontrol – PGPRB es utilizado para las bacterias que, además, tienen

la capacidad de controlar fitopatógenos por la producción de metabolitos inhibitorios o por inducción de resistencia en la planta²⁹.

2.2 El género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* fue aislado por primera vez en 1925, por Beijerinck, quien lo nombró inicialmente *Spirillum lipoferum*, fue reclasificado por Tarrand *et al.* (1978), quienes basados en estudios de homología del ADN propusieron el género *Azospirillum* con dos especies: *A. lipoferum* y *A. brasilense*. En la mayoría de las investigaciones se han identificado 12 especies, siendo las más comunes *A. brasilense* y *A. lipoferum*³⁰⁻³².

El género *Azospirillum* comprende bacilos gruesos, rectos o ligeramente curvados y a menudo con extremos puntiagudos, Gram negativos en cultivos jóvenes, pudiendo ser Gram variables en cultivos envejecidos. Características útiles en su identificación son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movimiento en espiral. En medio líquido o semisólido desarrollan un flagelo polar que permite el movimiento característico tipo “sacacorchos”; sin embargo, en medios sólidos algunas especies desarrollan flagelos laterales (perítricos). También presentan gránulos intracelulares de poli – β – hidroxibutirato (PHB), que pueden constituir 25 - 50 % del peso seco en las células cultivadas en medio libre de nitrógeno. Son catalasa y oxidasa positivos, reducen los nitratos a nitritos, hidrolizan la urea y diversas condiciones como el envejecimiento celular y la presencia de metales provocan que las células vibroides de *Azospirillum* cambien de morfología y tomen la forma de quistes o formas C, conduciendo a la agregación celular con formación de grumos visibles de gran tamaño^{33,34}.

Las bacterias del género *Azospirillum* inicialmente fueron reconocidas por su capacidad de fijar nitrógeno en forma no simbiótica, pero en la actualidad se destacan por la producción y liberación de auxinas, giberelinas y citoquinas, así como por la síntesis de enzimas pectinolíticas que alteran la funcionalidad de las células de las raíces y por el incremento en la producción de exudados, que promueven el crecimiento de otros organismos rizosféricos¹⁸. También se considera que la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, conduce a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radiculares, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve la captación de agua y minerales³⁵.

2.3 El cultivo de *Zea mays* L. “maíz”

El maíz es una planta de porte robusto y hábito anual. Las raíces primarias son fibrosas, presentando además raíces adventicias; el tallo es simple, erecto, con 1 - 5m de altura y pocos macollos; las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo y lo rodean mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema lateral. El maíz es monoico, con flores unisexuales masculinas y femeninas en la misma planta. La inflorescencia masculina o espiga o panícula es terminal y consta de un eje central o raquis y ramas laterales. Las inflorescencias femeninas o mazorcas que se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas que constan de un raquis central, donde se insertan las espiguillas por pares, cada espiguilla con dos flores pistiladas, una fértil y una abortiva. El grano o semilla es un cariósido insertado en el raquis cilíndrico u olote, con pericarpio, endospermo y embrión³⁶.

El maíz necesita climas relativamente cálidos, cultivándose en regiones de clima caliente y subtropical húmedo, pero no se adapta a regiones semiáridas. La temperatura óptima es de 20 – 25°C en la germinación, 20 – 30°C durante el crecimiento vegetativo y 21 – 30°C en la floración. Se prefieren los suelos de textura franca, con un pH de 6 – 7,5 y humedad en el estado de capacidad de campo, con un requerimiento de 7 000 m³ha⁻¹ en riego por profundidad y 3 000 – 3 500 m³ha⁻¹ en sistema tecnificado de riego por goteo. El terreno se prepara en seco, después, se aplica un riego de machaco o riego pesado y cuando el terreno está en capacidad de campo se usa una rastra ligera y posteriormente el terreno se nivela. En el Perú se usan la labranza convencional y la mínima. Esta última es la más indicada en el verano en los valles de la costa con climas templados³⁷⁻³⁹.

En la costa peruana principalmente se cultiva maíz amarillo duro y semiduro, destinados a la preparación de alimentos balanceados para animales y obtención de derivados. En la sierra se cultivan maíces blancos amiláceos, en su mayoría para la alimentación humana⁴⁰. En la costa norte del Perú, el maíz amarillo duro se puede sembrar todo el año, pero las mayores siembras son las que se realizan entre enero a julio, en invierno y entre octubre a diciembre, en verano. En la siembra de verano la floración, aparición de la panoja y el llenado de fruto, se dan en plena estación (enero-marzo) y en la siembra de invierno, la floración se observa en plena estación fría^{38,41}.

El cultivo de maíz tiene la mayor demanda de nutrientes a los 30 – 60 días después de la siembra (absorción de 38,5% N; 26,5% P; 66% K; 49,2% Ca; 46,5% Mg), seguido de 60 – 90 días (absorción de 47% N; 46,5% P; 29,6% K; 46,2% Ca; 42% Mg). Al final de los 90 días se ha completado

cerca del 88 % de sus necesidades de N; 74% de P; 100% de K y 90% de Mg. La primera fertilización (NPK) se puede realizar al momento de la siembra a máquina y si es a palana cuando la planta tiene cuatro hojas extendidas, 8 días después de la siembra. La segunda fertilización para completar la dosis de N requerida se realiza cuando la planta tiene ocho hojas extendidas, 25 – 30 días después de la siembra³⁸.

El maíz es el único cereal que puede ser utilizado en distintas etapas del desarrollo. Las mazorcas jóvenes (filote o babycorn) cosechadas antes de la floración son utilizadas como hortalizas: las mazorcas tiernas de maíz dulce y las mazorcas verdes choclo, se consumen en gran escala, asadas o hervidas o en el estado de pasta blanda. Cuando la planta aún está verde constituye un buen forraje para el ganado. A su vez, el grano seco se usa para el consumo humano y animal y para la elaboración de una gran cantidad de productos industriales incluyendo el etanol^{40,42}.

El desarrollo del cultivo consiste en una sucesión obligatoria de etapas o fases en un orden riguroso e irreversible, correspondiendo a la iniciación de órganos nuevos, es un fenómeno puramente cualitativo. Ciclo de desarrollo es el conjunto de fases que van desde la germinación de la semilla hasta la floración y formación del fruto. Este ciclo comprende dos etapas bien definidas: desarrollo vegetativo y desarrollo reproductivo⁴³.

Desarrollo vegetal es el crecimiento ordenado de las plantas con la consiguiente diferenciación de tejidos y órganos. Comprende dos procesos: el crecimiento que corresponde a los cambios de tamaño y la diferenciación que corresponde a cambios estructurales y fisiológicos⁴⁴. El éxito de la empresa

agrícola depende del crecimiento de los cultivos. Si las plantas crecen y el rendimiento de la cosecha es bueno, el agricultor tendrá éxito en la cosecha. El crecimiento se refiere al aumento de algún órgano u órganos específicos de las plantas o a las plantas consideradas en su conjunto y puede estar relacionado al peso seco, longitud, altura o diámetro, pero todos ellos en función del tiempo⁴⁵.

Cuando la disponibilidad de agua y de nutrientes no son limitantes y en ausencia de enfermedades e insectos, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos dependen de la cantidad de radiación que pueda ser interceptada. El maíz es uno de los cereales más eficientes en la conversión de energía solar, dióxido de carbono, agua y minerales del suelo, en materia orgánica. La tasa de crecimiento del cultivo esta positivamente asociada con la cantidad diaria de radiación interceptada. De forma similar, la biomasa total acumulada hasta la madurez fisiológica está relacionada con la radiación total interceptada⁴³.

El sistema para la clasificación de etapas o estadios utilizados por la Universidad de Iowa divide al desarrollo de la planta en desarrollo vegetativo y reproductivo. Las subdivisiones del estadio vegetativo (V) son designadas como V1 primera hoja, V2 segunda hoja, V3 tercera hoja..., V(n), siendo (n) la última hoja antes del panojamiento (VT). Las subdivisiones del estadio reproductivo son R1 barbas, R2 ampolla, R3 lechoso, R4 pastoso, R5 dentado y R6 madurez fisiológica. Los caracteres morfofisiológicas que afectan el rendimiento de maíz son vegetativos (área foliar, duración del área foliar, altura de planta) y reproductivos (días a la floración, prolificidad y periodo de llenado de grano). La altura de la planta es un parámetro que determina el grado de desarrollo del área foliar y el tamaño final de la planta. En algunos casos el mayor tamaño de una planta es más importante que la duración del período de llenado de grano en la

determinación del rendimiento. El rendimiento potencial del grano en antesis está en función del crecimiento previo de la planta por lo que las plantas que se desarrollan con menos competencia tienen mejores rendimientos potenciales. Cuando lo importante en la determinación del rendimiento es el período de llenado de grano, la floración temprana aumenta el rendimiento a través de un aumento en el número de días disponibles para el llenado del grano⁴³.

El objetivo general de la presente investigación fue determinar el efecto de diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L. “maíz” en invernadero. Los objetivos específicos fueron: cuantificar el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado por diez cultivos de *Azospirillum* spp., así como también, determinar el efecto de *Azospirillum* spp. nativas en la altura, peso de la biomasa aérea y radicular y floración de maíz amarillo duro durante 75 días en invernadero.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por semillas de maíz amarillo duro y diez cultivos de *Azospirillum* spp. aislados de raíces de maíz, durante

diciembre, 2013 – enero, 2014, caracterizados *in vitro* como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, (PGPR)¹², y proporcionados por la Sección de Biotecnología Microbiana del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

3.1.2 Población universal

Bacterias del género *Azospirillum*.

3.1.3 Población muestral

Bacterias del género *Azospirillum* aisladas de raíces de maíz en Lambayeque, durante diciembre, 2013 – enero, 2014.

3.1.4 Unidad muestral

Diez cultivos de *Azospirillum* spp.: 10, 19, 44, 52, 58, 65, 74, 76, 77, 80.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

a. Variable independiente

Diez cultivos de *Azospirillum* spp.

b. Variable dependiente

Desarrollo vegetativo de maíz: altura, biomasa aérea y radicular, días requeridos para la floración.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: en la primera fase descriptiva, con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt⁴⁶, se cuantificó

el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado por 10 cultivos de *Azospirillum* spp. En la segunda fase, con un estudio experimental, bajo un diseño completamente aleatorio, DCA³⁴, se investigó el efecto de estas bacterias en el desarrollo vegetativo de maíz. Los tratamientos fueron doce, correspondientes a diez cultivos de: *Azospirillum* spp. 10, 19, 44, 52, 58, 65, 74, 76, 77, 80 y dos testigos: 100% de fertilizante químico (240N:80P:80K) y testigo absoluto (agua destilada). En cada tratamiento se realizaron seis repeticiones totalizando, 72 unidades experimentales (Anexo 1).

3.2.3 Primera fase: Cuantificación de nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado

Con los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas se cuantificó el nitrógeno fijado, ácido indolacético producido y fósforo solubilizado.

a. Reactivación de cultivos de trabajo

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo a 30°C, en agitador a 150rpm durante 24 horas. A continuación, se sembraron mediante la técnica de estría⁴⁷ en agar nutritivo, se seleccionaron cinco colonias características y se sembraron en agar nutritivo (Anexo 2), durante 24 horas, constituyendo los cultivos de trabajo.

b. Obtención del inóculo bacteriano para las pruebas de laboratorio

Para la obtención del inóculo⁴⁸, cada bacteria nativa se cultivó en 5mL de caldo nutritivo a 30°C durante 24 horas. Posteriormente,

el caldo nutritivo se centrifugó (3500rpm) durante 10 minutos, el sobrenadante se eliminó, el sedimento se lavó con solución salina esterilizada (0,85%, p/v) y su concentración celular fue estandarizada con el tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland ($9 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$).

c. Cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro*

La cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro* por las bacterias nativas se realizó con el método colorimétrico del fenolhipoclorito^{49,50}. El inóculo (5%:0,15mL) de cada cultivo bacteriano fue depositado por triplicado en tubos de 15 x 150mL conteniendo 3mL de caldo extracto de suelo 10% (Anexo 3) y se incubaron a 30°C, por 72 horas, a 150rpm. A continuación, se agregaron 9mL de KCl 2M, se agitaron a 150rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo por 1 hora adicional, para después tomar 10mL del sobrenadante y centrifugarlos (2000rpm) durante 3 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución y se añadieron 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante. Los tubos se agitaron manualmente por 2 minutos y se dejaron en reposo durante 1 hora adicional.

La reacción se consideró positiva a la fijación de nitrógeno por la aparición de una coloración azul, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9nm y las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100ppm de cloruro de amonio (Anexo 3).

d. Cuantificación de ácido indolacético (AIA) producido *in vitro*

La cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* se realizó según la reacción colorimétrica de Salkowski^{13,51}. El inóculo (5%:0,25mL) de cada cultivo bacteriano fue depositado por triplicado en 5mL de caldo tripticasa soya suplementado con triptófano (Anexo 4). Después de la incubación a 30°C, por 72 horas en agitación constante (150rpm), los cultivos fueron centrifugados a 2000rpm, durante 5 minutos. A continuación, 0,4mL de cada sobrenadante se depositaron en tubos, se agregaron 1,6mL de reactivo de Salkowski modificado (Anexo 4), se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se consideró positiva a la producción de ácido indolacético por la aparición de una coloración grosella, leyéndose la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 530nm y las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución 100ppm de ácido indolacético (Anexo 4).

e. Cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

La cuantificación de fósforo solubilizado se realizó según el método colorimétrico del molibdato⁵². El inóculo (1mL) de cada cultivo bacteriano se llevó por triplicado a frascos con 20mL de caldo Sundara, Rao & Sinha Medium, SRSM (Anexo 5), y se incubaron a 30°C, con agitación constante (150rpm), por 96 horas. Después, los caldos fueron centrifugados y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble, considerándose una coloración azul positivo a la

solubilización de fósforo. La absorbancia se leyó en espectrofotómetro de luz visible a 690nm y las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución 2ppm de fósforo⁵³ (Anexo 5).

3.2.4 Segunda fase: Efecto de rizobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de maíz

Para determinar el efecto de las PGPR nativas en el desarrollo vegetativo de maíz⁵⁴, las bacterias se inocularon en las rizósfera, determinándose las características del desarrollo vegetativo, durante 75 días en condiciones de invernadero.

a. Ubicación del experimento e instalación del cultivo

El cultivo de maíz amarillo duro y la inoculación de diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas, previamente caracterizados se realizó entre el 20 de enero al 31 de marzo de 2014, en el invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque (Anexo 6).

b. Características de la especie vegetal

El híbrido simple “Súper maíz” obtenido por la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Anexo 7), es tolerante a *Erwinia chrysanthemi* causante de la pudrición bacteriana y *Fusarium* sp., hongo que afecta la mazorca y produce la aflatoxina B₁; cancerígeno para el hombre y animales. La floración masculina (50%) es a los 92 días y floración femenina (50%) a los 96 días. El periodo del cultivo es 142 días con un rendimiento promedio de 12,22tha⁻¹.

c. Acondicionamiento y análisis del suelo experimental

El suelo experimental estuvo constituido por 144kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5:2,0:0,5 que se solarizó durante 30 días. A continuación, la mezcla de suelo experimental se distribuyó en bolsas de polietileno negro de 16,5 x 23,5cm, a razón de 1,5kg por bolsa, totalizando 72 bolsas. En simultáneo se tomó una muestra representativa de 1kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo.

d. Condiciones meteorológicas

Durante el periodo de cultivo de maíz, se registraron la temperatura máxima, mínima y media, datos obtenidos por la Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicada en el fundo "El Ciénago" en Lambayeque.

e. Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación de las semillas de maíz se determinó en cinco bandejas de tecnopor de 20 x 14cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla esterilizado, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas, se depositaron 20 semillas de maíz por bandeja, distribuidas en dos hileras, a razón de diez por hilera. Las

bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C), humedeciéndolas interdiariamente, hasta observar el máximo de germinación.

f. Obtención del inóculo bacteriano

Cada bacteria fue cultivada en caldo nutritivo a 30°C (Anexo 8), durante 24 horas. Después, se obtuvieron 48mL de una suspensión de células en solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v), cuya concentración se estandarizó a 9×10^8 celmL⁻¹ con el tubo 3 del nefelómetro de Mc Farland⁴⁸.

g. Tratamiento de las semillas

Las semillas de maíz se depositaron en una bolsa de polietileno, donde se agregó el insecticida en polvo soluble Acephato O, S–dimethyl acetylphoramidothioate (Orthene 7SPS), en la dosis de 4,8gkg⁻¹ de semilla. El contenido fue homogenizado (Anexo 9), por movimientos de rotación durante 2 minutos, para que el insecticida se distribuya uniformemente sobre las semillas. A continuación, éstas fueron extendidas en el interior de la bolsa y llevadas sobre una bandeja a la estufa a 30°C, para disminuir el exceso de humedad.

h. Aplicación de las bacterias en la rizósfera

En 72 bolsas de polietileno negro conteniendo el suelo experimental se sembraron tres semillas de maíz por bolsa y después de 7 días se eliminó la plántula menos vigorosa, quedando dos por tratamiento (Anexo 10). A continuación, en 60 bolsas se inocularon las bacterias en la rizósfera. Previamente en

ambos lados de las plántulas se realizaron dos surcos a 5cm del tallo y con una profundidad de 3cm, donde se depositaron respectivamente 8mL del inóculo bacteriano, a razón de 4 mL/plántula (Anexo 11).

