



Estudio de la Interacción Maíz - *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*

Miguel Velázquez,^{2*} Elsa Ventura,² Annia Hernández,¹ Sara Aguilar³ y Ana N. Hernández.¹

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Apdo. Postal 32700, La Habana, Cuba.¹ Centro de Desarrollo de Productos Bióticos - IPN. Apdo. Postal 24, Yauatepec, Mor. México.² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN. Apdo. Postal 11340, México. D. F.³

* Autor para correspondencia

ABSTRACT. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* is a plant growth promoting rhizobacteria that could improve maize productivity. In this work we studied some properties of *B. cepacia* strain 0057 in relation to interaction with maize. Spherosphere effect, chemostatic response, indolic compounds and siderophores production were evaluated. We observed inhibitory effect on bacterial growth by maize seeds and their soluble extracts. Root exudates had positive chemostatic effect. We founded indolic compounds production (20.1 µg/ml) and siderophore presence. We think that this microorganisms could improve maize production.

Key words: *Burkholderia cepacia*, maize, rhizobacteria.

RESUMEN. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que puede contribuir al desarrollo y productividad del cultivo del maíz. Este trabajo consistió en estudiar algunas propiedades de *B. cepacia* (0057) que pueden ser fundamentales para entender mejor su comportamiento al interactuar con plantas de maíz. Se evaluó el efecto esferosfera, la respuesta quimiotáctica, la producción de compuestos indólicos y la producción de sideróforos en la cepa 0057 de *B. cepacia*. Se observó un efecto inhibitorio de las semillas de maíz y de sus extractos solubles sobre esta rizobacteria. Los exudados radicales presentaron un efecto quimiotáctico positivo, sobre todo los obtenidos a los 14 días de edad de las plantas. Se demostró la producción de 20.1 µg/ml de compuestos indólicos, así como la presencia de sideróforos en la cepa estudiada. Las capacidades de *B. cepacia* determinadas en este estudio posibilitan conocer mejor este género bacteriano, su interacción con las plantas y su potencial para ser utilizado como un inoculante promotor del desarrollo vegetal.

Palabras clave: *Burkholderia cepacia*, maíz, rizobacteria.

INTRODUCCIÓN

Durante varias décadas se han utilizado bacterias aisladas de la rizosfera de diferentes cultivos como inoculantes microbianos, comprobándose que éstas son capaces de influir positivamente sobre la germinación de las semillas y posteriormente en el desarrollo de las raíces e incrementar el rendimiento de las cosechas en plantas de interés agrícola, así como en la fertilidad de los suelos.

El efecto benéfico de las rizobacterias radica en diferentes mecanismos a través de los cuales ejercen su acción (producción de fitohormonas, sideróforos, etc) con frecuencia se especula científicamente sobre cuál es la contribución precisa que aportan a las plantas, y cómo es que este efecto se traduce en el incremento del rendimiento de las mismas³ y/o en el control biológico de patógenos.²⁹ Con relación a este aspecto se plantea la hipótesis aditiva⁴ donde probablemente más de un mecanismo está involucrado en la asociación y operan simultáneamente o en sucesión.

No se debe soslayar la inconsistencia en las respuestas

de los vegetales cuando se inoculan con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Por lo anterior es de gran importancia conocer el comportamiento de las rizobacterias en el ambiente esferosférico debido a que las semillas en proceso de germinación exudan compuestos solubles como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos²⁶ y compuestos volátiles⁹ como acetaldehído, etanol, metanol, etc. El establecimiento de las bacterias en la rizosfera puede influir en la colonización radical y/o en la eficiencia de su acción, siendo necesario destacar que la composición de nutrientes es diferente en la zona esferosférica con respecto a la rizosfera.¹⁵

La atracción quimiotáctica de especies bacterianas hacia exudados radicales ha sido plenamente demostrada¹³ cada especie de planta dispone de un conjunto de especies microbianas que pueden vivir en asociación con sus raíces.²³

