

# EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *SETARIA LACHNEA* (NEES) KUNTH<sup>1</sup>

TONIUTTI, M. A.<sup>2</sup> & FORNASERO, L. V.<sup>2</sup>

## RESUMEN

El género *Azospirillum sp.* coloniza la rizósfera de plantas forrajeras y cereales, y ejerce un efecto positivo a través de diferentes mecanismos, permitiendo mejorar el crecimiento y desarrollo de estas plantas. En este trabajo se evaluó el efecto de *Azospirillum brasilense* sobre la germinación, desarrollo y componentes de producción de *Setaria lachnea*. La inoculación, si bien retrasó la germinación de las semillas, provocó una mayor proliferación de pelos absorbentes de las raicillas de las plántulas. Las plantas inoculadas presentaron en el estadio de floración, un notorio incremento de la materia seca de raíces, hojas e inflorescencias, longitud radicular y área foliar, incrementándose además, el contenido de nitrógeno en hojas y raíces en un 25% y 85% respectivamente.

*Palabras claves:* *Azospirillum brasilense*, *Setaria lachnea*, inoculación, germinación, componentes de producción.

## SUMMARY

### **Inoculation effect of *Azospirillum brasilense* over the growth and development of *Setaria lachnea* (nees) kunth.**

*Azospirillum sp.* colonizes the rhizosphere of forages and cereals and it exercises a good effect through different mechanisms allowing to improve the growth and development of these plants. The effect of *Azospirillum brasilense* over germination, development and yield components of *Setaria lachnea* was studied. The inoculation, though it delayed the seed germination, caused a larger proliferation of absorbent hairs of seedling rootlets. In flowering, the inoculated plants showed an evident increase of dried matter of roots, leaves and panicles, lengthy roots and leaf area. There is also an increase of nitrogen content in leaves and roots by 25% and 85% respectively.

*Key words:* *Azospirillum brasilense*, *Setaria lachnea*, inoculation, germination, yield components.

---

1.- Proyecto CAI+D - UNL.

2.- Facultad de Ciencias Agrarias, UNL. Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Telefax: (03496) 426400. Email: matoniut@fca.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 29 de agosto de 2008 y aceptado para su publicación el 10 de noviembre de 2008.

## INTRODUCCIÓN

*Azospirillum* es uno de los géneros bacterianos PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) más importantes por su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento en gramíneas, sean éstas forrajeras (Boddey y Döbereiner, 1988; Sumner, 1990; Fages, 1994; James, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2001), o cerealeras (Okon, 1985; Okon y Labandera-González, 1994). Pueden encontrarse libres en el suelo o en asociación con las raíces de las plantas, ya sea en la superficie radicular o en el interior de la misma (Baldani, 1987). Esta simbiosis asociativa induce cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas huéspedes debido a la producción de hormonas de crecimiento, incrementando la absorción de agua y minerales (Dobbelaere *et al.*, 2001), lo cual, sumado a la contribución de nitrógeno a través de la fijación biológica o por la asimilación de amonio o nitratos (Burdman *et al.*, 2000), pueden promover el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Okon, 1985).

La inoculación con *Azospirillum* permite incrementar el rendimiento en cultivos de trigo (Baldani *et al.*, 1983; Barrios *et al.*, 1986; Boddey, *et al.*, 1986; Baldani *et al.*, 1987; Fornasero y Toniutti, 2003), maíz (Kapulnik *et al.*, 1982; Barrios *et al.*, 1984; Fulchieri y Frioni, 1994; Fornasero *et al.*, 2001), sorgo (Toniutti y Fornasero, 2003) y gramíneas forrajeras (Cohen *et al.*, 1980; Kapulnik *et al.*, 1981a, 1981c; Di Ciocco y Rodríguez-Cáceres, 1994).

Existen escasos antecedentes del efecto que produce *Azospirillum sp.* en distintas especies del género *Setaria*. Kapulnik *et al.* (1981b) y Fallik y Okon (1996), hallaron que la inoculación a base de *Azospirillum* incrementaba significativamente el rendimiento de *Setaria italica* (L.) P. Beauv.