Al testigo químico se le aplicó fertilizante químico: 240N: 80P: 80K, correspondiente a 0,5g de urea (46% N), 0,2g de fosfato diamónico (50% P) y 0,2g de sulfato de potasio (50% K) por bolsa. La úrea se aplicó fraccionada, 50% a la siembra y 50% después de 38 días. El fosfato diamónico y sulfato de potasio se aplicaron a la siembra. También se incluyó un testigo absoluto sin bacteria y sin fertilizante químico, al que se le aplicó agua destilada.

i. Monitoreo

A los 25, 50 y 75 días se midió la altura de las plantas (Anexos 12 a 14). A los 75 días se extrajeron las plantas y se determinó el peso de la biomasa seca de la parte aérea y radicular (Anexos 15, 16). La altura de la planta se expresó en cm, considerando desde la base hasta el extremo final de la hoja bandera. A continuación, se cortó la parte aérea de cada una de las plantas a ras del suelo y junto con la raíz y suelo adherido se depositaron en bandejas de plástico. Para determinar el peso de la materia seca, tanto la raíz previamente lavada como la biomasa aérea se deshidrataron en el horno a 70°C, hasta alcanzar peso constante⁵⁵. El peso de la biomasa se determinó en una balanza de precisión y con los datos obtenidos, se calculó el

índice de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula⁵⁴ siguiente:

$$\text{IEI \%} = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{Control sin inoculación}}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

3.2.5 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron determinar el efecto de los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en el desarrollo vegetativo de maíz amarillo duro. Con los valores de la altura de planta y peso de la biomasa radical y aérea, se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Para el diseño completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = observación del i -ésimo tratamiento, J -ésima repetición

μ = media general de la variable respuesta

t_i = efecto i -ésimo tratamiento, siendo $i=1,2,3,4,5,\dots, 12$

E_{ij} = error experimental en el i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 \dots = \mu_{12}$

H_a = Al menos una media diferente

Según los resultados en las pruebas de normalidad, se realizaron análisis paramétricos: Análisis de varianza y prueba de Tukey y no paramétricos: Kruskal – Wallis⁵⁶. En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0, así como los programas de Microsoft Office Word, Excel versión 2007 y Minitab 15.

4. RESULTADOS

4.1 Características de *Azospirillum spp.* nativas

Las rizobacterias nativas del género *Azospirillum* fijaron nitrógeno como amonio, produjeron ácido indolacético y solubilizaron fósforo (Figuras 1 a 3); destacando *Azospirillum sp.* 77 en la fijación de nitrógeno (32,1ppm) y producción de ácido indolacético (35,3ppm) y *Azospirillum sp.* 65 en la solubilización de fósforo (3,41ppm).

4.2 Análisis del suelo experimental

El análisis físico - químico del suelo experimental, demostró una reacción ligeramente ácida (pH 6,20), con moderada salinidad (CE = 6,20dSm⁻¹), bajo contenido de materia orgánica (1,32%), fósforo (6,80ppm) y carbonato (0,75%), así como alto contenido de potasio (327ppm). A su vez, la textura fue franco arenosa, con baja retención de humedad (Anexo 17).

4.3 Condiciones meteorológicas

La Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, reportó la temperatura media mínima de 19,3°C en marzo y la máxima de 23,6°C en enero (Anexo 18).

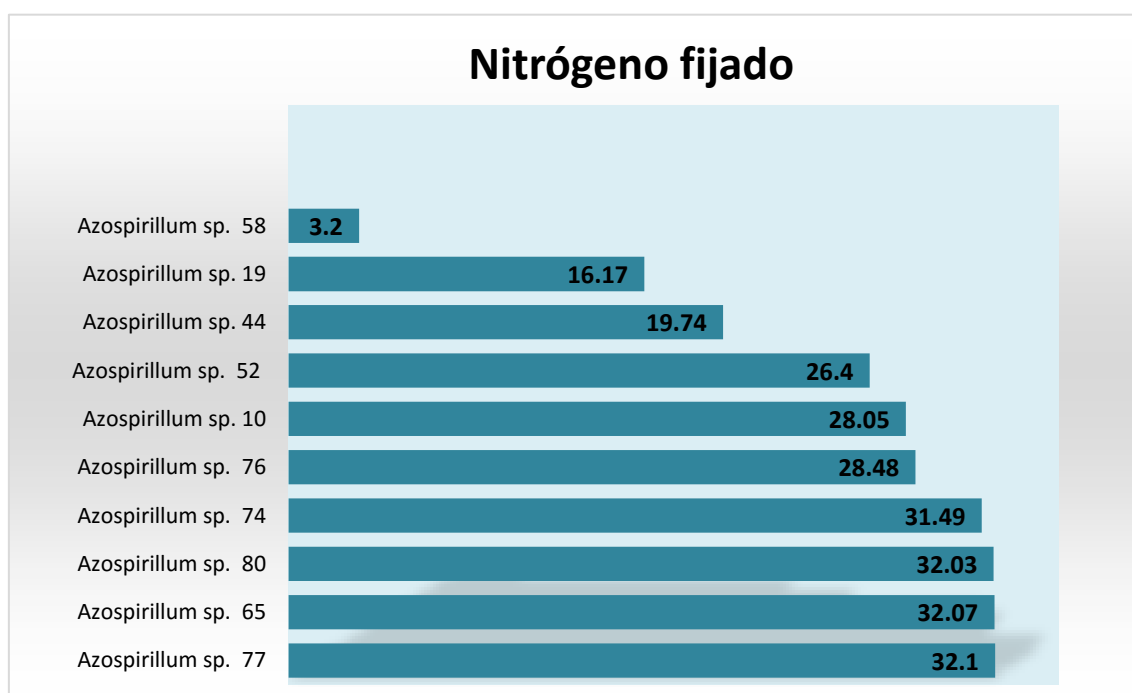


Fig. 1. Nitrógeno fijado como amonio (ppm) por diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en caldo extracto de suelo a los 7 días.

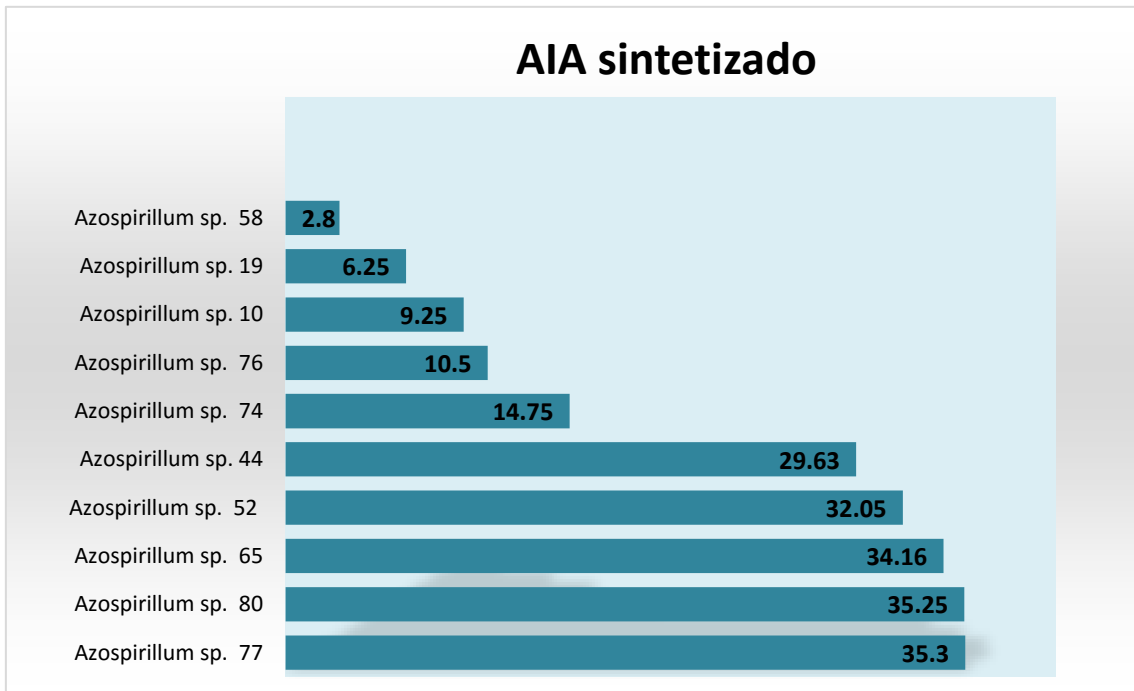


Fig. 2. Ácido indolacético producido (ppm) por diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en caldo tripticasa soya a los 7 días.

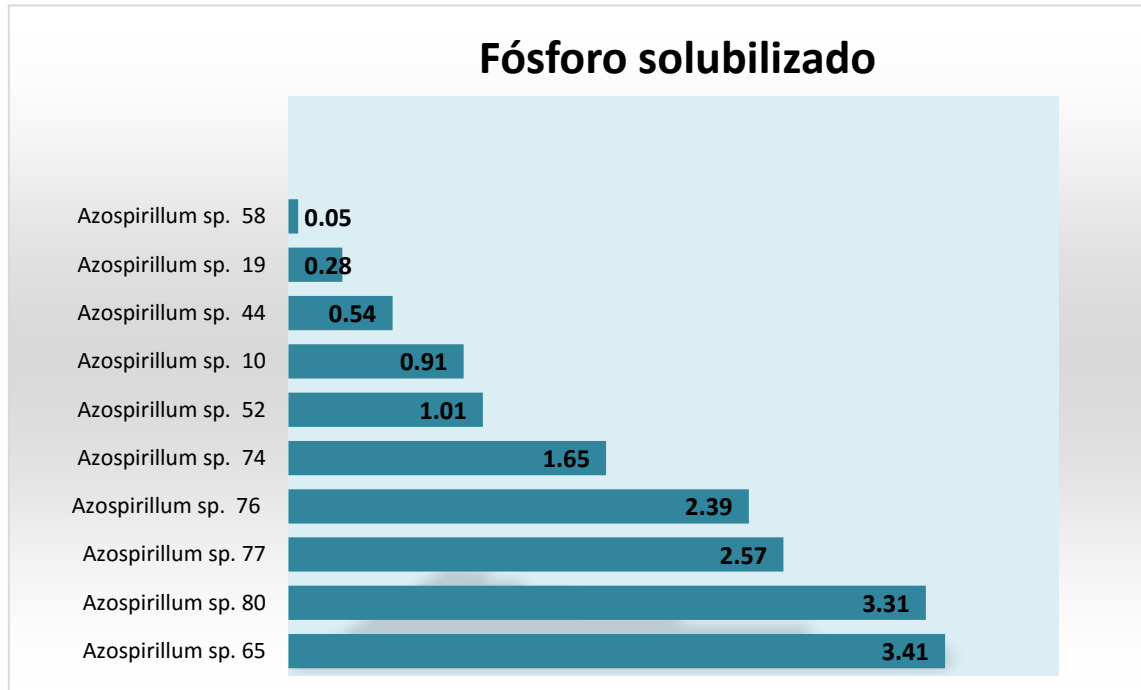


Fig. 3. Fósforo solubilizado (ppm) por diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en caldo Sundara Rao Sinha a los 7 días.

4.4 Porcentaje de germinación

Las semillas de maíz amarillo duro presentaron 98% de germinación (Anexo 19).

4.5 Efecto de *Azospirillum* spp. en el desarrollo vegetativo de maíz amarillo duro en invernadero

El análisis de los valores de los parámetros de maíz, demostró que el desarrollo vegetativo fue incrementado con la inoculación de *Azospirillum* spp. en la rizósfera. En este contexto, se determinó aumento en la altura, peso de la biomasa seca aérea y radicular de las plantas, así como también precocidad de la floración femenina y masculina (Anexos 20 a 30).

Los valores de altura de planta a los 25, 50 y 75 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp., así como también la biomasa aérea, presentaron distribución normal ($p > 0,05$) y homogeneidad de varianza ($p > 0,05$), por lo que se realizó el análisis de varianza y la prueba múltiple de Tukey. Los valores de la biomasa radicular no presentaron distribución normal, por lo que se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Anexos 31 a 39).

La altura de las plantas de maíz a los 25 días fue de 64,51–70,32cm con *Azospirillum* spp.; 64,98cm en el testigo químico y 64,04cm en el testigo absoluto (Figura 4, anexos 20, 21), valores correspondientes a índices de efectividad de 0,73–9,80% y 1,47% con *Azospirillum* spp. y testigo químico, respectivamente (Anexo 22). La prueba F del análisis de varianza no demostró significancia (Anexos 31, 32) evidenciando que no existieron diferencias significativas en el índice de efectividad en la altura.



Fig. 4. Altura (cm) de *Zea mays* L. amarillo duro 25 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

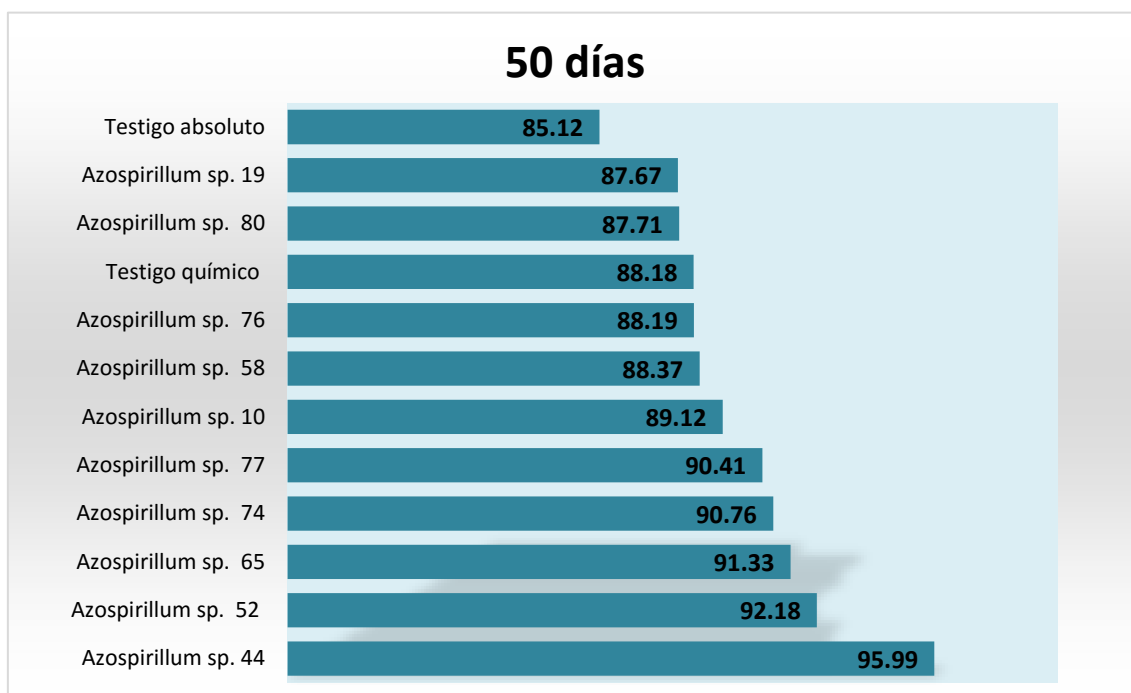
La altura de las plantas de maíz a los 50 días fue de 87,67–95,99cm con *Azospirillum* spp.; 88,18cm en el testigo químico y 85,12cm en el testigo absoluto (Anexos 20, 23, figura 5), valores correspondientes a índices de efectividad de 3,0–12,77% y 3,59% con *Azospirillum* spp. y testigo químico, respectivamente (Anexo 22). La prueba F del análisis de varianza mostró alta significancia (Anexos 33, 34) y según la prueba multiple de Tukey el mayor valor en el índice

de efectividad se alcanzó con *Azospirillum* sp.44., no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp.10, 52, 65, 74 y 77.

