

Azospirillum lipoferum AND NITROGEN FERTILIZATION EFFECT ON CHLOROPHYLL CONTENT, NUTRIENTS UPTAKE AND BIOMETRIC PROPERTIES OF *Zea mays* L.

EFFECTO DE *Azospirillum lipoferum* Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN EL CONTENIDO DE CLOROFILA, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES Y PROPIEDADES BIOMÉTRICAS DE *Zea mays* L.

Elnaz Davaran-Hagh¹, Bahram Mirshekari^{1*}, Mohammad Reza-Ardakani², Farhad Farahvash¹, Farhad Rejali³

¹Department of Agronomy and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. ²Department of Agronomy and Plant Breeding, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. ³Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran. (email: mirshekari@iaut.ac.ir).

ABSTRACT

Integrated nutrient management is a major agronomic practice which brings together all methods to support plants nutritional requirement. However, the interaction of these methods together is very complex and needs to be studied in different climatic conditions. So, the effect of nitrogen fertilizer and *Azospirillum lipoferum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) growth, yield and nutrients uptake was determined in this study. The hypothesis was that the bacterial inoculation decreases the need for N fertilizer application without reducing plant yield. Therefore, we carried out a factorial experiment in a randomized complete block design with three replications. Nitrogen at 0, 25, 50, 75 and 100 % concentrations of the recommended dose, *i.e.* 150 kg N ha⁻¹ (based on the soil sample analysis) were applied with or without *A. lipoferum* inoculation. There was a significant effect of N and *A. lipoferum* inoculation on most of the variables. In most cases, there was no significant difference between the two highest doses, *i.e.* 75 % and 100 % of N. Most variables showed their highest value in the interaction of *A. lipoferum* × 100 % N. But, the value of most variables was the same as in uninoculated × 100 % N or inoculated × 50 % N. *Azospirillum lipoferum* inoculation could be an alternative to high N fertilizer rates, increasing soil fertility and maize yield in sustainable farming. In conclusion, 75 % of the recommended N application rate along with *A. lipoferum* inoculation has the best effect on the variables increasing grain yield by 136.5 %.

RESUMEN

La gestión integrada de los nutrientes es una práctica agronómica importante que reúne todos los métodos para apoyar los requerimientos nutricionales de las plantas. Sin embargo, la interacción de estos métodos es muy compleja y debe estudiarse en condiciones climáticas diversas. Por tanto, el efecto de fertilizante nitrogenado y la inoculación de *Azospirillum lipoferum* en el crecimiento, rendimiento y absorción de nutrientes en maíz (*Zea mays* L.) fue evaluado en este estudio. La hipótesis fue que la inoculación bacteriana reduce la necesidad de aplicación de fertilizante N sin disminuir el rendimiento. Para ello realizamos un experimento factorial en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Concentraciones de N de 0, 25, 50, 75 y 100 % de la dosis recomendada, *es decir*, 150 kg N ha⁻¹ (basada en el análisis de muestras del suelo) fueron aplicadas con o sin inoculación de *A. lipoferum*. Hubo un efecto significativo del N y la inoculación de *A. lipoferum* en la mayoría de las variables. En la mayoría de los casos no hubo diferencia significativa entre las dos dosis más altas, 75 % y 100 % de N. La mayoría de las variables exhibieron sus valores mayores con la interacción de *A. lipoferum* × 100 % N. Pero, el valor de la mayoría de las variables fue el mismo que el no inoculado × 100 % N o inoculado × 50 % N. La inoculación con *A. lipoferum* podría ser una alternativa para los altos índices de fertilizante N, aumentando la fertilidad del suelo y el rendimiento de maíz en agricultura sostenible. La conclusión es que 75 % de la dosis recomendada de N junto con inoculación *A. lipoferum* tiene el mejor efecto en las variables y aumenta 136.5 % el rendimiento de grano.

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: October, 2014. Approved: June, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 889-897. 2015.

Palabras clave: Biofertilizante, hierro, nitrógeno, fósforo, zinc.

Keywords: Biofertilizer, iron, nitrogen, phosphorus, zinc.

INTRODUCTION

The excessive consumption of chemical fertilizers poses numerous adverse impacts on the environment and many life forms on earth. In contrast, biofertilizers are living microorganisms that colonize plant root and promote growth by increasing the supply or availability of nutrients to host plant (Lugtenberg *et al.*, 2002). The application of biofertilizers is a cost effective necessity to obtain a high quality yield and avoid environmental pollution. Sylvia *et al.* (2005) report that there are about two million organisms in each gram of soil. They suggest that maintaining and improving the activity of this resource is required for sustained soil and crop management. Soil biological physical and chemical properties, have an important effect on soil fertility (Barea *et al.*, 2005; Probst *et al.*, 2008).