(“moha de Hungría”), especie anual, originaria del Viejo Mundo y cultivada ampliamente como cereal y forrajera.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre la germinación, el desarrollo y los componentes de la producción de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth (“moha perenne”), promisorio forrajero nativo de amplia distribución en Argentina (Pensiero, 1993, 1995a, 1995b, 1999) y con posibilidades de introducción al cultivo (Pensiero *et al.*, 1995; Pensiero *et al.*, 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de *S. lachnea* utilizadas en el presente trabajo correspondieron a una población cultivada en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (31° 27' S, 60° 56' O), procedente de la localidad de Constituyentes, departamento La Capital de la provincia de Santa Fe. Ejemplares representativos de dicha población se conservan en el herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias (SF), bajo la colección de Pensiero 2784. Las semillas se obtuvieron a través de una cosecha masal de la población de plantas, las que se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

Los tratamientos fueron testigo (T) e inoculado con *A. brasilense* (I), realizándose evaluaciones en tres momentos fenológicos: a) germinación, b) estadio de cuatro hojas (V4) y c) estadio de floración (FL). El inoculante comercial contenía *A. brasilense* cepa Az 39 (INTA) en un soporte acuoso estéril, cuantificándose el número de azospirilos por mililitro de inoculante según el método del Número Más Probable de microorganismos (Albrecht y Okon, 1980).

El diseño experimental fue totalmente

aleatorizado y se realizaron diez repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los datos fueron analizados mediante la *t* de Student con un nivel de significancia de 0,05.

### **Evaluación de la germinación de *S. lachnea*:**

Las semillas colectadas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (0,5%) durante 5 minutos y luego fueron lavadas seis veces con agua destilada estéril, permaneciendo durante una hora en el agua del último lavado. Posteriormente, se sembraron cincuenta semillas de cada tratamiento en germinadores confeccionados en cajas de Petri estériles y se colocaron en estufa a una temperatura constante de 25°C. En el tratamiento inoculado, las semillas fueron tratadas con 1 ml de inoculante semi-líquido (base acuosa) por gramo de semilla. El análisis de la germinación se realizó efectuándose recuentos a los 3, 7, 10, 14, 21, 28 y 35 días, considerándose inicio de germinación cuando se observó la extrusión de la radícula con un largo mínimo de 2 milímetros.

### **Evaluación de desarrollo y componentes de producción de *Setaria lachnea*:**

En las parcelas de cultivo de *S. lachnea* del Campo Experimental se extrajeron muestras de suelo a una profundidad de 15 cm. Posteriormente, en el laboratorio se procedió a tamizar el suelo con malla de 2 mm y mezclarlo con arena estéril (relación 1:1) para el llenado de macetas plásticas de 2 litros de capacidad. El tipo de suelo empleado en la experiencia fue Argiudol típico y presentó las siguientes características químicas: 3,96% de materia orgánica (Walkley and Black, 1934), 0,195% de nitrógeno orgánico total (AOAC, 1990), 82,4ppm de fósforo disponible (Bray and Kurtz, 1945) y pH 6 (MAG, 1982). La cuantificación de *Azospirillum* sp.

del suelo fue  $2,5 \cdot 10^5$  bacterias  $g^{-1}$  suelo seco, según el método del Número Más Probable de microorganismos (NMP) (Albrecht y Okon, 1980).

En cada maceta se colocaron dos semillas pregerminadas de *S. lachnea*, a 1,5 cm de profundidad y en el tratamiento inoculado se aplicó 1 ml de inoculante. Las plantas permanecieron en cámara de crecimiento a temperatura constante de 28°C durante 60 días.

En los estadios fenológicos de cuatro hojas (V4) y floración (F1) se extrajeron las plantas con suelo rizosférico, evaluándose: a) materia seca aérea y radicular, en estufa a 65°C hasta peso constante, b) contenido de nitrógeno, por el método micro-Kjeldahl (AOAC, 1990) c) área foliar, utilizándose un medidor de área foliar LI-COR 3000, d) longitud de las raíces, por el método de intersección de líneas de Newman modificado por Marsh (Tennant, 1974), e) cuantificación de azospirilos en raíces, por el método del Número Más Probable de microorganismos (Albrecht y Okon, 1980).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La cuantificación de *A. brasilense* del inoculante fue  $3 \cdot 10^8$  bacterias por mililitro. Cohen *et al.* (1980) y Bhaskara Rao y Charyulu (2005) utilizaron una suspensión de  $1 \cdot 10^8$  unidades formadoras de colonias/mililitro para la inoculación de semillas de *S. italica*.