La altura de las plantas de maíz a los 75 días fue de 95–105,81cm con *Azospirillum* spp.; 106,88cm en el testigo químico y 93,02cm en el testigo absoluto (Anexo 20, figura 6), valores correspondientes a índices de efectividad 2,13–13,75% y 7,55% con *Azospirillum* spp. y testigo químico, respectivamente (Anexos 22, 24). La prueba F del análisis de varianza mostró alta significancia (Anexos 35, 36) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.44, no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp.10, 52, 65, 74 y 80.

La floración masculina de las plantas de maíz ocurrió a los 56–63 días con *Azospirillum* spp.; 59 días con el testigo químico y 63 días con el testigo absoluto (Anexos 25, 26). La floración femenina ocurrió a los 70–74 días con *Azospirillum* spp., 71 días con el testigo químico y 75 días con el testigo absoluto (Anexos 26, 27). En este contexto, la inoculación con *Azospirillum* spp. aceleró la floración, en comparación con los testigos químico y absoluto, como se observó con *Azospirillum* spp.44, 52 y 76 en la floración masculina y *Azospirillum* sp.44 en la floración femenina.

Fig. 5. Altura (cm) de *Zea mays* L. amarillo duro 50 días después de la



inoculación de *Azospirillum spp.* nativas en la rizósfera, 2014.



Fig. 6. Altura (cm) de *Zea mays* L. amarillo duro 75 días después de la inoculación de *Azospirillum spp.* nativas en la rizósfera, 2014.

El peso de la biomasa aérea de las plantas de maíz a los 75 días fue de 18,86–23,34g con *Azospirillum* spp.; 20,05g en el testigo químico y 16,78g en el testigo absoluto (Figura 7, anexo 28), valores correspondientes a índices de efectividad 12,40–39,09% y 19, 49% con *Azospirillum* spp. y testigo químico, respectivamente (Anexo 29). La prueba F del análisis de varianza mostró alta significancia (Anexos 37, 38) y según la prueba múltiple de Tukey el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.77. no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp.10, 19, 44, 52 y 74.

El peso de la biomasa radicular de las plantas de maíz a los 75 días fue de 2,44–4,54g con *Azospirillum* spp.; 3,48cm en el testigo químico y 2,78g en el testigo absoluto (Figura 8, anexos 28, 30), valores correspondientes a índices de efectividad de 10,79–63,31% y 25,18% con *Azospirillum* spp. y testigo químico, respectivamente (Anexo 29). La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, demostró que el mayor valor se alcanzó con *Azospirillum* sp.80, no diferenciándose significativamente de *Azospirillum* spp.58, 65, 74, 76 y 77 (Anexo 39).

Azospirillum sp. 65 incrementó el desarrollo vegetativo de maíz, superando al testigo químico en la altura a los 25 y 50 días y en la biomasa aérea y radicular a los 75 días (Figuras 4, 5, 7,8) y con *Azospirillum* spp. 19 y 58 no se alcanzó efectividad en la biomasa radicular (Anexo 29).

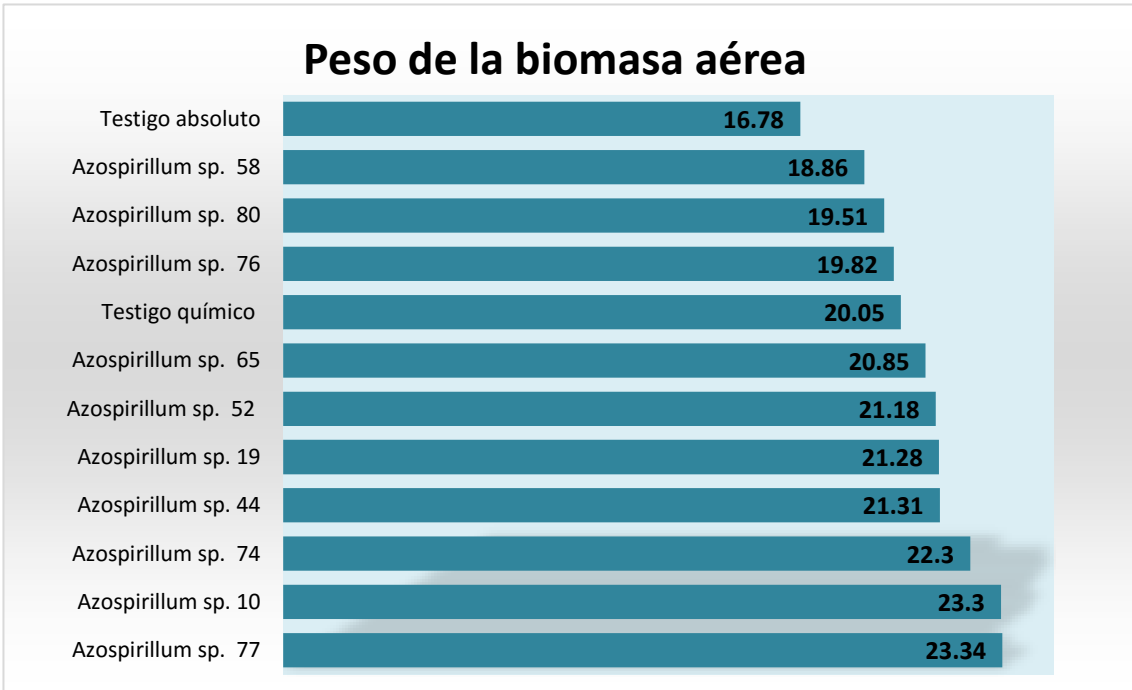


Fig. 7. Biomasa seca aérea (g) de *Zea mays* L. amarillo duro 75 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

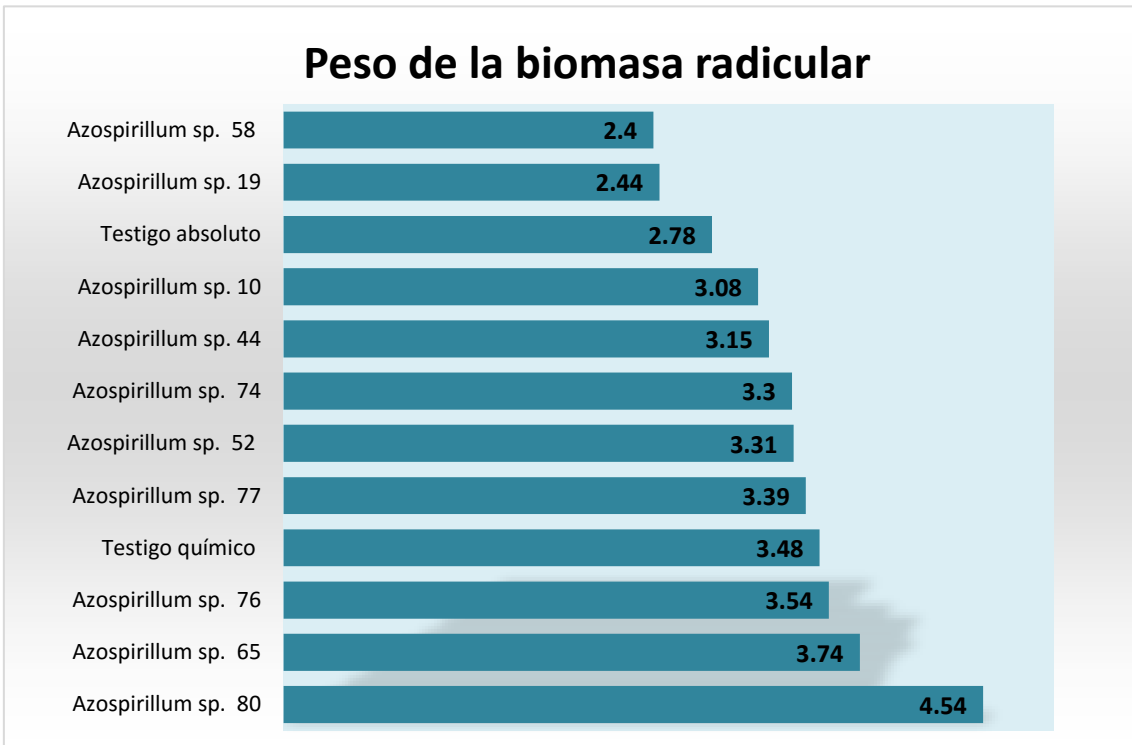


Fig. 8. Biomasa seca radicular (g) de *Zea mays* L. amarillo duro 75 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

5. DISCUSIÓN

Las rizobacterias nativas produjeron ácido indolacético, fijaron nitrógeno y solubilizaron fósforo, características por las que *Azospirillum* spp. son consideradas bacterias promotoras de crecimiento en plantas^{13,57,58}.

El AIA se cuantificó mediante la reacción colorimétrica de Salkowski, en la que la concentración del indol es directamente proporcional a la intensidad del color grosella observado. Éste es el resultado de una reacción oxidativa en acidez, en la que por una transaminación un grupo amino del indol es sustituido por el cloruro del cloruro férrico⁵¹. Con *Azospirillum* spp. se cuantificó 35,30ppm de AIA, valor que está en el rango de 16-40ppm reportado⁵⁷ para *A. lipoferum*, *A. paspali* y *A. brasilense*; no obstante, se superaron las concentraciones 1,08; 15,8 y 23,3ppm reportadas^{57,59,60} con bacterias aisladas de algodón, tomate y maíz, respectivamente.

Las bacterias nativas fijaron nitrógeno, coincidiendo con otros investigadores^{59,61,62}, quienes demostraron la diazotrofia en estas bacterias. A través del complejo enzimático nitrógenasa se reduce una molécula de nitrógeno a dos de amoníaco, que rápidamente se ionizan hasta amonio, fácilmente asimilable por la planta. El amonio fue cuantificado por el método del fenol-hipoclorito, basado en la aparición de un azul intenso de indofenol, producto de la reacción del amonio con los componentes fenólicos, en presencia del agente

oxidante hipoclorito de sodio y con el catalizador nitroprusiato de sodio o el ferrocianato de potasio^{49,58}. Se cuantificó hasta 32,10ppm de amonio superando el rango 20-29ppm reportado^{13,57,58,60} para aislados de arroz, tomate y maíz.

El fósforo solubilizado se cuantificó mediante el método colorimétrico del molibdato en el que en solución ácida los iones ortofosfato, producto de la solubilización del fosfato di o tricálcico reaccionan con los iones molibdato, formando ácido molibdofósforico. Éste es reducido en presencia de ácido ascórbico y forma azul de fosfomolibdeno con una coloración azul, cuya aparición es acelerada con el emético tartrato doble de nitrógeno y potasio^{53,63}. Con *Azospirillum* spp. nativas se alcanzó 3,41ppm de fósforo solubilizado, superando 2,57 ppm reportado¹¹ con aislados de malezas asociadas a maíz.

Azospirillum spp. inoculadas en la rizósfera de maíz, afectaron positivamente en mayor o menor grado el desarrollo, incrementando la altura y biomasa y disminuyendo los días requeridos para la floración. Esta variabilidad es explicada por la diversidad genética de las bacterias, que se traduce en diferente grado en el potencial biológico⁶⁴, aunque también se consideran las condiciones ecológicas y ambientales, presencia de microorganismos en la rizósfera, genotipo del hospedante y capacidad de las bacterias para establecerse y competir con la biomasa nativa¹⁵.

En cuanto a la actividad de *Azospirillum* como PGPR, se han propuesto como mecanismos la fijación de nitrógeno, efectos hormonales con incremento del crecimiento de las raíces que permite una mayor absorción, alteración de la membrana citoplasmática para favorecer la absorción de iones y la “hipótesis

aditiva” que propone la interacción de todos los mecanismos mencionados. Como consecuencia, *Azospirillum* ejerce sobre la planta un efecto multiparamétrico observándose incremento en la germinación, desarrollo de las raíces, altura y tamaño de las hojas, precocidad a la floración y aparición de espigas, así como también, aumento de la biomasa y concentración de nitrógeno³⁰.

La altura de las plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum* spp. se incrementó, coincidiendo con reportes previos^{18,28,65}. Éste efecto también fue reportado con *Capsicum annum* L.²³, *Lycopersicum esculentum* Mill⁵⁶ y *Oryza sativa* L.¹³. Las especies de *Azospirillum* producen los reguladores del crecimiento vegetal auxinas, citocininas y giberelinas^{51,59}. Las auxinas como el ácido indolacético regulan diferentes procesos fisiológicos e inducen el crecimiento en longitud de la planta, así como también la maduración de frutos, floración, senectud y geotropismo¹³.

El mayor índice de efectividad de *Azospirillum* spp. en la altura de maíz fue 13,75% inferior a 49% reportado⁵⁷ en tomate; no obstante, en esta investigación las plantas presentaron aspecto clorótico, evidenciando la falta de nutrientes.

Las especies de *Azospirillum* inicialmente fueron reconocidas por su capacidad para fijar nitrógeno en forma no simbiótica; sin embargo, menos del 5% es incorporado a las plantas⁶⁶⁻⁶⁸. En la actualidad destacan por la producción y liberación de reguladores de crecimiento³⁵. En el presente estudio las bacterias nativas fijaron nitrógeno en laboratorio e incrementaron la biomasa aérea y radicular, resultado que es explicado por el impacto en la nutrición nitrogenada,

directamente por la estimulación de los sistemas de absorción de iones nitratos e indirectamente por la proliferación radicular⁶⁰. En laboratorio se ha demostrado que el nitrógeno incrementa su propia tasa de absorción e induce ramificación radicular. El aumento de la superficie de las raíces y por tanto del volumen del suelo al que tienen acceso incrementa la absorción de nutrientes especialmente nitrógeno, que conlleva a la acumulación de biomasa aérea⁶⁶.

La inoculación de *Azospirillum* spp. incrementó la biomasa aérea (23,34%) y radicular (63,31%) de las plantas de maíz. La superioridad en el IE en las raíces también fue observada en maíz inoculado con *A. lipoferum*⁶⁵, alcanzando IE de 8,46% en el follaje y 22,4% en las raíces de maíz. A su vez, en arroz se registraron¹³ IE de 102% en la parte aérea y 121% en las raíces de arroz inoculado con *Azospirillum* spp. Estas bacterias modifican el sistema radicular, principalmente por la producción de reguladores del crecimiento vegetal que incrementan el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve una mayor captación de agua y minerales^{35,69}.