Azospirillum, a free-living rhizobacterium, is a beneficial microorganism for plants (Aguirre-Medina *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2002). Zaied *et al.* (2007) state that the species *Azospirillum* provides a proper condition for maize (*Zea mays* L.) growth by producing phytohormones. The improvement of plant yield may result from the ability of bacteria to remove soil pathogens, produce plant growth regulators such as gibberellins, cytokines and auxin, increase plant access to nutrients, fix air N into the soil and facilitate the development of root system (Bashan *et al.*, 2004; Rudresha *et al.*, 2005; Bashan and de-Bashan, 2010). Zuberer (1987) report that maize inoculated with *Azospirillum* had higher dry weight than the uninoculated control, due to increased uptake of N, P, K, Mg, Mn and Zn. Ardakani and Mafakheri (2011) also point out that inoculating wheat seed with *Azospirillum* significantly affect plant growth factors. So, we carried out this experiment with the hypothesis that the bacterial inoculation reduces the need for chemical N fertilizer application without reducing plant yield. The aim was to determine the effect of inoculation with *A. lipoferum* on maize growth and yield and test replacement of chemical N fertilizer by this inoculation.

INTRODUCCIÓN

El consumo excesivo de fertilizantes químicos plantea numerosos efectos negativos al ambiente y muchas formas de vida en la tierra. En contraste, los biofertilizantes son microorganismos vivos que colonizan las raíces de las plantas y promueven el crecimiento de las plantas huésped mediante el aumento del suministro o la disponibilidad de nutrientes (Lugtenberg *et al.*, 2002). La aplicación de biofertilizantes es una necesidad económica para obtener rendimiento de alta calidad y evitar la contaminación ambiental. Sylvia *et al.* (2005) indican que hay unos dos millones de microorganismos por gramo de suelo. Ellos sugieren que es necesario mantener y mejorar la actividad de este recurso para el mantenimiento del suelo y el manejo de los cultivos. Las propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo tienen un efecto importante sobre la fertilidad del suelo (Barea *et al.*, 2005; Probst *et al.*, 2008).

Azospirillum, una rhizobacteria de vida libre, es un microorganismo beneficioso para las plantas (Ramos *et al.*, 2002; Aguirre-Medina *et al.*, 2013). Zaied *et al.* (2007) afirman que la especie *Azospirillum* propicia una condición adecuada para el crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) al producir fitohormonas. El mejor rendimiento en la planta puede resultar de la habilidad de las bacterias para eliminar los patógenos del suelo, producir reguladores del crecimiento para las plantas, como giberelinas, citoquinas y auxina, aumentar el acceso a los nutrientes vegetales, incorporar N del aire en el suelo y desarrollar el sistema radicular (Bashan *et al.*, 2004; Rudresha *et al.*, 2005; Bashan y de Bashan, 2010). Zuberer (1987) reporta que el maíz inoculado con *Azospirillum* tuvo peso seco mayor que el testigo no inoculado debido a la absorción mayor de N, P, K, Mg, Mn y Zn. Según Ardakani y Mafakheri (2011), la inoculación de semillas de trigo con *Azospirillum* afecta significativamente los factores del crecimiento de plantas. Por tanto, la hipótesis de este estudio fue que la inoculación bacteriana reduce la necesidad de aplicar fertilizante químico N sin reducir el rendimiento de las plantas. El objetivo fue determinar el efecto de la inoculación con *A. lipoferum* en el crecimiento y rendimiento de maíz y evaluar la sustitución de los fertilizantes químicos N con esta inoculación.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in 2011 at the Research Station of the Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Tabriz branch, Iran (46° 17' E, 38° 5' N). The experimental design was a randomized complete block with a factorial arrangement and three replications. Treatments of the experiment were N application rates: N₀, control, N₁ 25 %, N₂ 50 %, N₃ 75 %, N₄ 100 % of the recommended dose, 150 kg N ha⁻¹; and B₀, without inoculation and B₁, with inoculation of *A. lipoferum*. Treated seeds were inoculated with peat based inoculants of *A. lipoferum*, at 2×10⁸ cell concentration g⁻¹ of the carrier. Inoculated seeds were planted directly in the soil. Nitrogen fertilizer was top dressed at two stages of emergence and stamen appearance.

Maize seeds var. pop corn K.S.C. 600 were planted in order to obtain 66000 plants ha⁻¹. Irrigation was conducted based on a 70 mm evaporation from evaporation pan. Prior to harvest, chlorophyll content was measured using a chlorophyll meter model Opti-Science (CCM-200). Then, 10 plants were harvested from the middle rows of each plot and grain yield was measured. To measure the absorption of nutrients, five other plants were harvested from each plot when grains were at dough stage and dried at 70 °C oven for 72 h. Then, samples were ground and analyzed. Nitrogen and protein were measured by Kjeldahl method and P was measured by spectrophotometry. Fe and Zn were measured by atomic absorption. Data were tested for normal distribution and subjected to statistical analysis using SAS. Duncan's multiple range test was used to compare means (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Increasing N application rate from 0 % to 100 % of the recommended dose enhanced the value of variables except for the grain yield, 1000 seed weight and the number of seeds in ear. Their values were higher in 75 % rather than in 100 %, although the difference was not significant (Table 1 and 2).