### **Efecto de *A. brasilense* en la germinación de *S. lachnea***

El poder germinativo de las semillas presentó valores de 14,8% y 14,6% para los tratamientos testigo e inoculado respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas. En el inoculado hubo un retraso en el número de semillas germinadas

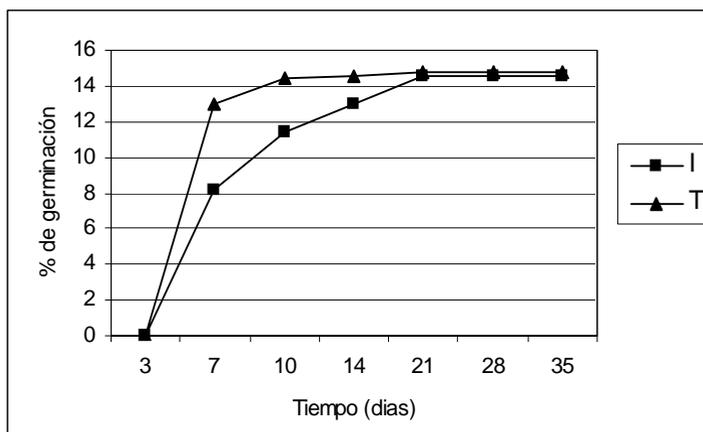


Fig. 1: Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre el % germinación de semillas de *Setaria lachnea*. I: semillas inoculadas T: semillas no inoculadas

desde el día 3 hasta el 14, observándose en las radículas de las plántulas una abundante proliferación de pelos radicales. A partir del día 21 el número de semillas germinadas fueron similares en ambos tratamientos (Fig. 1).

La baja germinación de las semillas de *S. lachnea* ha sido atribuida a la presencia de inhibidores en las envolturas de las cariopsis (semillas), que serían los responsables de la dormición de las mismas (Pensiero *et al.*, 1995; Schrauf *et al.*, 1998; Exner *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos muestran que la inoculación con *Azospirillum* no modifica dicho inconveniente.

### **Efecto de *A. brasilense* en el desarrollo y componentes de producción de *S. lachnea***

**Producción de materia seca y contenido de nitrógeno.** En el estadio de cuatro hojas las plantas del tratamiento testigo presentaron mayor peso seco de hojas y raíces que las inoculadas. En floración, el tratamiento inoculado mostró un peso seco de hojas, inflorescencias y raíces superior al control,

siendo las diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1). En este estadio, el incremento de la materia seca de hojas y raíces fue del 18% y 36% respectivamente en relación con el testigo.

Las plantas de *S. lachnea* inoculadas con *A. brasilense* obtuvieron un incremento de 17% en el peso seco de sus inflorescencias. Fallik y Okon (1996) mostraron que las plantas de *S. italica* inoculadas con *A. brasilense* aumentaron un 47% el peso seco de sus panojas.

En *S. italica*, el incremento del peso seco de plantas inoculadas con *A. brasilense* ha sido señalado por Cohen *et al.* (1980), Nur *et al.*, (1980), Okon *et al.* (1983), Di Ciocco y Rodríguez Cáceres (1994), mientras que Bhaskara Rao y Churyulu (2005) hallaron igual comportamiento utilizando diferentes cepas de *A. lipoferum*.

En el estadio de cuatro hojas, el contenido de nitrógeno aéreo y radicular de las plantas de *S. lachnea* testigo fueron significativamente superiores en relación a las plantas inoculadas (Fig. 2A). En floración, el contenido de nitrógeno en hojas, raíces e inflorescencias, se muestra en la fig. 2B, el porcentaje de nitrógeno de las plantas del

tratamiento inoculado superó al testigo en un 25%, 85% y 29% respectivamente.

En *S. italica* fueron reportados aumentos significativos que varían entre 25% a 200%, en el nivel de nitrógeno total de plantas inoculadas con distintas cepas de *A. brasilense*

(Nur *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1980; Kapulnik *et al.*, 1981b, 1981c). Para la misma especie, Bhaskara Rao y Churyulu (2005) observaron un incremento en el contenido de nitrógeno en tallos, raíces y granos de plantas inoculadas con diferentes cepas de *A. lipoferum*.

Cuadro 1: Materia seca promedio (Ms) y desvío estándar (DS) de hojas, raíces e inflorescencias de los tratamientos testigo (T) e inoculado (I) en los estadios de cuatro hojas (V4) y floración (FL) de *S. lachnea*.