En el presente estudio, las bacterias sintetizaron AIA en laboratorio e incrementaron la biomasa de las raíces. Al respecto, se ha demostrado⁶⁹ que las especies de *Azospirillum* sintetizan hasta 40ppm de AIA y en concentraciones menores, pero biológicamente significativas ácido indol-3-láctico, ácido-3-butírico, indol-3-etanol e indol-3-metanol, así como también se han identificado giberelinas, ácido abscísico y citoquininas. Estudios sobre la aplicación de estos compuestos bacterianos en plántulas demostraron efectos similares a los que se observan con *Azospirillum*, incluyendo cambios en el desarrollo y morfología

radicular e incremento en la longitud de las raíces, número y ramificación de pelos radiculares^{51,68,70}.

Azospirillum spp. 19 y 58 incrementaron la altura y biomasa aérea pero no la radicular, coincidiendo con investigaciones previas^{57,65}. Al respecto⁷¹, la mayor o menor absorción de reguladores del crecimiento por la planta, en adición a la concentración endógena, puede estimular o inhibir tejidos y órganos, porque se altera el “pool endogeno”. El AIA induce mayor desarrollo de raíces, aumento del nivel de nutrientes y crecimiento de las plantas; sin embargo, la adición de auxinas debe ser regulada estrictamente, porque en exceso pueden inhibir el crecimiento en longitud de la raíz⁷². Esta inhibición se produce porque altas concentraciones de auxinas, giberelinas o citoquinas en los tejidos inhiben la síntesis de etileno, que a su vez inhibe la elongación de las raíces en las plantas^{73,74}.

La floración masculina y femenina de maíz se aceleró con la aplicación de *Azospirillum* spp., coincidiendo con otros investigadores^{57,75}, quienes observaron precocidad en la floración de plantas de tomate inoculadas con *Azospirillum* spp. Al respecto, se ha demostrado que las plantas inoculadas con *Azospirillum* spp. además del incremento en altura y biomasa muestran floración y aparición de espigas más temprana, así como 5–30% de aumento en el rendimiento de cultivos agrícolas de importancia económica^{18,19,67,76}.

Los índices de efectividad mínimos también pueden atribuirse a que las bacterias no encontraron el ambiente requerido, ni se asociaron con las raíces para escapar de los mecanismos de defensa de la planta y lograr condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su establecimiento y multiplicación²⁰.

No se ha definido el mecanismo por el cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal; sin embargo, se han propuesto la fijación de nitrógeno, efectos hormonales, incremento en crecimiento del sistema radicular, alteración del funcionamiento de la membrana y la hipótesis aditiva que propone la interacción de todos los mecanismos mencionados³⁰. En este contexto, *Azospirillum* sp. 65 fijó nitrógeno (32,07ppm), produjo ácido indolacético (34,16ppm), solubilizó fósforo (3,41ppm) e incrementó la altura, biomasa aérea y radicular de las plantas de maíz superando inclusive al testigo químico. El efecto de estas bacterias en condiciones de campo debe ser investigado con la perspectiva de obtener un inoculante comercial para maíz.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Los diez cultivos de *Azospirillum* spp. nativas fijaron nitrógeno como amonio (3,2-32,1ppm), produjeron ácido indolacético (2,8-35,3ppm) y solubilizaron fósforo (0,05-3,41ppm), destacando *Azospirillum* sp. 77 en la fijación de nitrógeno (32,1ppm) y producción de ácido indolacético (35,3ppm) y *Azospirillum* sp. 65 en la solubilización de fósforo (3,41ppm).
- ✓ Los diez cultivos *Azospirillum* spp. incrementaron el desarrollo vegetativo de maíz en condiciones de invernadero, observándose aumento en la altura (IE=0,73-13,75%), biomasa aérea (IE=18,86-23,34%) y precocidad en la floración. Asimismo, ocho cultivos de *Azospirillum* spp. incrementaron la biomasa radicular (IE= 10,79-63,31%).
- ✓ *Azospirillum* sp. 65 superó al testigo químico en los IE en la altura a los 25 y 50 días, biomasa aérea y radicular a los 75 días.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar el efecto de los cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz en campo.
- ✓ Investigar el efecto de *Azospirillum* sp. 65 en combinación con 25-50% de la dosis del fertilizante químico.
- ✓ Investigar sustratos de bajo costo y disponibles en la región para el incremento masivo de *Azospirillum* spp.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Agricultura, MINAG. Estadística Agraria Mensual. Lima: Sistema Integrado de Estadística Agraria, SIEA; 2012.
2. Nicolalde A, Quintana D. Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo brócoli (*Brassica oleraceae* var. Legacy) en Otavalo. Ibarra: Universidad Técnica del Norte; 2010.
3. Pedraza R, Teixeira K, Fernández A, García I, Baca B, Azcón R, Baldani V, Bonilla R. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica Cienc Tecnol Agropecu. 2010;11(2):155-164.
4. Salhia B. The effect of *Azotobacter chroococcum* as nitrogen biofertilizer on the growth and yield of *Cucumis sativus*. [Degree of Master]. Gaza: The Islamic University; 2010.
5. Aguado S. [Ed]. Introducción al uso y manejo de los biofertilizantes en la agricultura. México; 2012 [Consultado 5 de Junio de 2014]. Recuperado de: www.inifap.gob.mx.
6. Hernández A, Heydrich M, Velázquez M, Hernández A. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. Rev Mex Fitopatol. 2006; 24(1):42-49.
7. Martínez O, Jorquera M, Crowley D, Gajardo G, Mora M. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J Plant Nutr Soil Sci. 2010;10(3):293-319.

8. Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ashamed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: Annu Rev Microbiol. 2010;60(4):579-598.
9. Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Biotechnol Agron Soc Environ. 2011;15(2):327-337.
10. Bhattacharyya P, Jha D. Plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28:1327-1350.
11. Casos I, Santiago P. Potencial promotor del crecimiento de plantas de las especies de *Azospirillum* aisladas de raíces de malezas asociadas a *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2013. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2013.
12. Altamirano CH, Plasencia VR. Caracterización de bacterias endófitas diazotroficas aisladas de raíces de *Zea mays* L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2014.
13. Garcia F, Muñoz H. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo de arroz (*Oryza sativa*). [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2010.
14. García M, Farías R, Peña J, Sánchez J. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoam. 2004;23(1):65-72.

15. García J, Moreno V, Rodríguez I, Mendoza A, Mayek N. Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. *Agric Téc Méx.* 2006;32(2):135-141.
16. Balemi T, Pal N, Saxena K. Response of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta Agric Slov.* 2007;89(1):107-114.
17. García J, Moreno V, Rodríguez I, Mendoza A, Mayek N. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev Fitotec Mex.* 2007;30(3):305-310.
18. González A, Pérez D, Franco O, Balbuena A, Gutiérrez F, Romero H. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *Ciencia Ergo Sum.* 2011;18(1):51-58.
19. García J, Mendoza A, Mayek N. Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y Ciencia.* 2012;28(1):79-84.
20. Díaz P, Ferrera R, Almaraz J, Alcántara J. Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga. *Terra.* 2001;19(4):327-335.
21. Gonzales M, Martínez R, Corrales I, Pérez D, Gandarilla J, Alonso R, Curvelo R, Méndez V. Efectividad de un bioestimulador en la calidad de las hortalizas como sostenibilidad de las producciones en la agricultura urbana. *Centro Agrícola.* 2003;30(4):10-15.
22. Torres R, Pérez C, Suárez N. Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivo Agrícola.* 2003;30(2):56-60.

23. Di Barbaro G, Pernasetti S, Stegmayer A. Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilensis* en la germinación y emergencia del pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. var. trompa de elefante). Revista del CIZAS. 2005;6(1 y 2):74-85.
24. Toniutti M, Fornasero L. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre el crecimiento y desarrollo de *Setaria lachnea* (nees) kunth. Revista FAVE - Ciencias Agrarias. 2008;7(1-2):33-41.
25. Rangel J, Rodríguez M, Ferrera R, Castellanos J, Ramírez R, Alvarado E. Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. Agron Mesoam. 2011;22(2):269-279.
26. Uhrich W, Benintende S. Aplicación de *Azospirillum brasilense* en cultivo de soja en co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. Revista Científica Agropecuaria, 2005;9(1):71-75.
27. Bécquer C, Lazarovits G, Nielsen L, Quintan M, Adesina M, Quigley L, Lalin I, Ibbotson C. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas en dos variedades de trigo. Fase II: invernadero. Rev Mex De Cienc Agric. 2012;3(5):985-997.
28. Villa L, Mayek N, García J, Hernández J. Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp. Av Investig Agropecu. 2014;18(1):33-38.
29. Acebo Y, Hernández A, Rives N, Velásquez M, Hernández A. Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Colomb Biotecnol. 2011;13(1):16-22.

30. Bashan Y, Holguin G, Ferrera R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*. 1996;14(2):159-194.
31. Puente M, Peticari A. Inoculación de trigo con *Azospirillum*. Trigo en Siembra Directa. *Rev Téc Asoc Argent Product Siembra Directa*. 2006. p. 97-99.
32. Carrera A. Caracterización Bioquímica, Molecular y Funcional del Banco de cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la sierra ecuatoriana. [Tesis de Ingeniería]. Ecuador: Universidad de Ecuador; 2012.
33. Caballero J. El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. México: Universidad Nacional Autónoma de México, (UNAM); 2001.
34. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. 2003. p.341-378.
35. Aguilar J, Xiqui M, García S, Baca E. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev Latinoam Microbiol*. 2008;50(1,2):29-37.
36. Kato T, Maples C, Mera L, Serratos A, Bye R. Origen y diversificación del Maíz. Una revisión analítica. México: Editorial Impresora Apolo, S.A. 2009. p. 116.
37. Feijóo C. Comparativo de dos cultivares de maíz chala (*Zea mays* L.) a tres distanciamientos en el valle de Tumbes. [Tesis de Ingeniería]. Tumbes: Universidad Nacional de Tumbes; 2005.
38. Injante P, Joyo G. Curso – Taller: Manejo integrado de maíz amarillo duro. La Libertad: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2010.

39. Delgado Y. Control de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.) utilizando tres herbicidas pre-emergentes, en la granja “La Pradera” Chaltura – Imbabura. [Tesis de Ingeniería]. Ibarra, Ecuador: Universidad Técnica Del Norte; 2011.
40. Blanco H. Comparativo de rendimiento de 8 híbridos de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) bajo condiciones agroclimáticas de la parte media del valle Chancay Lambayeque. [Tesis de Ingeniería]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2007.
41. Serquén J. Efecto de la densidad de siembra y dosis de fertilización balanceada en el rendimiento de maíz amarillo duro en dos localidades del valle chancay Lambayeque, 2003. [Tesis de Ingeniería]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2004.
42. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales, FENALCE. El cerealista; 2010 [consultado: 22 de Setiembre de 2015]. Recuperado de: www.finagro.com.co.
43. Fassio A, Carriquiry AI, Tojo C, Romero R. Maíz: Aspectos sobre fenología. Montevideo: Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA; 1998.
44. Fuentes J. Iniciación a la Botánica. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid: Paraninfo S.A.; 2001.
45. Soplín JA, Rengifo A, Chumbe J. Análisis de crecimiento en *Zea mays* L. y *Arachis hypogaea* L. Folia Amazónica. 1993; 5(1-2):171-189.
46. Tresierra, A. Metodología de la Investigación Científica. Trujillo: Editorial Biociencia; 2000. p. 258-274.
47. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. 10^{ma} ed. España: Pearson Educación; 2004.

48. Llanos CJ. Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2012.
49. Lara C, Villalba M, Oviedo L. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos. Rev Colomb Biotecnol. 2007; 9(2):6-14.
50. Cadena S, Martínez B. Caracterización de cepas de *Pseudomonas* spp. y su efecto en la germinación y emergencia de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2011.
51. Mantilla M. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. [Tesis de Microbiología]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
52. Vázquez P, Holguin G, Puente M, López A, Bashan Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils. 2000;30(1):400-408.
53. Rodier J, Rodi L. Análisis de aguas. España: Ediciones Omega. 2005. p.152-196.
54. Carreño C. Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú. [Tesis de Doctorado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2009.
55. Ríos P, Zúñiga L. *Bacillus* spp. aisladas de rizósfera de *Lycopersicon esculentum* mill. “tomate” en Lambayeque y su potencial como promotoras

- del crecimiento de plantas. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2012.
56. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.; 2003. p. 219-322.
57. Baiocchi A, Saavedra A. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto como promotoras del desarrollo vegetativo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2011.
58. Lloclla, H. Caracterización de especies de *Azospirillum* fijadores de nitrógeno de suelo rizosférico y raíces de *Zea mays* L. en Lambayeque. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2014.
59. Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). Bogotá: Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria; 2012.
60. Muñoz V, Vásquez R. Caracterización de *Azospirillum* spp. nativas y su efecto en el desarrollo vegetativo y rendimiento de *Zea mays* L. "maíz" en Lambayeque. [Tesis de Licenciatura]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2012.
61. Carcaño M, Ferrera R, Pérez J, Molina J, Bashan Y. actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de

- Azospirillum* y *Klebsiella* aislados de maíz y teocintle. Terra Latinoam. 2006;24:493-502.
62. Reyes I, Álvarez L, Ayoubi H, Valery A. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro. 2008;20(1):37-48.
63. Bobadilla C, Rincón C. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. [Tesis de Licenciatura]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
64. Obando D, Burgos L, Rivera D, Rubiano M, Divan V, Bonilla R. Caracterización de bacteria dizotrópicas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, César (Colombia). Acta Biolo Colomb. 2010;15(3):107-120.
65. Adjanohoun A, Allagbe M, Noumavo P, Gotoechan H, Sikirou R, Dossa K, GleleKakaï R, Kotchoni S, Baba L. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on field grown maize. J Anim Plant Sci. 2011;11(3):1457-1465.
66. Mantelin S, Touraine B. Plant Growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. J Exp Bot. 2004;55(394):27-34.
67. Shoebitz M. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). [Tesis de Licenciatura]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2006.
68. Pains E, Santos L, Martínez A, Divan V, Dos Santos K, Urquiaga S, Massena V. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂

- fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*. 2008;302(1):249-261.
69. Kloepper J. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. 6 th Internacional PGPR workshop, 6-10 October. Calicut; 2003.
70. Vicentini A. Fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas en cultivares de arroz irrigado. [Tesis de Doctorado]. Rio grande del Sur: Universidad Federal de Santa María; 2006.
71. Patten C, Glick B. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *J Appl Environ Microbiol*. 2002;68:3795-3801.
72. Okon Y, Castro S. Physiological features of *Azospirillum* in the rhizosphere. En Monzón de Asconegui, M., García De salamote, I. & Miyazaki, S. (Ed), *Biología del suelo*. Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía; 2004. p.34-35.
73. Loredo C, López L, Espinosa D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoam*. 2004;22(2):225-239.
74. Carmelo M, Vera P, Bonilla R. Mecanismos de acción de las rizobacterias Promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica Cienc Tecnol Agropecu*. 2011;12 (2):159-166.
75. Terry E, Leyva A, Hernández A. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Rev Colomb Biotecnol*. 2005;7(2):47-54.
76. Ventimiglia L, Torrens L. efecto de la dosis de nitrógeno y la dosis de *Azospirillum* spp. en el comportamiento del cultivo de maíz. INTA EEA

Pergamino; 2012 [consultado: 6 de Mayo de 2015]. Recuperado de:
<http://inta.gob.ar/documentos/efecto-de-la-dosis-de-nitrogeno-y-la-dosis-de-azospirillum-spp-en-el-comportamiento-el-cultivo-de-maíz/>.

ANEXO 1

Tratamientos para determinar el efecto de 10 cultivos nativos de *Azospirillum* spp. en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L.

Tratamientos	Repeticiones					
	r ₁	r ₂	r ₃	r ₄	r ₅	r ₆
Testigo absoluto	X	X	X	X	X	X
Testigo químico	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 10	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 19	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 44	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 52	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 58	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 65	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 74	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 76	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 77	X	X	X	X	X	X
<i>Azospirillum</i> sp. 80	X	X	X	X	X	X

ANEXO 2

Medios de cultivo para el aislamiento, y mantenimiento de rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas⁵⁵

Agar nutritivo (AN)

Componentes	g/L
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000mL
Ajustar el pH a 7,0	

Esterilizar en autoclave a 121°C y 15Ib de presión, 20 minutos.