Nitrogen is the main yield limiting nutrient because of its various roles in plants tissues. It is a structural component of amino acids, nucleic acids, enzymes and proteins, chlorophyll and cell wall (Fageria and Baligar, 2005; Wiedenhoeft, 2006; Fageria, 2009; Eftekhari *et al.*, 2012). In an experiment on wheat, application of chemical N fertilizer significantly affected plant height, grain yield and biomass (Ardakani and Mafakheri, 2011). Njuguna *et al.* (2010) report the highest wheat

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se desarrolló en 2011, en la Estación de Investigación de la Facultad de Agricultura, Universidad Islámica Azad, Tabriz, Irán (46° 17' E y 38° 5' N). El diseño experimental fue de bloques al azar con un arreglo factorial y tres repeticiones. Los tratamientos fueron aplicación de N: N₀ testigo, N₁ 25 %, N₂ 50 %, N₃ 75 %, N₄ 100 % de la dosis recomendada, 150 kg de N ha⁻¹; y B₀, sin inoculación y B₁, inoculación de *A. lipoferum*. Las semillas tratadas fueron inoculadas con inoculantes a base de turba de *A. lipoferum*, en concentración 2×10⁸ células g⁻¹ del transportador. Las semillas inoculadas fueron sembradas directamente en el suelo. El fertilizante nitrogenado fue aplicado en dos etapas de emergencia y exposición de los estambres.

Semillas de maíz var. palomitas de maíz K. S. C. 600 se plantaron para obtener 66 000 plantas ha⁻¹. El riego se realizó con base en 70 mm de evaporación del tanque evaporimétrico. Antes de la cosecha, la clorofila se evaluó con un medidor de clorofila modelo Opti-Science (CCM-200). Luego, 10 plantas fueron recolectadas en las filas intermedias de cada parcela y el rendimiento de grano fue cuantificado. Para medir la absorción de nutrientes, cinco plantas fueron cosechadas de cada parcela cuando los granos estaban en estado dentado y secados 72 h en un horno a 70 °C. Luego, las muestras fueron trituradas y analizadas. El contenido de N y proteína se midieron por el método de Kjeldahl, el P por espectrofotometría, el Fe y el Zn, por absorción atómica. La distribución normal de los datos fue evaluada para realizar los análisis estadísticos con SAS. La prueba de rango múltiple de Duncan se usó para comparar las medias (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aumento de N aplicado de 0 % a 100 % de la dosis recomendada elevó el valor de las variables, excepto el rendimiento de grano, el peso de 1000 semillas y el número de semillas por mazorca. Su valor fue 75 % mayor en lugar de 100 %, pero la diferencia no fue significativa (Cuadro 1 y 2).

El N es el nutriente principal que limita el rendimiento debido a sus funciones diversas en los tejidos vegetales. El N es un componente estructural de los aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, proteínas, clorofila y paredes celulares (Fageria y Baligar, 2005; Wiedenhoeft, 2006; Fageria, 2009; Eftekhari *et al.*, 2012). En un experimento con trigo, la aplicación de fertilizante químico nitrogenado afectó significativamente la altura de la planta,

Table 1. Analysis of variance of the effect of treatments on the traits measured.
Cuadro 1. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos en las variables medidas.

SOV	df	Mean squares (MS)									
		Grain yield	1000 seeds weight	Biological yield	Number of seeds in ear	Chlorophyll	N	P	Fe	Zn	Protein
Rep	2	28232.7	124.37	5939549.0	725.29	3.012	0.023	0.0003	21.028	2.275	0.409
N †	4	** †	**	**	**	**	**	**	**	**	**
B	1	**	**	**	**	*	**	**	*	**	**
N×B	4	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Error	18	360660.04	92.83	927077.5	1148.92	22.843	0.0038	.00042	15.002	2.279	0.0358
CV (%)	-	9.47	5.57	5.45	5.11	8.53	6.66	8.03	8.00	4.26	7.99

†ns, nonsignificant; * p≤0.05; ** p≤0.01. †N, nitrogen; B, *Azospirillum lipoferum* †ns, no significativos; * p≤0.05; ** p≤0.01. †N, nitrógeno; B, *Azospirillum lipoferum*.

Table 2. Mean comparisons of the measured traits.
Cuadro 2. Comparación de medias de las características medidas.