Tratamientos	Estadio V4				Estadio FL					
	Ms hojas (mg)		Ms raíces (mg)		Ms hojas (mg)		Ms raíces (mg)		Ms inflorescencias (mg)	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
T	150,4 a	56,0	13,4 a	3,2	171,40 b	71,3	13,6 b	8,4	10,8 b	9,0
I	97,0 b	30,0	11,3 b	6,0	201,80 a	86,2	18,5 a	12,8	12,7 a	6,2

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (P<0,05)

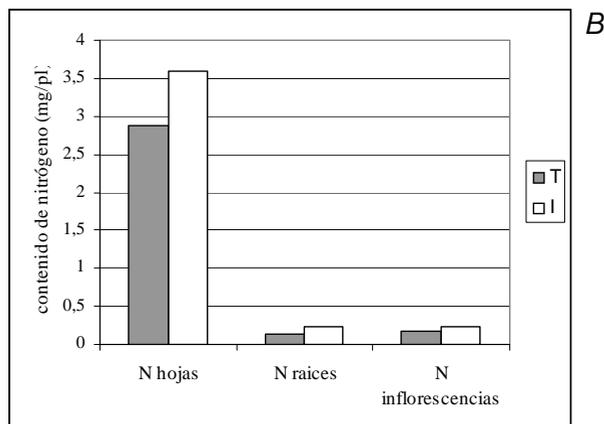
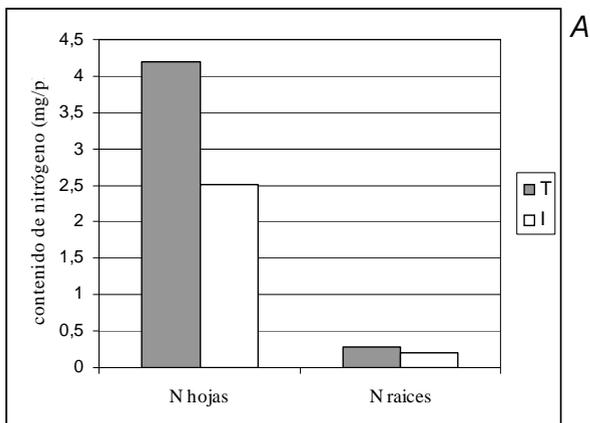


Fig. 2: Contenido de nitrógeno (mg/pl) en hojas, raíces e inflorescencias en los tratamientos testigo (T) e inoculado (I) en el estadio V4 (A) y estadio de Floración (B) de *Setaria lachnea*.

Cuadro 2: Valores promedio de Área foliar en  $\text{cm}^2/\text{pl}$  (AF) y longitud radicular en  $\text{cm}/\text{pl}$  (LR) de los tratamientos testigo (T) e inoculado (I) en los estadios de cuatro hojas (V4) y floración (FL) de *Setaria lachnea*.

	V4				FL			
	AF	DS	LR	DS	AF	DS	LR	DS
T	73,46 a	13,9	66,5 a	13,7	66,02 b	35,7	42,35 b	19,6
I	49,34 b	10,6	60,3 b	24,5	92,42 a	43,1	77,23 a	65,8

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ )

DS: desvío estándar.

Kapulnik *et al.* (1981b) mostraron que los porcentajes de nitrógeno de plantas de *S. italica* en el estadio de madurez fueron 1,15% y 1,05% en los tratamientos testigo e inoculado con *A. brasilense* respectivamente, mientras que en este trabajo los valores alcanzados fueron 1,68% y 1,78% para los mismos tratamientos en *S. lachnea*.

Las inflorescencias de las plantas inoculadas presentaron un contenido de nitrógeno de 0,23mg N/pl y las del tratamiento testigo 0,18mg N/pl. El porcentaje de nitrógeno del tratamiento inoculado fue 7% superior al control.

**Área foliar y longitud radicular.** El área foliar y la longitud radicular en el estadio de cuatro hojas fueron significativamente mayores en el tratamiento testigo que en el inoculado, mientras que en floración, la inoculación con *A. brasilense* incrementó 40% el área foliar y 82% la longitud radicular de las plantas de *S. lachnea* (Cuadro 2). Kapulnik *et al.* (1981b) hallaron que las plantas de *S. italica* inoculadas con *A. brasilense* incrementaron el tamaño y ramificaciones de sus raíces.