Agar tripticasa soya (TSA)

Componentes	g/L
Triptona	15,0
Peptona	5,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar agar	15,0
Agua destilada	1000mL

Esterilizar en autoclave a 121°C y 15Ib de presión, 20 minutos.

ANEXO 3

Detección y cuantificación de nitrógeno fijado *in vitro* mediante el método indirecto de valoración del ion amonio empleando la técnica colorimétrica de Berthelot: fenol – hipoclorito¹³

a. Medio libre de nitrógeno con azul de bromotimol, nfb

Componentes	g/L
Ácido málico	5,0
KOH	4,0
K ₂ HPO ₄	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	Trazas
MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
NaCl	0,02
CaCl ₂	0,01
Na ₂ MoO ₄	0,002
Azul de bromotimol (0,5% m/v en etanol)	2,0mL
Biotinol	0,5mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,8-7,0 con NaOH. Para obtener medio semisólido añadir 2g de agar agar. Para medio sólido añadir 20mg de extracto de levadura y 15g de agar.

b. Caldo extracto de suelo al 10%

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,4
MgCl ₂	0,1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05
FeCb	0,01
CaCl ₂	0,1
Triptona	1,0
Extracto de levadura	1,0
Extracto de suelo al 10%	250mL
Agua destilada	750mL

Ajustar a pH 7,3. Para obtener extracto de suelo al 10%, depositar en un matraz 250g de suelo agrícola y 500mL de agua destilada. Hervir 2 horas, completar a 500mL con agua destilada y filtrar el sobrenadante. Tomar 25mL del filtrado y completar a 500mL con agua destilada.

c. Reactivos

- **Cloruro de potasio 2 M**

Cloruro de potasio	149,12g
Agua destilada	1000mL

- **Solución alcohólica de fenol 10%**

Fenol concentrado	10mL
Alcohol 97°	90mL

- **Nitroprusiato de sodio 0,5%**

Nitroprusiato de sodio	0,5g
Agua destilada	100mL

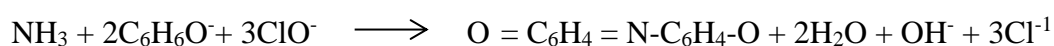
- **Solución oxidante**

Citrato de sodio	20g
Hidróxido de sodio	1g
Hipoclorito de sodio 5% lejía comercial	2mL
Agua destilada	100mL

d. Procedimiento para elaborar la curva patrón para cuantificar el ion amonio⁴⁹

d.1 Fundamento del método colorímetro de Berthelot (fenolhipoclorito)

Se basa en la formación de un color azul intenso de indo fenol, que resulta de la reacción del ion amonio (NH₄) con los compuestos fenólicos en presencia de un agente oxidante el cual puede ser hipoclorito de sodio u o-fenol; y la presencia de un catalizador, principalmente nitroprusiato de sodio o de potasio. El mecanismo de la reacción depende de la luz presente, la temperatura ambiente, catalizadores y pH alcalino. Cuando se utiliza fenol o sodio la reacción puede ser representada de la siguiente manera:



d.2 Preparación de diluciones a partir de una solución madre de NH₄Cl

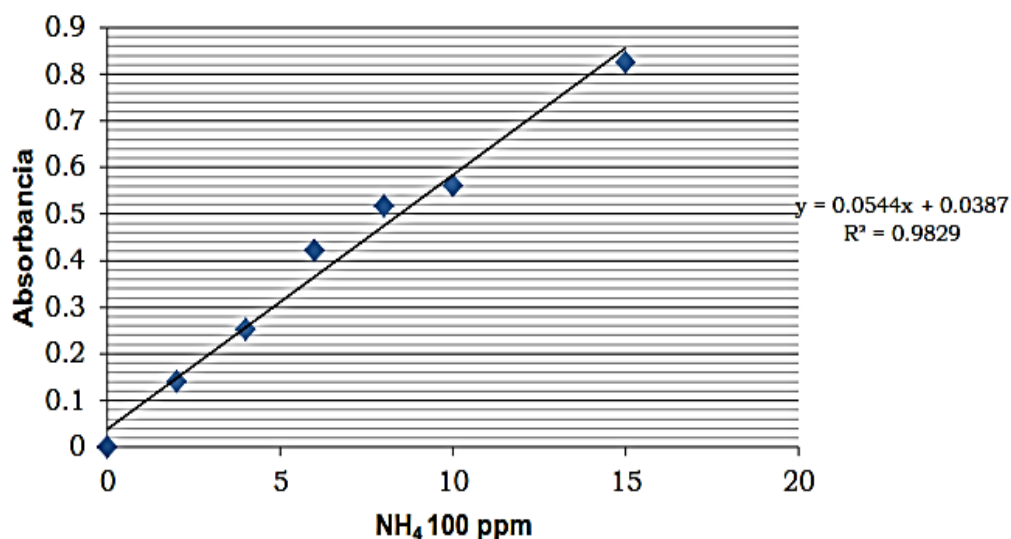
Para obtener la curva patrón se prepara una solución madre de 100ppm de NH₄Cl, para lo cual se pesa 0,1g de NH₄Cl y se disuelve en 1L de agua bidestilada. Posteriormente, a partir de la solución madre se efectúan las siguientes diluciones:

N° de tubo	Solución patrón [mL]	H ₂ O bidestilada [mL]	NH ₄ Cl (Ug/mL = ppm) NH ₄ Cl
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	2
3	0,4	9,6	4
4	0,6	9,4	6
5	0,8	9,2	8
6	1,0	9,0	10
7	1,5	8,5	15
8	2,0	8,0	20

d.3 Procedimiento para la cuantificación de amonio por colorimetría

Obtenidas las diluciones, agregar a cada tubo 0,4mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1mL de solución oxidante, luego agitar para mezclar y dejar en reposo durante 1 hora. Observar una coloración que varía del verde azul al azul intenso en función de la concentración de amonio. Leer la absorbancia de cada dilución en el espectrofotómetro a 632,9nm.

Una vez obtenida la absorbancia de todas las concentraciones de amonio, corregir los valores y mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de R^2 que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.



En la ecuación obtenida:

$$y = 0.0544 x + 0.038$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de amonio en ppm (variable independiente)

Despejar “x” para obtener la cantidad de nitrógeno fijado como amonio (ppm) por cada bacteria nativa.

$$x = \frac{y - 0.038}{0.0544}$$

Detección y cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro* mediante la reacción colorimétrica de Salkowski⁵¹

a. Caldo tripticasa soya (g/L) implementado con triptófano¹³

Componentes	g/L
Peptona de caseína	17,0
Peptona de harina de soya	3,0
D (+) Glucosa (o dextrosa)	2,5
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Triptófano	0,01
Agua destilada en cantidades suficientes	1L

b. Reactivo de Salkowski para la detección y cuantificación de ácido indolacético producido *in vitro*⁵¹

Componentes	mL/L
Agua destilada	250,0
Ácido sulfúrico concentrado	150,0
Cloruro de fierro 0,5 M en agua destilada	7,5

La solución de cloruro de fierro 0,5M se obtiene al mezclar 1,61g de cloruro de fierro (FeCl₃) con 20mL de agua destilada.

c. Procedimiento para elaborar la curva de calibración para cuantificar ácido indolacético, AIA⁵¹

c.1. Fundamento de la reacción de Salkowski

Mediante la reacción de Salkowski se detectan grupos indol presentes en el medio de cultivo y la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color rojo producido. A su vez, el cambio de color es el resultado de una reacción

oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl_3 , originando un compuesto visible de color rosado a rojo en el caso del indolacético.

Otras coloraciones indican la presencia de productos intermedios de la síntesis del ácido indolacético, que pueden ser generados a partir del triptófano.

c.2. Preparación de diluciones a partir de una solución madre de AIA

Para obtener una curva patrón de ácido indolacético, preparar una solución madre de $100\text{ug}\cdot\text{mL}^{-1}$, para lo cual se pasan 10mg de ácido indolacético y se disuelven con unas gotas de NaOH en un matraz aforado a 100mL. A continuación, enrasar con agua destilada y agitar hasta homogenizar. Posteriormente se realizan las siguientes diluciones:

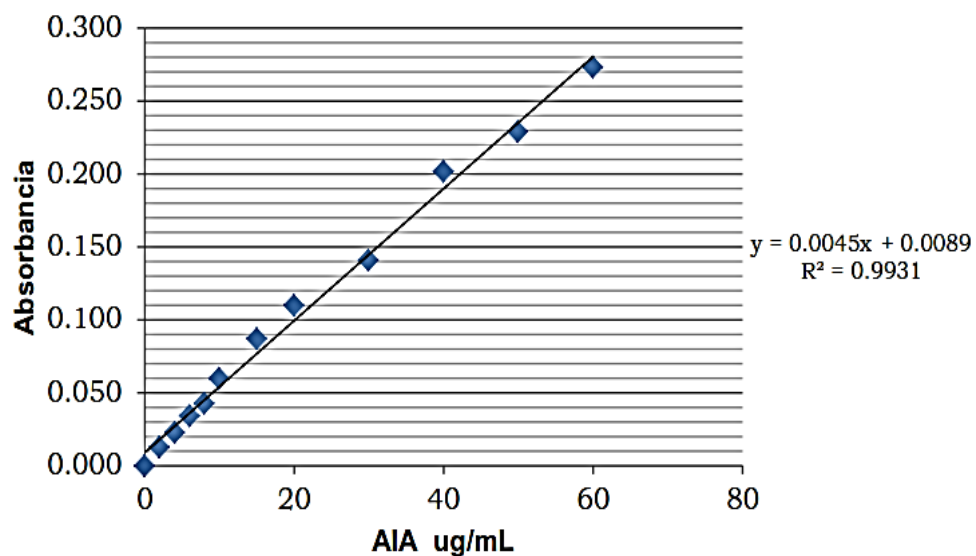
N° de tubo	Solución patrón (100 ugml/°) [uL]*	H₂O bidestilada [uL]	Concentración AIA (mg/l¹)
01	0	1000	0
02	20	980	2
03	40	960	4
04	60	940	6
05	80	920	8
06	100	900	10
07	150	850	15
08	200	800	20
09	300	700	30
10	400	600	40
11	500	500	50
12	600	400	60

* $100\mu\text{L} = 1\text{mL}$

c.3. Procedimiento para la cuantificación de AIA por colorimetría

Obtenidas las concentraciones parciales de AIA extraer de cada tubo 0,4mL de solución, verter en tubos de 13 x 75mm y agregar 1,6mL de reactivo de Salkowski (1:4). Dejar en reposo en oscuridad por 30 minutos. Observar la presencia de una coloración rojiza en los tubos. A continuación, leer la absorbancia de cada dilución en espectrofotómetro a 530nm.

Una vez obtenida la absorbancia en todas las concentraciones de ácido indolacético, corregir los valores y mediante regresión lineal en el programa Microsoft Excel 2007, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de R^2 que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.



En la ecuación obtenida:

$$y = 0.004 x + 0.008$$

Donde:

y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: x: cantidad de ácido indolacético en ppm (variable independiente)

Despejar “x” para obtener la cantidad de ácido indolacético (ppm) producido por cada bacteria nativa.

$$y = 0.004 x + 0.008$$

ANEXO 5

Detección y cuantificación de fósforo solubilizado *in vitro*

a. Agar Sundara Rao & Sinha SRSM⁵²

Componentes	g/L
Glucosa	10,0
Fosfato tricálcico	5,0
Sulfato de amonio	0,5
Cloruro de potasio	0,2
Sulfato de magnesio	0,3
Sulfato de manganeso	0,004
Sulfato de fierro	0,002
Cloruro de sodio	5,0
Extracto de levadura	0,5
Púrpura de bromocresol	0,1
Agar agar	15
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL
pH	7,2

Como fuente de fosfato se puede usar fosfato bicálcico (1g/L de fósforo), fosfato tricálcico (1g/L de fósforo) y roca fosfórica (0,2% de fósforo).

b. Método colorimétrico del Molibdato para cuantificar fósforo soluble⁵³

b.1 Fundamento

En medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que, reducido por el ácido ascórbico, desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica y cuya aparición se acelera utilizando el catalizador emérito, tartrato doble de antimonio y potasio.

b.2 Limpieza de los recipientes de vidrio

Para la limpieza del material de vidrio no utilizar detergentes que contengan fosfatos. Lavarlos con ácido clorhídrico diluido y enjuagarlos cuidadosamente con agua destilada.

b.3 Reactivos

- **Solución de ácido sulfúrico 5N**

Ácido sulfúrico (d=1.84)	14mL
Agua destilada hasta enrase	100mL
• Solución de molibdato amónico 4%	20mL
• Solución de ácido ascórbico	
Ácido ascórbico	1,76g
Agua destilada hasta enrase	100mL
• Solución de emético (preparar al momento del uso)	
Tartrato doble de antimonio y potasio	0,0274g
Agua destilada hasta enrase	100mL
• Reactivo para determinación de ortofosfatos	
Ácido sulfúrico 5 N	40mL
Solución de molibdato amónico	12mL
Solución de ácido ascórbico	24mL
Solución de emético	4mL
• Solución madre de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo	
Fosfato monopotásico previamente desecado en estufa a 100°C	24 mL
Agua destilada hasta enrase	100mL
• Solución hija de 0,2 mgL⁻¹ de fósforo	
Diluir 1mL de solución madre en 99 de agua destilada (1/100)	

b.4 Preparación de la curva de calibración

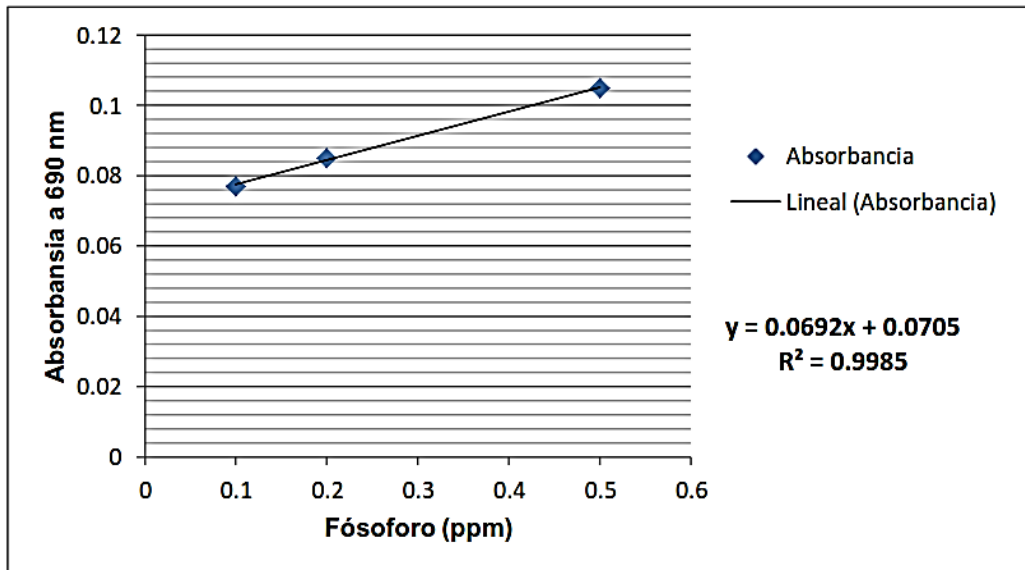
Colocar en una serie de matraces aforados de 25mL:

Número de matraces	T	I	II	m
Solución de fósforo de $0,2\text{mgL}^{-1}$	0	1	2	5
Agua bidestilada (mL)	20	19	18	15
Reactivo indicador (mL)	4	4	4	4
Agua destilada hasta enrase (mL)	25	25	25	25
Correspondencia de fósforo en mgL^{-1}	0	0,1	0,2	0,5

Esperar 20 minutos y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 690nm en cubetas de 10cm. Construir la curva de calibración. Los datos de la absorbancia corregida se analizan mediante regresión lineal con el programa Microsoft Excel 2007 para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente R^2 que deberá ser mayor a 0,9 para demostrar una dispersión homogénea de los valores sobre la recta.

b.5 Procedimiento para cuantificar fosfatos en la muestra

Introducir 20mL de la muestra a analizar en un matraz aforado de 25mL. Añadir 4mL de reactivo indicador, completar el volumen a 25mL con agua destilada. Esperar 20 minutos y efectuar la lectura en el espectrofotómetro de luz visible con una longitud de onda de 690nm. Tener en cuenta el valor leído para el testigo. Obtener los resultados en la curva de calibración. Para una muestra de 20mL, la curva indica el contenido de fósforo expresado en miligramos por litro. La coloración es estable 24 horas.