Treatments	Grain yield (kg ha ⁻¹)	1000 seeds weight (g)	Biological yield (kg ha ⁻¹)	Number of seeds in ear	Chlorophyll	Protein (%)
B ₀ †	5779.2b	165.1b	17191.9b	624.02b	53.8b	7.8b
B ₁	6899.3a	180.5a	18090.2a	702.1a	58.1a	8.6a
N ₀ †	4006.8d	141.8d	13945.0d	502.1d	35.9d	6.57d
N ₂₅	5086.4c	161.8c	15838.8c	612.08c	49.9c	7.37c
N ₅₀	6584.3b	174.1b	17824.0b	684.3b	60.5b	8.32b
N ₇₅	8252.9a	194.4a	19794.5a	769.2a	65.1ab	9.40a
N ₁₀₀	7752.9a	191.8a	20803.0a	747.6a	68.5a	9.54a
B ₀ ×N ₀	3947.2e	131.7g	13696g	444.1f	31.8f	6.23d
B ₀ ×N ₂₅	4191.3e	156.7ef	15267.3fg	573.7e	47.0de	7.07cd
B ₀ ×N ₅₀	6108.9cd	171.7cde	17241.3de	672.1cd	58.6bc	7.81bc
B ₀ ×N ₇₅	7170.5bc	180.3cd	19417.0bc	701.8cd	63.4ab	9.01a
B ₀ ×N ₁₀₀	7478.1b	185.1bc	20338.0ab	728.1bc	68.5a	9.16a
B ₁ ×N ₀	4066.3e	151.9f	14194g	560.1e	40.0ef	6.91cd
B ₁ ×N ₂₅	5981.5d	166.9def	16410.3ef	650.4d	52.8cd	7.68bc
B ₁ ×N ₅₀	7059.7bcd	176.8cd	18406.7cd	696.4cd	62.4ab	8.83ab
B ₁ ×N ₇₅	9335.3a	208.6a	20172ab	836.6a	66.8ab	9.78a
B ₁ ×N ₁₀₀	8053.6b	198.6ab	21268.0a	767.1b	68.5a	9.91a

Means in a column with a different letter are statistically different (p≤0.05). †B₀, without inoculation; B₁, inoculated with *Azospirillum lipoferum*. †N₀, control; N₂₅, 25 %; N₅₀, 50 %; N₇₅, 75 %; N₁₀₀, 100 % of the recommended dose 150 kg N ha⁻¹ † Medias en una columna con una letra diferente son estadísticamente diferentes (p≤0.05). †B₀, sin inoculación; B₁, inoculado con *Azospirillum lipoferum*. †N₀, testigo, N₂₅, 25 %; N₅₀, 50 %; N₇₅, 75 %; N₁₀₀, 100 % de la dosis recomendada, que fue 150 kg de N ha⁻¹.

grain yield, 1176.7 kg ha⁻¹, against the lowest yield, 1022.9 kg ha⁻¹ in the control, when 46 kg N ha⁻¹ was applied; wheat root system development was also significantly improved by N fertilizer. Biesiada and Kuś (2010) report the highest basil (*Ocimum basilicum* L.) yield upon applying 150-250 kg N ha⁻¹; increasing N application from 50 to 150 kg

el rendimiento de grano y la biomasa (Ardakani y Mafakheri, 2011). Njuguna *et al.* (2010) reportan rendimiento mayor de grano de trigo, 1176.7 kg ha⁻¹, comparado con el de 1022.9 kg ha⁻¹ en el testigo, al aplicar 46 kg de N ha⁻¹; el desarrollo del sistema radicular del trigo también se mejoró significativamente con el fertilizante N. Biesiada

ha⁻¹ raised yield by 63.90 %, whereas increasing N dose to 250 kg ha⁻¹ enhanced yield by 11.46 %. Results of our experiment also showed the improving effect of N application on maize growth variables (Table 2; Figure 1).

Azospirillum inoculation significantly affected the variables (Table 1). The inoculation increased grain yield by 19.38 %, biological yield by 5.23 %, chlorophyll content by 7.99 % and protein content by 10.25 %, compared with the uninoculated control (Table 2). The inoculation also increased N, P, Fe and Zn content by 11.87, 16.66, 7.39 and 5.95 %, respectively, compared with the control (Figure 2). The interaction of N×*Azospirillum* showed a significant effect only on the grain yield and the number of seeds in ear. Zaady *et al.* (1993) report 10 to 30 % of improvement in grain yield and biomass of maize and sorghum due to *Azospirillum* inoculation. Ribaudó *et al.* (2006) show that shoot and root fresh weights of inoculated tomatoes were 4 % and 30 % higher than the control plants, respectively; also, 20 % of improvement in shoot height was observed. Besides, *Azospirillum brasilense* inoculation increased growth variables of maize (El-Kholy *et al.*, 2005).

One of the most important functions of *Azospirillum* is to fix atmospheric N to soil and making it available to plants (Bashan and de-Bashan, 2010). Our results indicate that grain yield was not statistically different in uninoculated treatment×100 % N and inoculated treatment×50 % N. This means that *A. lipoferum* inoculation may be used as a substitute for high nitrogen fertilizer rates without

y Kuś (2010) reportan el rendimiento mayor de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) al aplicar 150-250 kg N ha⁻¹; al aumentar la dosis de N de 50 a 150 kg ha⁻¹ el rendimiento aumentó 63.90 %, pero con un aumento a 250 kg N ha⁻¹ el rendimiento aumentó sólo 11.46 %. Los resultados de nuestro estudio también mostraron los efectos positivos de la aplicación de N en las variables de crecimiento del maíz (Cuadro 2; Figura 1).