#### **Cuantificación radicular de azospirilos.**

En las raíces de las plantas testigo el recuento de azospirilos durante el desarrollo de *S. lachnea* fue  $1,30 \cdot 10^7$  azospirilos  $\text{g}^{-1}$  raíces

frescas en el estadio de cuatro hojas y  $5,20 \cdot 10^3$  azospirilos  $\text{g}^{-1}$  raíces frescas en floración. La cuantificación en raíces de plantas inoculadas fue  $1,35 \cdot 10^5$  azospirilos  $\text{g}^{-1}$  y  $3,0 \cdot 10^3$  azospirilos  $\text{g}^{-1}$  en los estadios fenológicos evaluados. Okon *et al.* (1983) hallaron una disminución en el recuento de azospirilos en raíces de *S. italica* inoculadas durante el período de crecimiento bajo condiciones de ambiente controladas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la inoculación de las semillas con *A. brasilense* no modifica su comportamiento germinativo.

La inoculación con *A. brasilense* permite incrementar la producción de materia seca de hojas, raíces e inflorescencias, el contenido de nitrógeno aéreo y radicular, el área foliar y la longitud radicular en el estadio reproductivo de *S. lachnea*.

## BIBLIOGRAFÍA

ALBRECHT, S. L. & OKON, Y. 1980. Cultures of *Azospirillum*. In Photosynthesis and Nitrogen Fixation. Methods of Enzymology

- (A. San Pietro, Ed.) 69: 740-749. Academic Press, New York.
- AOAC.** 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14<sup>th</sup> Ed. AOAC, Washington, D.C.
- BALDANI, V.; BALDANI, J. & DÖBEREINER, J.** 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 29: 924-929.
- BALDANI, V.; BALDANI, J. & DÖBEREINER, J.** 1987. Inoculation of field-growth wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum* sp. *Brasil. Biol. Fertil. Soils.* 4: 37-40.
- BARRIOS, S.; RODRÍGUEZ-CÁCERES, E. & DAMILANO, A.** 1984. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum spp.* III Congreso Nacional de Maíz, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- BARRIOS, S.; POTENZA, A. & LÓPEZ, M. V.** 1986. Utilización de *Azospirillum* (diazótrofo rizosférico) en *Triticum aestivum*. Primer Congreso Nacional de Asociación de Ingenieros Agrónomos de la Zona Norte de la provincia de Buenos Aires, Pergamino, Argentina.
- BHASKARARAO, K. V. & CHARYULU, P.B.N.** 2005. Evaluation of effect of *Azospirillum* on the yield of *Setaria italica*. *African Journal of Biotechnology.* 4 (9), 989-995.
- Boddey RM, Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (1986) Effect of inoculation of *Azospirillum spp.* on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil.* 95: 53-65.
- BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J.** 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. Kluwer Academic Publisher. *Plant and Soil* 108: 53-65.
- BRAY, R. H. & KURTZ, L. T.** 1945. En *S. italica* fueron reportados aumentos significativos que varían entre 25% a 200%, en el nivel de nitrógeno total de plantas inoculadas con distintas cepas de *A. brasilense* (Nur *et al.*, 1980; Cohen *et al.*, 1980; Kapulnik *et al.*, 1981b, 1981c). Para la misma especie, Bhaskara Rao y Churyulu (2005) observaron un incremento en el contenido de nitrógeno en tallos, raíces y granos de plantas inoculadas con diferentes cepas de *A. lipoferum*. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soils Sc.* 59: 39-45.
- BURDMAN, S.; OKON, Y. & JURKEVITCH, E.** 2000. Surface Characteristics of *Azospirillum brasilense* in Relation to Cell Aggregation and Attachment to Plant Roots. *Critical Reviews in Microbiology* 26 (2): pp.91-110.
- COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, Y.** 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen fixing *Azospirillum spp.* *Plant Physiol.* 66: 746-749.
- DI CIOCCO, C.A. & RODRIGUEZ-CACERES, E. A.** 1994. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum spp.* In Argentine humid pampas. *Field Crop Research* 37: 253-257.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERAGONZÁLES, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S. & OKON, Y.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871-879.
- EXNER, E.; PERALTA, P.; PENSIERO, J.F. & GUTIERREZ, H.F.** 2003. Producción de semillas en *Setaria lachnea*. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile, San Luis, X-2003. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38 (Supl.): 53.
- FAGES, J.** 1994. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In *Azospirillum-Plant Associations* (Okon Y, Ed.), pp. 87-110. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- FALLIK, E. & OKON, Y.** 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass

- production, survival and growth promotion of *Setaria itálica* and *Zea mays*. *Soil. Biol. Biochem.* 28: 123-126.
- FORNASERO, L.V. & TONIUTTI, M.A.** 2003. Inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de trigo y su efecto sobre su crecimiento y desarrollo vegetal. *Revista de Ciencia y Tecnología. Serie Científica. Número Especial Biología de Suelos. Universidad Nacional de Santiago del Estero.* 8: 17-22
- FORNASERO, L. V.; TONIUTTI, M. A.; GAMBAUDO, S.P. & MICHELOUD, H.A.** 2001. *Azospirillum* y *Azorhizobium*: su efecto sobre el rendimiento del cultivo de maíz. III Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos y III Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Universidad Nacional de Salta.
- FULCHIERI, M. & FRIONI, L.** 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.): Effects on yield in a field experiment in central Argentine. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- GLICK, B.R.** 1995. The Enhancement of Plant Growth by Free-living Bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 107-120.
- JAIN, D.K. & PATRIQUIN, D.G.** 1984. Root hair deformation bacterial attachment and plant growth in wheat - *Azospirillum* association. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1208-1213.
- JAMES, E.K.** 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, I.** 1981a. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and Panicum. *Plant and Soil*: 61:355-360.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, I.** 1981b. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria itálica* inoculated by *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiol.* 68: 340-343.
- KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y.; KIGEL, J. & HENIS, Y.** 1981c. Yield Increases in Summer Cereal Crops in Israeli Fields inoculated with *Azospirillum*. *Expl. Agric.* 17: 179-187.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; SARIG, S.; NUR, I. & HENIS, I.** 1982. The effect of *Azospirillum* on growth and yield of corn. *Isr. J. Bot.* 31: 247-255.
- MAG.** 1982. Toma de muestras y Determinaciones Analíticas en Suelos y Aguas. Santa Fe. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Extensión e Investigaciones Agropecuarias. Santa Fe. 152pp.
- NUR, O.; OKON, Y. & HENIS, Y.** 1980. An increase in nitrogen content of *Setaria itálica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.* 26: 482-485.
- OKON, Y.; HEYTLER, P.G. & HARDY, W.F.** 1983. N<sub>2</sub> Fixation by *Azospirillum brasilense* and Its Incorporation into Host *Setaria itálica*. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (3): 694-697.
- OKON, Y.** 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology.* pp. 223-228.
- OKON, Y. & LAVANDERA-GONZALEZ, C.A.** 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: and evaluation of 20 years world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1591-1601.
- PENSIERO, J.F.** 1993. Notas sobre género *Setaria* (Poaceae: Paniceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 29 (1-2): 53-66.
- PENSIERO, J.F.; Marino, G.D. & SCHRAUF, G.E.** 1995. Características reproductivas de *Setaria lachnea* (Nees) Kunth (Poaceae, Paniceae). *Revista de la Facultad de Agronomía- Universidad Nacional de Buenos Aires*- 15 (1): 59-66.
- PENSIERO, J. F.** 1995a. *Setaria* en Paniceae, parte a, Fascículo 12, parte 1, *Flora Fanerogámica Argentina* 19: 98-115.

- PENSIERO, J. F.** 1995 b. Sinopsis morfológica y taxonómica de las especies sudamericanas del género *Setaria* (Poaceae, Paniceae). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. 326 pp.
- PENSIERO, J. F.** 1999. Las especies sudamericanas del género *Setaria* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 37 (1-2): 37-151.
- PENSIERO, J.F.; GUTIERREZ, H.F. & EXNER, E.** 2005. Sistema de polinización y su efecto sobre la producción y el peso de semillas en nueve especies sudamericanas del género *Setaria*. *Interciencia* 30(8): 495-500. (ISSN 0378-1844, Venezuela [http://www.interciencia.org/v30\\_08/index.html](http://www.interciencia.org/v30_08/index.html))
- SCHRAUF, G. E.; MARTINO, A.; GIAVEDONI, J. & PENSIERO, J. F.** 1998. Efectos genéticos y ambientales sobre el comportamiento germinativo de poblaciones de *Moha perenne*. *Ecología Austral* 8: 49-56. (ISSN 1667-782x, Buenos Aires, <http://www.ecologiaaustral.com.ar>)
- SUMNER, M.E.** 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Sciences* 12, 53-123.
- TENNANT, D.** 1974. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Appl. Ecol.* 3: 995-1001
- TONIUTTI, M.A. & FORNASERO, L.V.** 2003. Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en el cultivo de sorgo” IV Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos y IV Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- WALKEY, A. & BLACK, I.A.** 1934. An examination of the dagthareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 27-38.