En la ecuación obtenida:

$$y = 0,069x + 0,071$$

Donde:

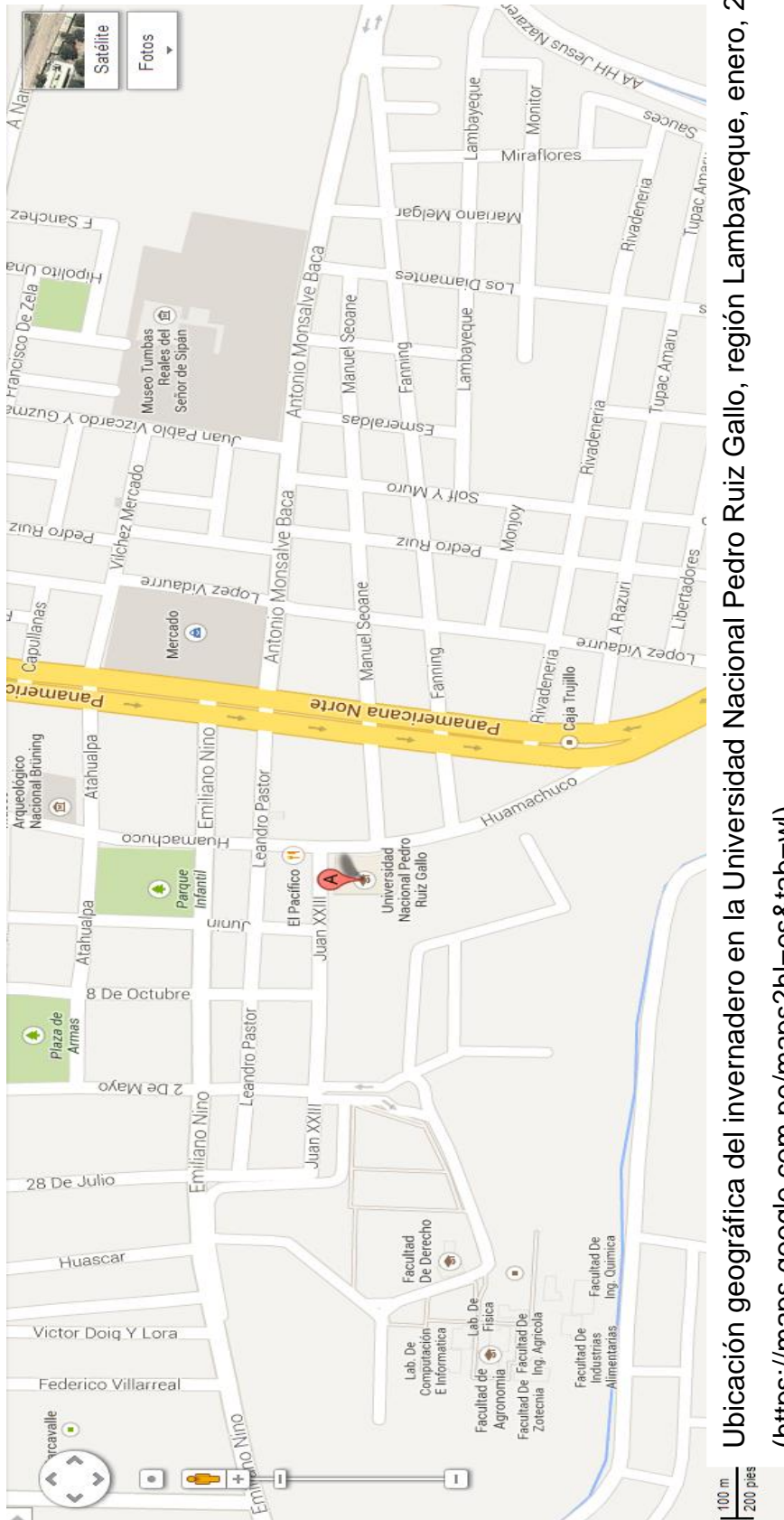
y: representa la absorbancia captada (variable dependiente)

x: cantidad de fósforo ppm (variable independiente)

Despejar “x” para obtener la cantidad de fósforo (ppm) solubilizado por cada bacteria nativa.

$$x = (y - 0,071) / 0,069$$

ANEXO 6



Ubicación geográfica del invernadero en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, región Lambayeque, enero, 2014
(<https://maps.google.com.pe/maps?hl=es&tab=wl>).

ANEXO 7



Semillas de maíz amarillo duro.

ANEXO 8



Inóculo de *Azospirillum* sp.

ANEXO 9



Bolsa de polietileno conteniendo las semillas de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro donde fueron mezcladas con el insecticida.

ANEXO 10



Siembra de semilla de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro en el suelo experimental contenido en bolsas de polietileno negras.

ANEXO 11



Inoculación de *Azospirillum* sp. nativa en la rizósfera de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro.

ANEXO 12



Medición de altura de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, 25 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas.

ANEXO 13



Medición de altura de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, 50 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas.

ANEXO 14



Medición de altura de *Zea mays* “maíz” amarillo duro, 75 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas.

ANEXO 15



Pesaje de la biomasa seca radicular de *Zea mays* "maíz" amarillo duro.

ANEXO 16



Pesaje de la biomasa seca aérea de *Zea mays* "maíz" amarillo duro.

ANEXO 17

Análisis físico químico* de muestras de suelo experimental utilizado para la siembra de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque, 2014

pH	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	P (ppm)	K (ppm)	Calcáreo (%)	Textura (%)			Tipo de suelo
						Ao	Lo	Ar	
6,20	6,20	1,32	6,80	327	0,75	66	15	19	Fo Ao

*Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria. Estación Experimental Vista Florida – Chiclayo, 2014.

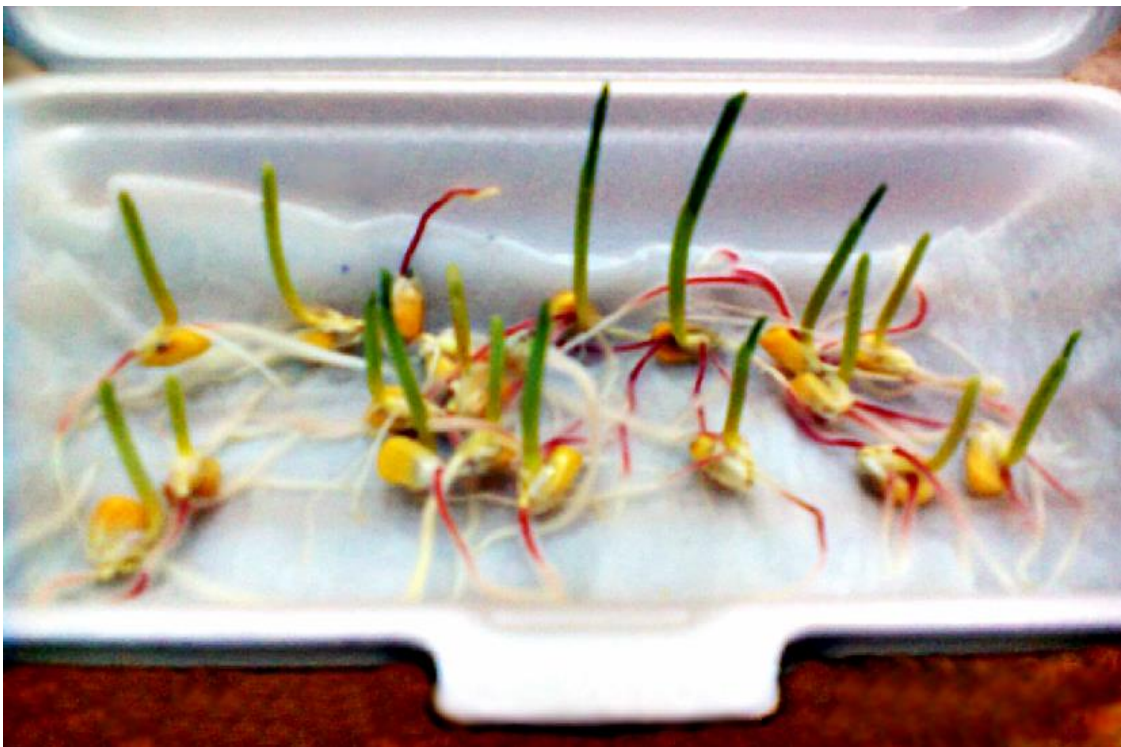
ANEXO 18

Valores promedios de temperatura (°C) en Lambayeque* enero – marzo de 2014

Meses	Temperatura (° C)		
	Máxima	Mínima	Media
Enero	27,5	19,6	23,6
Febrero	24,5	17,6	21,1
Marzo	22,4	16,2	19,3

*Estación Meteorológica de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque.

ANEXO 19



Semillas de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro germinadas.

ANEXO 20

Altura (cm) de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014

Tratamientos	Días		
	25	50	75
Testigo absoluto	64,04	85,12	93,02
Testigo químico	64,98	88,18	106,88
<i>Azospirillum</i> sp. 10	67,25	89,12	98,92
<i>Azospirillum</i> sp. 19	66,33	87,67	96,46
<i>Azospirillum</i> sp. 44	69,30	95,99	105,81
<i>Azospirillum</i> sp. 52	70,32	92,18	102,25
<i>Azospirillum</i> sp. 58	65,92	88,37	98,25
<i>Azospirillum</i> sp. 65	69,63	91,33	101,92
<i>Azospirillum</i> sp. 74	66,80	90,76	99,96
<i>Azospirillum</i> sp. 76	64,55	88,19	96,29
<i>Azospirillum</i> sp. 77	65,80	90,41	95,00
<i>Azospirillum</i> sp. 80	64,51	87,71	98,69

ANEXO 21



Altura de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro, 25 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 22

Índice de efectividad (IE) de los 10 cultivos de *Azospirillum* spp. nativas en la altura de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculadas en la rizósfera, 2014

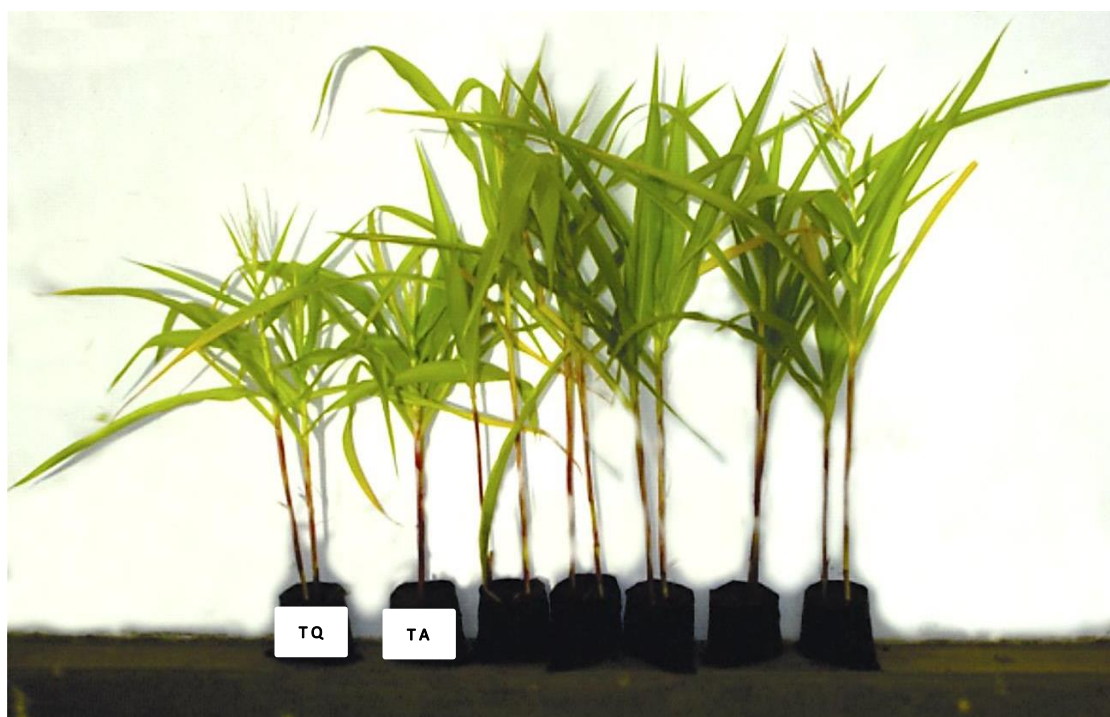
Tratamientos	IE (%)		Días			
	25	50	75	75	75	75
Testigo químico	1,47	a	3,59	bc	7,55	abcd
<i>Azospirillum</i> sp. 10	5,01	a	4,70	abc	6,34	ab
<i>Azospirillum</i> sp. 19	3,58	a	3,0	c	3,70	bcd
<i>Azospirillum</i> sp. 44	8,21	a	12,77	a	13,75	a
<i>Azospirillum</i> sp. 52	9,80	a	8,30	ab	9,92	ab
<i>Azospirillum</i> sp. 58	2,93	a	3,82	bc	5,62	bcd
<i>Azospirillum</i> sp. 65	8,72	a	7,29	abc	9,56	abc
<i>Azospirillum</i> sp. 74	4,31	a	6,62	abc	7,46	abcd
<i>Azospirillum</i> sp. 76	0,80	a	3,61	bc	3,52	bcd
<i>Azospirillum</i> sp. 77	2,75	a	6,21	abc	2,13	cd
<i>Azospirillum</i> sp. 80	0,73	a	3,04	bc	6,09	abcd

ANEXO 23



Altura de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro, 50 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 24



Altura de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro, 75 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 25



Floración masculina en *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 26

Días requeridos para la floración de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp nativas en la rizósfera, 2014

Tratamientos	Días	
	Floración masculina	Floración femenina
Testigo absoluto	63	75
Testigo químico	59	71
<i>Azospirillum</i> sp. 10	59	74
<i>Azospirillum</i> sp. 19	56	72
<i>Azospirillum</i> sp. 44	58	70
<i>Azospirillum</i> sp. 52	58	73
<i>Azospirillum</i> sp. 58	61	74
<i>Azospirillum</i> sp. 65	60	74
<i>Azospirillum</i> sp. 74	59	74
<i>Azospirillum</i> sp. 76	58	74
<i>Azospirillum</i> sp. 77	60	74
<i>Azospirillum</i> sp. 80	63	73

ANEXO 27

.Floración femenina en *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro, inoculado con



Azospirillum spp. nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 28

Peso seco de la biomasa* (g) aérea y radicular de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014

Tratamientos	Biomasa seca (g)	
	Aérea	Radicular
Testigo absoluto	16,78	2,78
Testigo químico	20,05	3,48
<i>Azospirillum</i> sp. 10	23,30	3,08
<i>Azospirillum</i> sp. 19	21,28	2,44
<i>Azospirillum</i> sp. 44	21,31	3,15
<i>Azospirillum</i> sp. 52	21,18	3,31
<i>Azospirillum</i> sp. 58	18,86	2,40
<i>Azospirillum</i> sp. 65	20,85	3,74
<i>Azospirillum</i> sp. 74	22,30	3,30
<i>Azospirillum</i> sp. 76	19,82	3,54
<i>Azospirillum</i> sp. 77	23,34	3,39
<i>Azospirillum</i> sp. 80	19,51	4,54