La inoculación con *Azospirillum* afectó significativamente las variables (Cuadro 1). La inoculación aumentó 19.38 % el rendimiento de grano, 5.23 % el rendimiento biológico, 7.99 % el contenido de clorofila y 10.25 % el contenido proteínico, comparado con el testigo sin inocular (Cuadro 2). La inoculación también aumentó el contenido N, P, Fe y Zn en 11.87, 16.66, 7.39 y 5.95 %, respectivamente, comparado con el testigo (Figura 2). La interacción N×*Azospirillum* mostró efecto significativo sólo en el rendimiento de grano y el número de semillas de la mazorca. Zaady *et al.* (1993) documentan el aumento de 10 a 30 % en el rendimiento de grano y biomasa de maíz y sorgo, debido a la inoculación de *Azospirillum*. Ribaudó *et al.* (2006) muestran que el peso fresco de los brotes y la raíz de tomates inoculados fue 4 % y 30 % superior al de las plantas testigo; también se observó aumento de 20 % de la altura del brote. Además, la inoculación con *Azospirillum brasilense* aumentó las variables del crecimiento del maíz (El-Kholy *et al.*, 2005).

Una de las funciones más importantes de *Azospirillum* es fijar N atmosférico al suelo, y lo hace disponible para las plantas (Bashan y de-

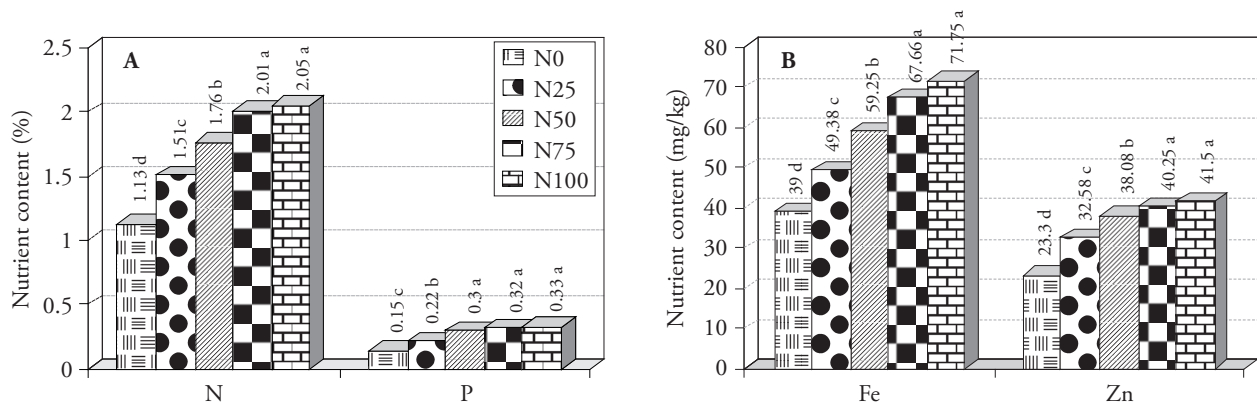


Figure 1. The effect of N rates (N₀, control; N₂₅, 25 %; N₅₀, 50 %; N₇₅, 75 %; N₁₀₀, 100 % of 150 kg N ha⁻¹) on N and P (A) and Fe and Zn (B) content.

Figura 1. Efecto de dosis de N (N₀, control; N₂₅, 25 %; N₅₀, 50 %; N₇₅, 75 %; N₁₀₀, 100 % de 150 kg N ha⁻¹) en contenido de N y P (A) y Fe y Zn (B).

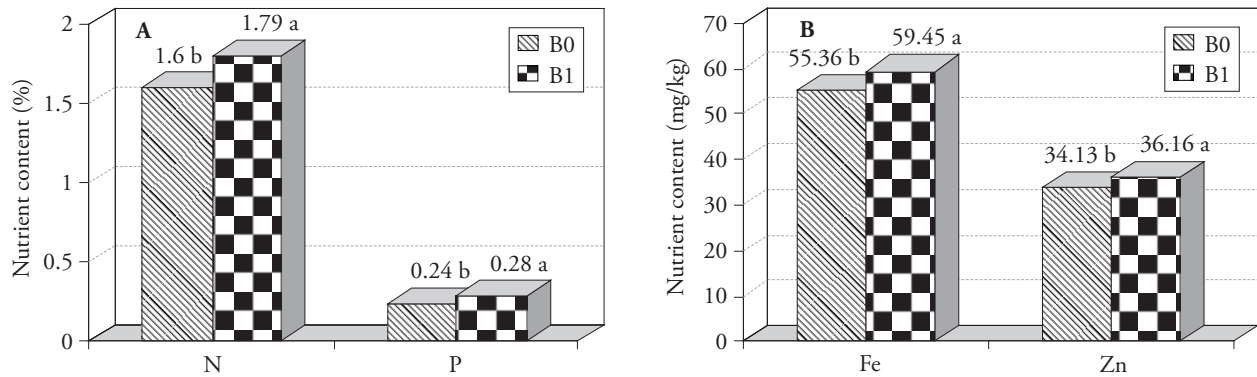


Figure 2. The effect of *Azospirillum* inoculation (B₀, uninoculated; B₁, inoculated) on N and P (A) and Fe and Zn (B) content.
Figura 2. Efecto de inoculación de *Azospirillum* (B₀, sin inocular; B₁, inoculados) en el contenido N y P (A) y Fe y Zn (B).

reducing yield and shows the ability of the bacterium to fix atmospheric N. In an experiment with wheat, there were no significant differences in grain yield with 150 kg N ha⁻¹ without *Azospirillum* inoculation and 50 kg N ha⁻¹+*Azospirillum* inoculation (Ardakani and Mafakheri, 2011). The combined application of *Azospirillum*+60 kg N ha⁻¹ caused a similar maize yield compared to the application of the recommended dose of 120 kg N ha⁻¹ without inoculation (Yadav *et al.*, 2011).

Biological N fixation is the primary mechanism by which *Azospirillum* bacteria increase plant growth and yield; besides the efficiency of water and nutrients absorption is improved by facilitating the development of root system and making higher soil volume available to plant root (Bashan and Holguin, 1997; Reis *et al.*, 2000; Dalla Santa *et al.*, 2004; Mehran *et al.*, 2011). Ribaudo *et al.* (2006) show significant improvement in root fresh weight, main root hair length and root surface as the result of inoculating tomato plants with *A. brasilense*; the inoculation increased root fresh weight by 30 % over the control. Inoculation of plants with *Azospirillum* increased root length, root dry weight and shoot dry weight; these improvements are related to the presence of a well developed root system which facilitates water and nutrients absorption (Sprent and Sprent, 1990). According to Hasanabadi *et al.* (2010), inoculating barley plants with *A. lipoferum* significantly increase root growth parameters such as root dry weight and root length. Ardakani and Mafakheri (2011) also show that wheat inoculation with *Azospirillum* significantly increased root dry weight by 9 %, compared with the control.

Bashan, 2010). Nuestros resultados indican que el rendimiento de grano no fue estadísticamente diferente entre el tratamiento sin inocular×100 % de N y el inoculado×50 % N. Esto indica que la inoculación con *A. lipoferum* puede usarse como un sustituto de las dosis altas de fertilizante nitrogenado sin reducir el rendimiento y muestra la capacidad de la bacteria para fijar N atmosférico. En un estudio con trigo no hubo diferencias significativas en rendimiento de grano con 150 kg N ha⁻¹ sin inocular *Azospirillum* y 50 kg N ha⁻¹ más la inoculación de *Azospirillum* (Ardakani y Mafakheri, 2011). La aplicación combinada de *Azospirillum* más 60 kg N ha⁻¹ produjo un rendimiento similar de maíz comparado con la aplicación de la dosis recomendada de 120 kg N ha⁻¹ sin inoculación (Yadav *et al.*, 2011).

La fijación biológica de N es el principal mecanismo por el cual las bacterias *Azospirillum* aumentan el desarrollo y el rendimiento de las plantas, pero también mejora la eficiencia en la absorción del agua y los nutrientes facilitando el desarrollo de sistema de raíces e incrementando el volumen de suelo disponible para las raíces de las plantas (Bashan y Holguín, 1997; Reis *et al.*, 2000; Dalla Santa *et al.*, 2004; Mehran *et al.*, 2011). Ribaudo *et al.* (2006) muestran un incremento significativo en el peso fresco de la raíz, la longitud del pelo de la raíz principal y la superficie de la raíz debido a la inoculación de las plantas de tomate con *A. brasilense*; el peso fresco de la raíz aumentó 30 % comparado con el testigo. La inoculación de las plantas con *Azospirillum* aumentó la longitud de la raíz, el peso seco de la raíz y del vástago, lo cual está relacionado

Inoculation with *Azospirillum* changes root growth or morphology, resulting in better water and nutrient uptake, and consequently plant growth and yield (Lin *et al.*, 1983; Bottini *et al.*, 2004; Ribauda *et al.*, 2006). The result of our study showed that inoculation with *Azospirillum* increased N, P, Fe and Zn contents by 11.87 %, 16.66 %, 7.39 % and 5.95 %, as compared to the uninoculated control. This enhancement of the content of mineral nutrients may be due to increased nutrient absorption as the result of a more developed root system. Ardakani *et al.* (2011) report that inoculating wheat seeds with *Azospirillum* enhanced plant NPK content by 21 %, 17 % and 25 %. The inoculation with *Azospirillum* increased root growth and consequently nutrients and water uptake, which resulted in higher yield (Lin *et al.*, 1983). According to Eid *et al.* (2006), inoculating *Celosia argenta* with *Azospirillum* increased N and P content in leaves.

Another mechanism by which *Azospirillum* inoculation improves plant growth is the production of plant growth promoting substances, polyamines and amino acids (Thuler *et al.*, 2003; Tsavkelova *et al.*, 2006). These phytohormones promote plant root growth, consequently increasing nutrients and water absorption (Reis *et al.*, 2000; Steenhoudt and Vanderleyden, 2000; Dalla Santa *et al.*, 2004; Chamangasht *et al.*, 2012; Zakikhani *et al.*, 2012). According to Ribauda *et al.* (2006), *Azospirillum* inoculation increased indole-3-acetic acid (IAA) content in tomato shoots and roots by 7 and 19 fold; besides ethylene content was also increased.