*75 días

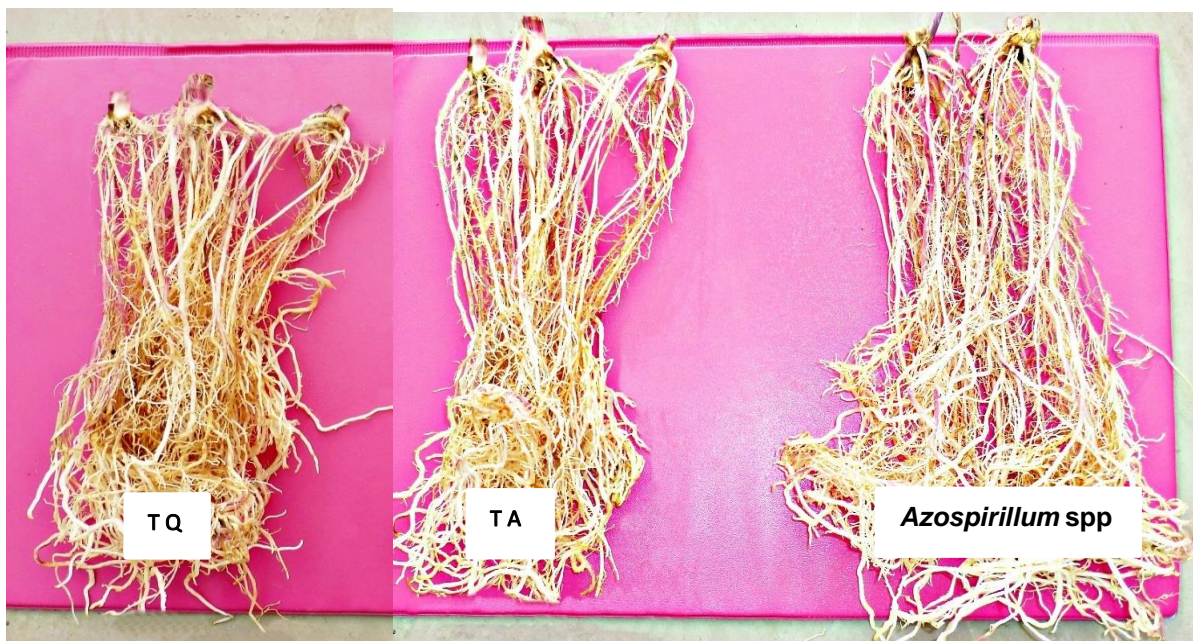
ANEXO 29

Índice de efectividad (IE) del peso seco de la biomasa* aérea y radicular de *Zea mays* L. “maíz” amarillo duro inoculado con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera, 2014

Tratamientos	IE (%)	Biomasa seca			
		Aérea		Radicular	
Testigo químico	19,49	abc	25,18	abcd	
<i>Azospirillum</i> sp. 10	38,86	a	10,79	abcd	
<i>Azospirillum</i> sp. 19	26,82	ab	0	ab	
<i>Azospirillum</i> sp. 44	27,00	ab	13,31	bcd	
<i>Azospirillum</i> sp. 52	26,22	abc	19,06	cd	
<i>Azospirillum</i> sp. 58	12,40	bc	0	a	
<i>Azospirillum</i> sp. 65	24,26	abc	34,53	de	
<i>Azospirillum</i> sp. 74	32,90	ab	18,71	cd	
<i>Azospirillum</i> sp. 76	18,12	abc	27,34	cde	
<i>Azospirillum</i> sp. 77	39,09	a	21,94	cde	
<i>Azospirillum</i> sp. 80	16,27	abc	63,31	e	

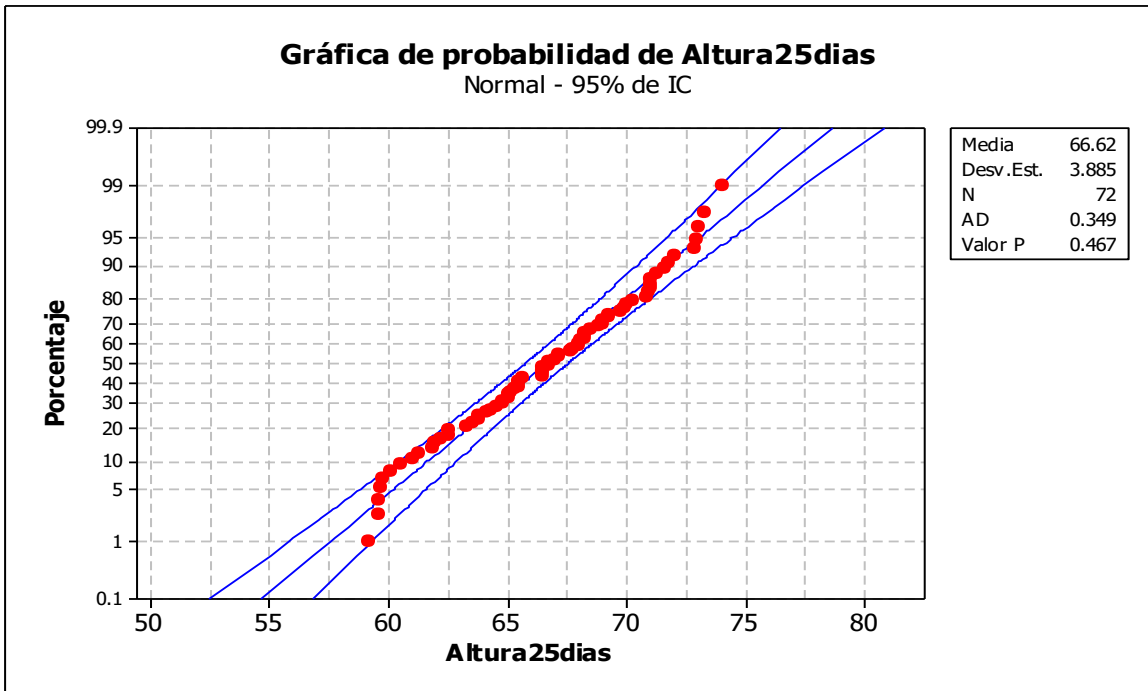
*75 días

ANEXO 30

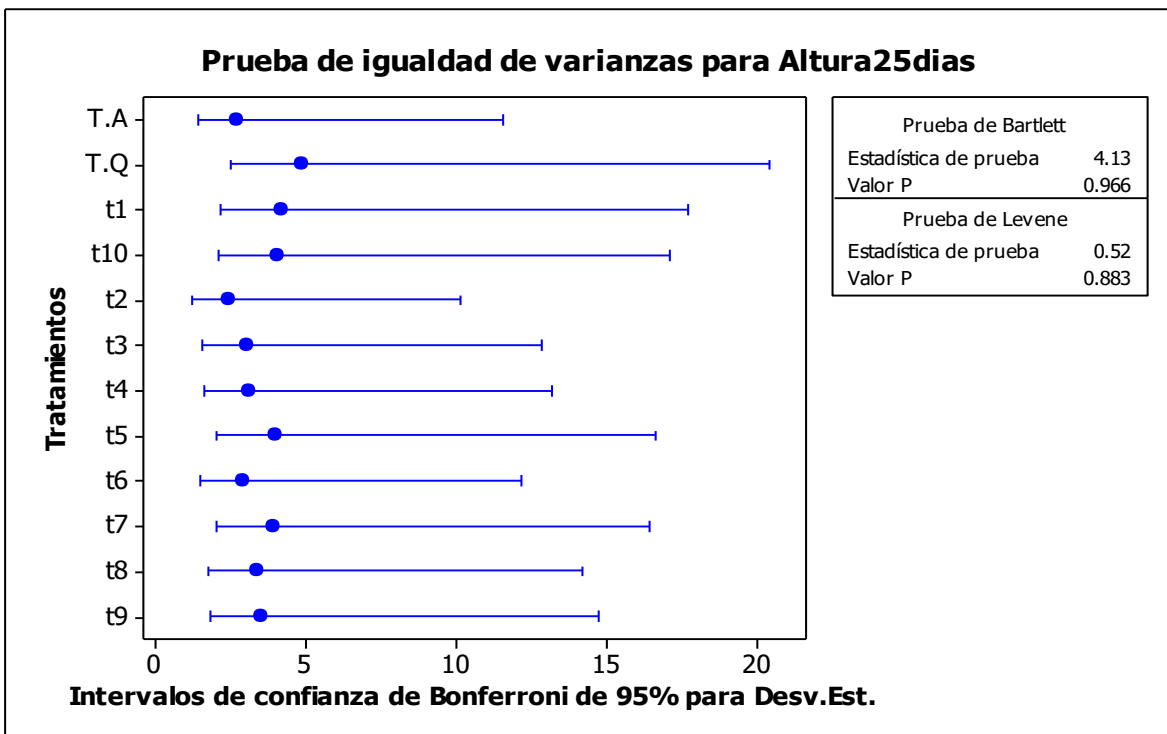


Raíces de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro, 75 días después de la inoculación del Testigo químico (TQ), Testigo absoluto (TA) y *Azospirillum* spp nativas en la rizósfera, 2014.

ANEXO 31



Prueba de normalidad para altura de *Zea mays* L. 25 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la altura de *Zea mays* L. 25 días después de la inoculación de *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.

ANEXO 32

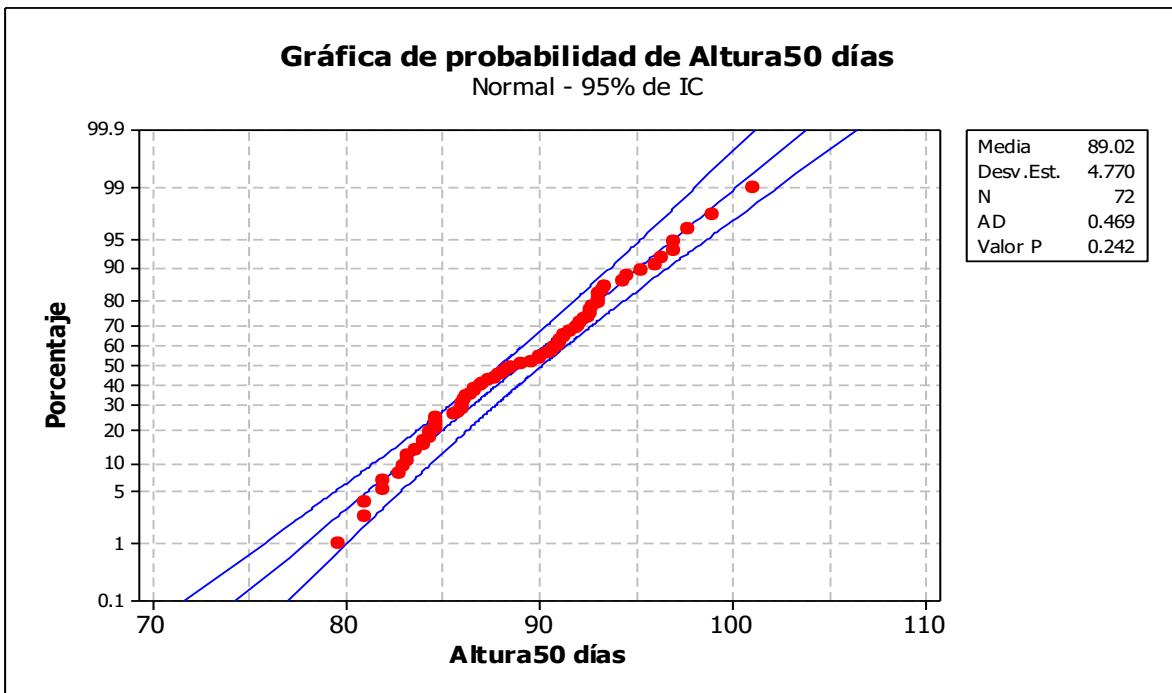
Análisis de varianza para altura de Zea mays L. 25 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en las rizósfera

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 \dots \mu A_{12}$$

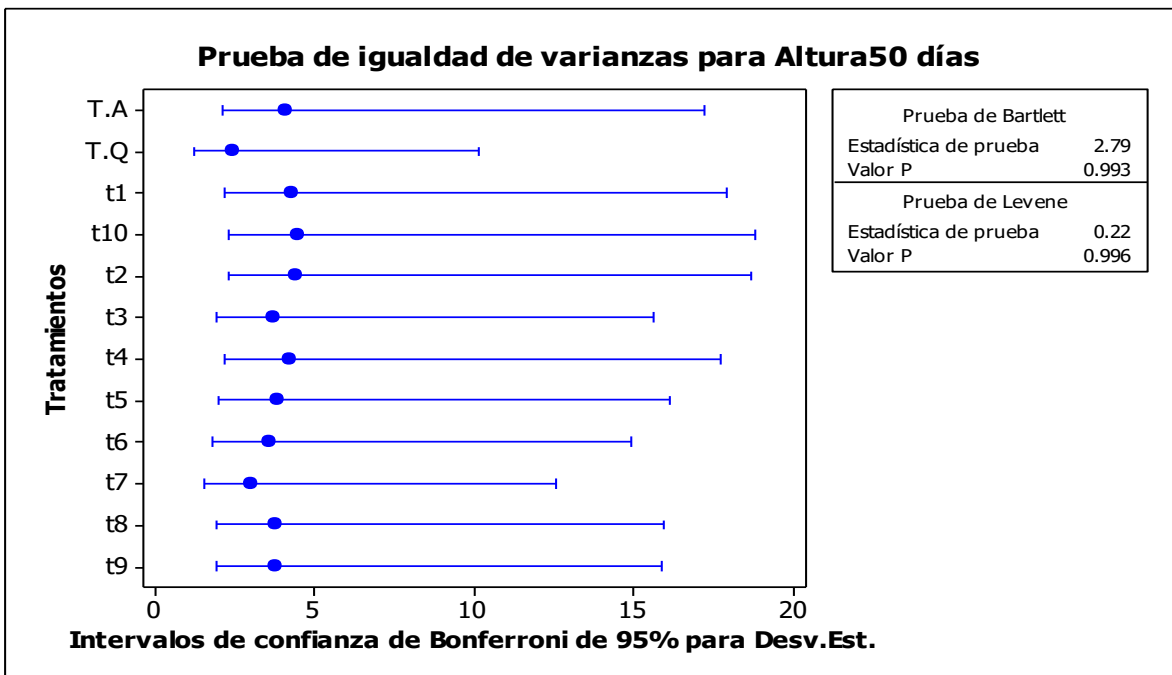
H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	11	297,76	27,07	2,10	<0,001	**	Rechaza H_0
Error	60	773,82	12,90				
Total	71	1071,58					

ANEXO 33



Prueba de normalidad para altura de Zea mays L. 50 días después de la inoculación Azospirillum spp. nativas en la rizósfera.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la altura de Zea mays L. 50 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en la rizósfera.