CONCLUSION

Chemical nitrogen fertilizer and *Azospirillum lipoferum* inoculation significantly affected maize yield and nutrient uptake. *Azospirillum lipoferum* inoculation plus N rates higher than 75 % was not favorable due to the reduction in bacterial functioning. In most cases, 75 % of the recommended N application rate along with *A. lipoferum* inoculation had the best effect on the variables.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors highly acknowledge Islamic Azad University, Tabriz Branch- Iran, for their fields and laboratories support.

con la presencia de un sistema de raíces bien desarrollado que facilita la absorción de agua y nutrientes (Sprent y Sprent, 1990). Según Hasanabadi *et al.* (2010), la inoculación de plantas de cebada con *A. lipoferum* incrementó significativamente las variables del crecimiento de la raíz, como peso seco y longitud. La inoculación de trigo con *Azospirillum* aumentó significativamente el peso seco de la raíz en 9 %, comparado con el testigo (Ardakani y Mafakheri, 2011). La inoculación con *Azospirillum* cambia el crecimiento o la morfología de la raíz y causa una absorción mejor de nutrientes y agua, en el desarrollo de las plantas y aumento del rendimiento (Lin *et al.*, 1983; Bottini *et al.*, 2004; Ribauda *et al.*, 2006). El resultado de nuestro estudio mostró que la inoculación con *Azospirillum* aumentó el contenido de N, P, Fe y Zn en 11.87 %, 16.66 %, 7.39 % y 5.95 %, comparado con el testigo sin inocular. Este aumento del contenido en nutrientes minerales puede atribuirse a la absorción mayor de nutrientes debido a un sistema de raíces más desarrollado. Ardakani *et al.* (2011) indican que la inoculación de semillas de trigo con *Azospirillum* aumentó el contenido de NPK en la planta en 21 %, 17 % y 25 %. La inoculación con *Azospirillum* aumentó el crecimiento de las raíces, y por lo tanto la absorción de los nutrientes y el agua, lo cual resultó en un rendimiento mayor (Lin *et al.*, 1983). Según Eid *et al.* (2006), la inoculación de *Celosia argenta* con *Azospirillum* aumentó el contenido de N y P de las hojas.

Otro mecanismo por el cual la inoculación con *Azospirillum* mejora el crecimiento de las plantas es la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, poliaminas y aminoácidos (Thuler *et al.*, 2003; Tsavkelova *et al.*, 2006). Estas fitohormonas promueven el crecimiento de la raíz en las plantas, por lo cual la absorción de agua y nutrientes aumenta (Reis *et al.*, 2000; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Dalla Santa *et al.*, 2004; Chamangasht *et al.*, 2012; Zakikhani *et al.*, 2012). Según Ribauda *et al.* (2006), la inoculación con *Azospirillum* aumentó el contenido de ácido 3-indol acético (AIA) en brotes y raíces de tomate en 7 y 19 veces; además, el contenido de etileno también fue mayor.

CONCLUSIONES

La fertilización químicos nitrogenada y la inoculación con *Azospirillum lipoferum* afectó

LITERATURE CITED

- Aguirre-Medina, J. F., F. Culebro-Cifuentes, J. Cadena-Iñiguez, J. F. Aguirre-Cadena. 2014. Crecimiento de *Tabebuia donnell-smithii* Rose inoculada con hongos micorrízicos y *Azospirillum brasilense*. *Agrociencia* 48: 331-345.
- Ardakani, M. R., and S. Mafakheri. 2011. Designing a sustainable agroecosystem for wheat (*Triticum aestivum* L.) production. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 1: 401-413.
- Ardakani, M. R., D. Mazaheeri, S. Mafakheri, and A. Moghaddam. 2011. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17: 181-192.
- Barea, J. M., M. J. Pozo, R. Azcon, and C. Azcon-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56: 1761-1778.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
- Bashan, Y., and L. E. de-Bashan. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *In: Sparks, D. L. (ed). Advances in Agronomy*, vol. 108. Elsevier, USA. pp: 77-136.
- Bashan, Y., G. Holguin, and L. E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
- Biesiada, A., and A. Kuś. 2010. The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Hortorum Cultus. Acta Scientiarum Polonorum* 9: 3-12.
- Bottini, R., F. Cassan, and P. Piccoli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 497-503.
- Chamangasht, S., M. R. Ardakani, K. Khavazi, B. Abbaszadeh, and S. Mafakheri. 2012. Improving lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and yield by the application of biofertilizers. *Ann. Biol. Res.* 3: 1876-1879.
- Dalla Santa, O.R., R. F. Hernandez, G. L. Michelena A., P. R. Junior, and C. R. Soccol. 2004. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47: 843-850.
- Eftekhari, S. A., M. R. Ardakani, F. Rejali, F. Paknejad, and T. Hasanabadi. 2012. Phosphorus absorption in barley (*Hordeum vulgare* L.) under different phosphorus application rates and co-inoculation of *Pseudomonas fluorescence* and *Azospirillum lipoferum*. *Ann. Biol. Res.* 3: 2694-2702.
- Eid, R. A., S. A. Abo-Sedera, and M. Attia. 2006. Influence of nitrogen fixing bacteria incorporation with organic and/or inorganic nitrogen fertilizers on growth, flower yield and chemical composition of *Celosia argenta*. *World J. Agric. Sci.* 2: 450-458.
- El-Kholy, L. A., S. El-Ashry, and A. M. Goma. 2005. Biofertilization of maize crop and its impact on yield and grains nutrient content under low rates of mineral fertilizers. *J. Appl. Sci. Res.* 1: 117-121.
- Fageria, N. K. 2009. *The Use of Nutrients in Crop Plants*. CRC Press, USA. pp: 31-47.
- Fageria, N. K., and V. C. Baligar. 2005. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Adv. Agron.* 88: 97-185.
- Hasanabadi, T., M. R. Ardakani, F. Rejali, F. Paknejad, S. A. Eftekhari, and K. Zargari. 2010. Response of barley root characters to co-inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas fluorescence* under different levels of nitrogen. *America-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 9: 156-162.
- Lin, W., Y. Okon, and R. W. F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1775-1779.
- Lugtenberg, B. J. J., T. F. C. Chin-A-Woeng, and G. V. Bloembergen. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 373-383.
- Mehran, M., M. R. Ardakani, H. Madani, M. Zahedi, M. Amirabadi, and S. Mafakheri. 2011. Response of sunflower yield and phytohormonal changes to *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* and animal manure in a chemical free agroecosystem. *Ann. Biol. Res.* 2: 425-430.
- Njuguna, M. N., M. Munene, H. G. Mwangi, J. K. Waweru, and T. E. Akuja. 2010. Effect of seeding rate and nitrogen fertilizer on wheat grain yield in marginal areas of eastern Kenya. *J. Anim. Plant Sci.* 7: 834-840.
- Probst, B., C. Schuler, and R. G. Joergensen. 2008. Vineyard soils under organic and conventional management-microbial biomass and activity indices and their relation to soil chemical properties. *Biol. Fertil. Soils* 44: 443-450.
- Ramos, H. J. O., L. D. B. Rancoto-Maccari, E. M. Souza, J. R. L. Soares-Ramos, M. Hungria, and F. O. Pedrosa. 2002. Monitoring *Azospirillum*-wheat interaction using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *J. Biotechnol.* 97: 243-252.
- Reis, V. M., J. I. Baldani, V. L. D. Baldani, and J. Döbereiner. 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Plant Sci.* 19: 227-274.
- Ribaudó, C. M., E. M. Krumpolz, F. D. Cassan, R. Bottini, M. L. Cantore, and J. A. Cura. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Regul.* 24: 175-185.
- Rudresha, D. L., M. K. Shivaprakasha, and R. D. Prasad. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth,

—Fin de la versión en Español—



- nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Appl. Soil Ecol. 28: 139-146.
- Sprent, J. I., and P. Sprent. 1990. Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, UK. 256 p.
- Steenhoudt, O., and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24: 487-506.
- Sylvia, D. M., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, and D. A. Zuberer. 2005. Principles and Applications of Soil Microbiology, 2nd ed. Pearson Prentice Hall, USA. pp: 222-241.
- Thuler, D. S., E. I. S. Floh, W. Handro, and H. R. Barbosa. 2003. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. Lett. Appl. Microbiol. 37: 174-178.
- Tsavkelova, E. A., S. Y. Klimova, T. A. Cherdyntseva, and A. I. Netrusov. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Appl. Biochem. Microbiol. 42: 117-126.
- Wiedenhoeft, A. C. 2006. Plant Nutrition. Hopkins WG (Eds) the green world, Chelsea House Publishers, USA. pp: 16-43.
- Yadav, S., J. Yadav, and S. G. Singh. 2011. Performance of azospirillum for improving growth, yield and yield attributing characters of maize (*Zea mays* L.) in presence of nitrogen fertilizer. Res. J. Agric. Sci. 2: 139-141.
- Zaady, E., A. Perevolotsky, and Y. Okon. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. Soil Biol. Biochem. 25: 819-823.
- Zaied, K.A., A. H. Abd El-Hady, A. E. Sharief, E. H. Ashour, and M. A. Nassef 2007. Effect of horizontal DNA transfer in *Azospirillum* and *Azotobacter* strains on biological and biochemical traits of non-legume plants. J. Appl. Sci. Res. 3: 73-86.
- Zakikhani, H., M. R. Ardakani, F. Rejali, M. Gholamhoseini, A. Khodaei Joghhan, and A. Dolatabadian. 2012. Influence of diazotrophic bacteria on antioxidant enzymes and some biochemical characteristics of soybean subjected to water stress. J. Integr. Agric. 11: 1828-1835.
- Zuberer, D. A. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of associative N₂-fixing bacteria. In: Elkan G. H. (ed). Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, USA. pp: 95-125.