ANEXO 34

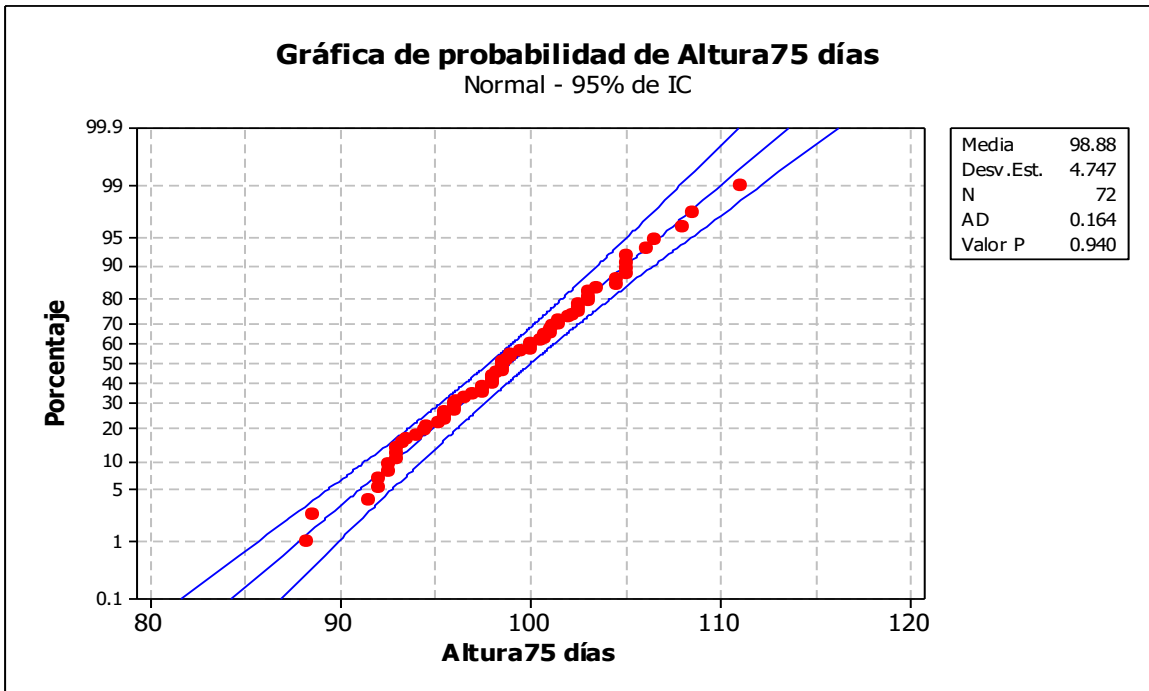
Análisis de varianza para altura de Zea mays L. 50 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en las rizósfera

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 \dots \mu A_{12}$$

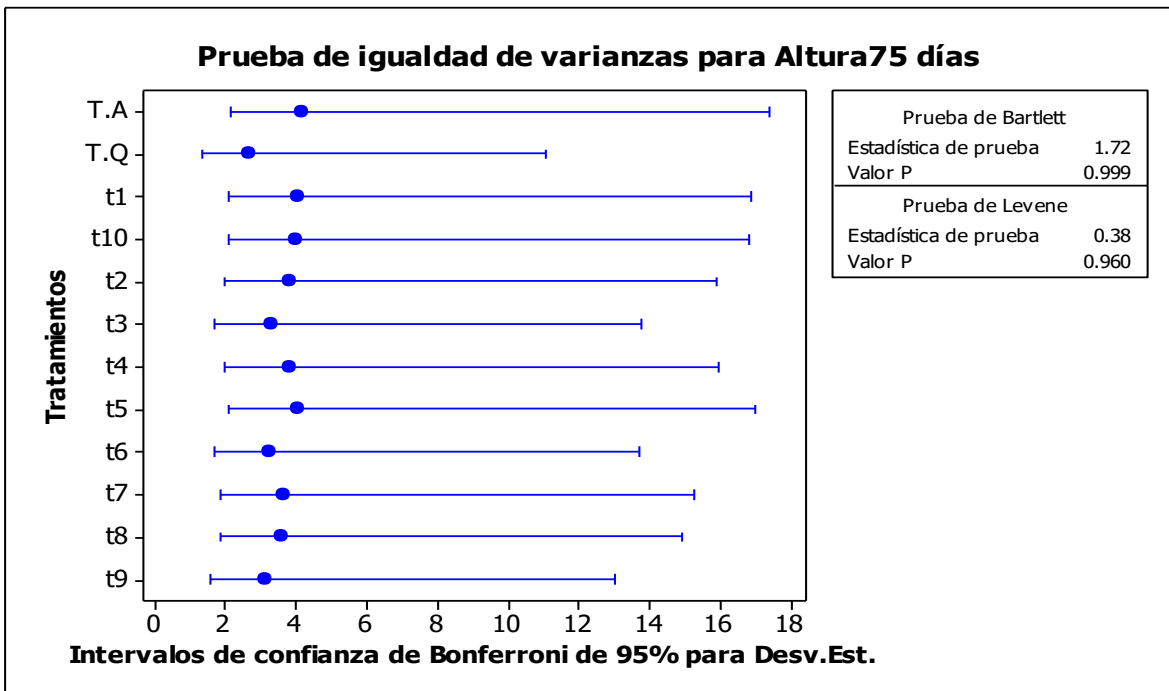
H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	11	721,94	65,63	4,41	<0,001	**	Rechaza H_0
Error	60	893,69	14,89				
Total	71	1615,63					

ANEXO 35



Prueba de normalidad para altura de Zea mays L. 75 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en la rizósfera.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la altura de Zea mays L. 75 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en la rizósfera.

ANEXO 36

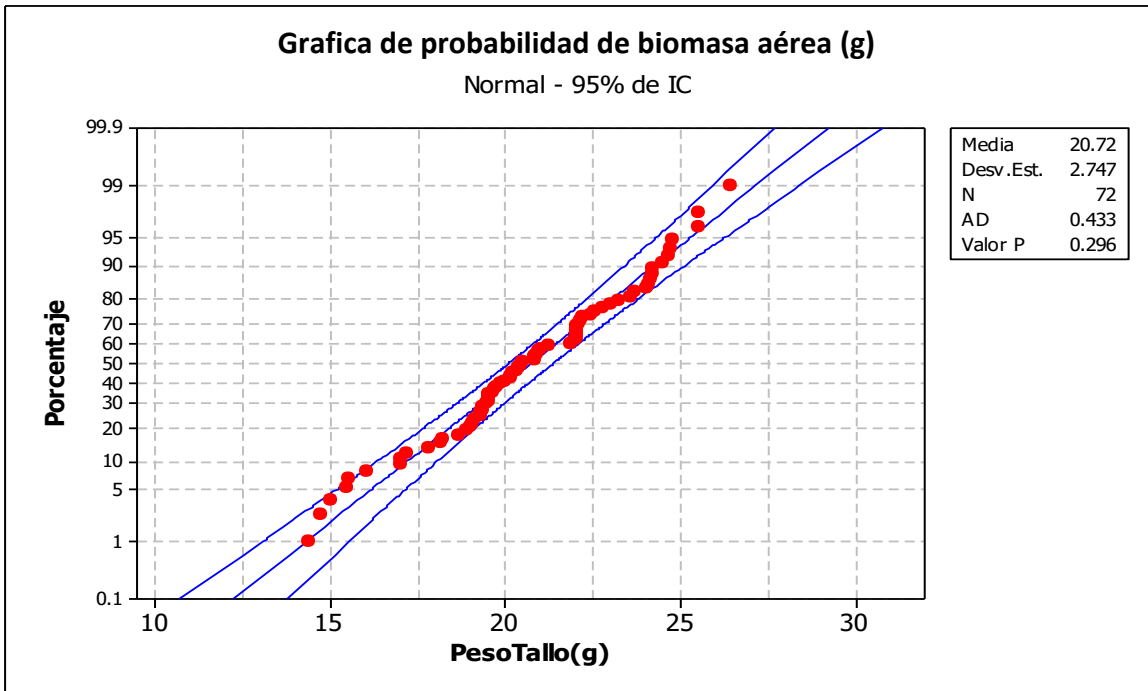
Análisis de varianza para altura de Zea mays L. 75 días después de la inoculación de Azospirillum spp. nativas en las rizósfera

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 \dots \mu A_{12}$$

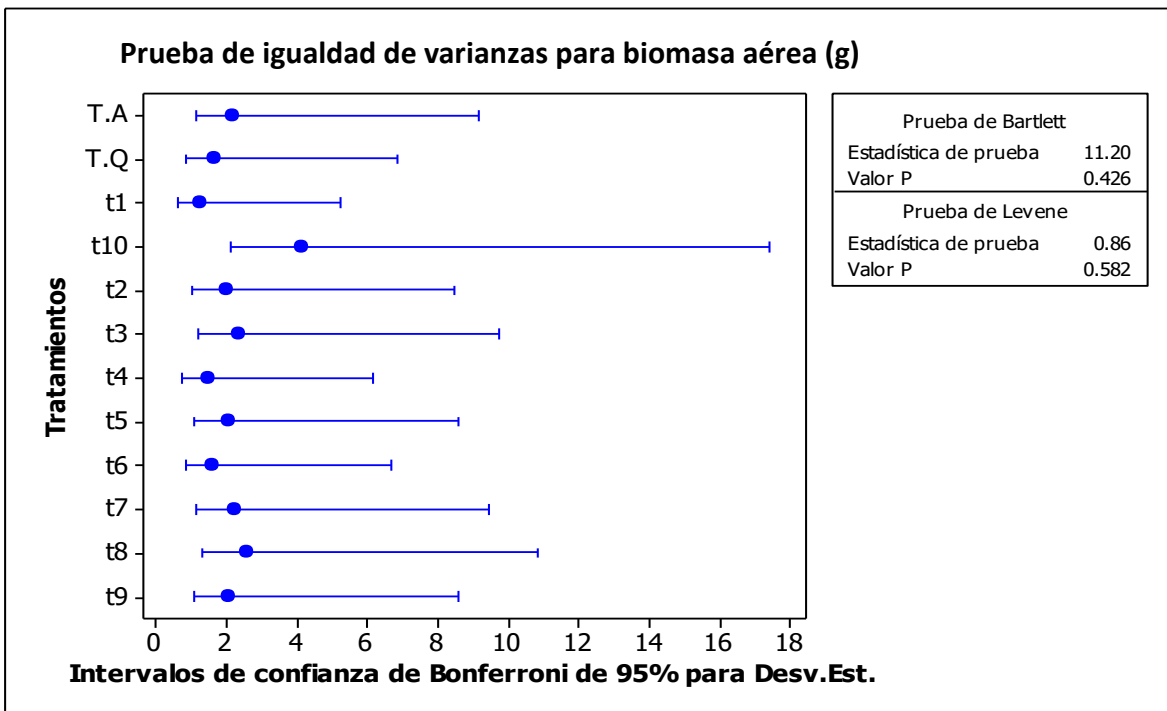
H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	11	801,42	72,86	5,48	<0,001	**	Rechaza H_0
Error	60	798,30	13,31				
Total	71	1599,72					

ANEXO 37



Prueba de normalidad para la biomasa seca aérea de *Zea mays* L. 75 días después de la inoculación con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.



Prueba de homogeneidad de varianzas para biomasa seca aérea de *Zea mays* L. 75 días después de la inoculación con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.

ANEXO 38

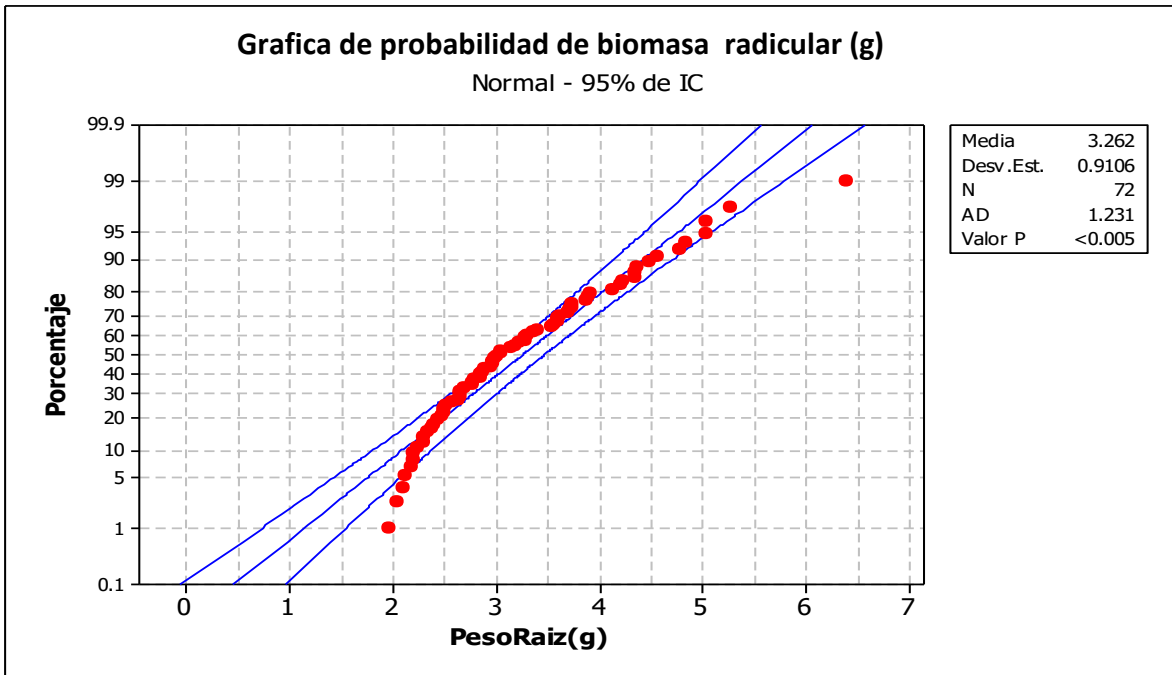
Análisis de varianza para biomasa seca aérea de *Zea mays* L. 75 días después de la inoculación con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2 = \mu A_3 \dots \mu A_{12}$$

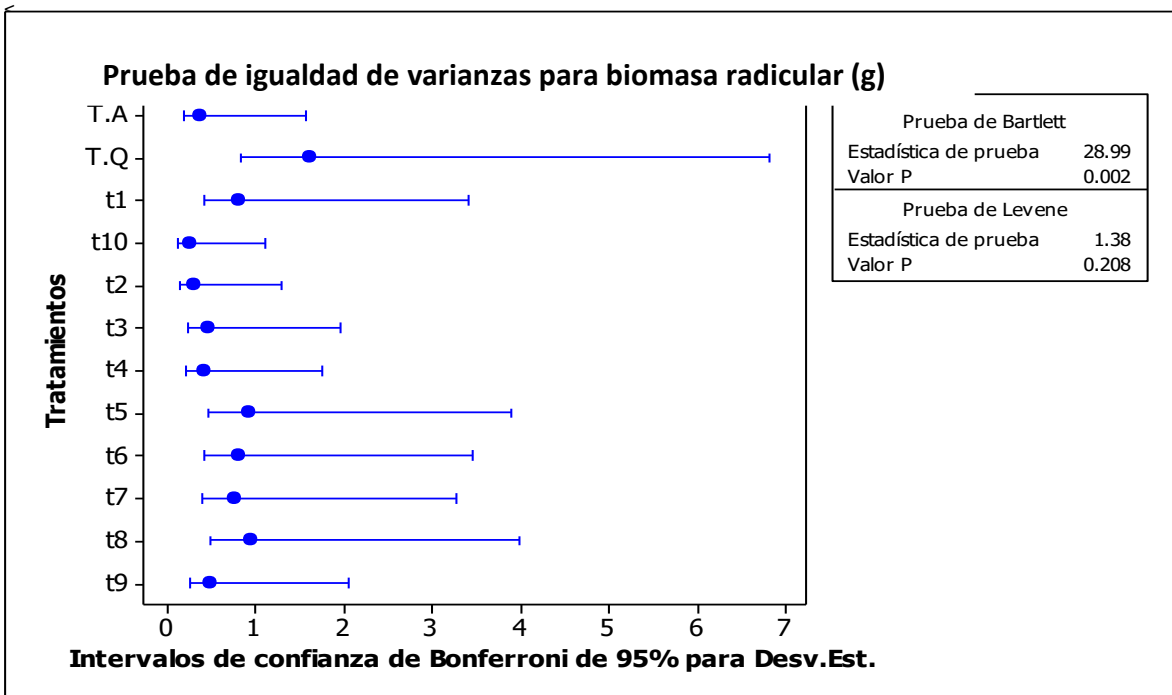
H_a = Al menos una media es diferente

Fuente de variación	GL	SC	CM	F_c	p	Sign.	Decisión
Tratamientos	11	231,80	21,07	4,16	<0,001	**	Rechaza H_0
Error	60	303,78	5,06				
Total	71	535,58					

ANEXO 39



Prueba de normalidad para la biomasa seca radicular de *Zea mays* L. 75 días después de la inoculación con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.



Prueba de homogeneidad de varianzas para la biomasa seca radicular de *Zea mays* L. 75 días después de la inoculación con *Azospirillum* spp. nativas en la rizósfera.