En la actualidad diversas investigaciones avalan que *Burkholderia cepacia (Pseudomonas cepacia)* constituye uno de los principales grupos de rizobacterias con propiedades beneficiosas asociados al cultivo del maíz,¹² por lo



que el presente trabajo tiene como objetivo estudiar algunos factores que inciden en el establecimiento de estas poblaciones bacterianas en la rizosfera del cultivo del maíz, mediante la determinación de propiedades tales como el efecto espermosfera y la quimiotaxis de la interacción planta-bacteria, además de evaluar el potencial de producción de fitohormonas (auxinas) y sideróforos en la cepa estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizó la cepa 0057 de *B. cepacia* procedente del cepario nacional de microorganismos ubicado en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, Cuba.

Material vegetal. Se emplearon semillas de maíz de la variedad "Francisco mejorado" procedentes del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de la Habana, Cuba.

Evaluación del efecto de espermosfera de semillas de maíz sobre *B. cepacia*. Las semillas se desinfectaron con cloruro mercuríco al 0.5% durante siete min. Se enjuagaron con agua destilada estéril en abundancia. Sobre la superficie del medio agar nutritivo, depositado en cajas Petri, se adicionaron 0.5 ml del cultivo bacteriano a una concentración de 10^8 UFC/ml para formar un césped de microorganismos, colocándose 4 semillas en cada caja Petri. Como testigos negativos se emplearon semillas de maíz esterilizadas en autoclave (15 lb/in², 15 min.) y tratadas de la misma forma que las anteriores. Las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 48 h. El efecto de las semillas en vías de germinación sobre el crecimiento bacteriano se evaluó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada semilla, empleando una regla milimétrica.

Efecto de los extractos acuosos de semillas de maíz sobre *B. cepacia* (efecto espermosfera). Las semillas se desinfectaron y lavaron de la misma manera que en el inciso anterior. Se dejaron embebiendo según la proporción de 2.5 g de semillas en 3.5 ml de agua destilada estéril durante una hora en condiciones de esterilidad. Finalmente se desecharon las semillas y se empleó el agua de remojo para medir su efecto sobre el crecimiento bacteriano a una concentración de 10^8 UFC/ml. Como testigo negativo se utilizó agua destilada estéril. Las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 48 h. Se midió el halo de inhibición alrededor de cada muestra de extracto acuoso de las semillas.

Efecto quimiotáctico. Para la germinación de semillas de maíz variedad "Francisco mejorado", las semillas se desinfectaron con cloruro mercuríco al 0.5% durante siete min. El cloruro mercuríco se eliminó por decantación y se enjuagaron con agua destilada estéril abundante. Se colocaron en cajas Petri con medio de papa dextrosa agar a temperatura ambiente para facilitar la germinación y detectar las semillas contaminadas.

Cultivo de plantas en sistemas hidropónicos. Se seleccionaron las plántulas libres de contaminación para

transferirlas a sistemas de cultivo hidropónico esterilizados,¹⁵ conteniendo solución nutritiva de Hoagland diluida 1:2. Se colocaron tres plántulas en cada sistema. Se incubaron bajo un fotoperíodo de 14 h luz-10 h oscuridad a temperatura entre 26 - 30°C. Se desmontaron semanalmente tres sistemas de cultivo, los exudados colectados se utilizaron para evaluar el efecto quimiotáctico en la cepa estudiada.

Evaluación del efecto quimiotáctico de los exudados radicales sobre *B. cepacia*. Para determinar el efecto quimiotáctico de los exudados radicales¹ se emplearon cámaras de quimiotaxis de acrílico, con algunas modificaciones.¹⁵ La cámara consta de dos orificios y un pozo. En el pozo se colocaron 0.5 ml de suspensión bacteriana ajustada a una concentración de 10^4 células/ml, se observó 90 % de motilidad mediante microscopía de contraste de fases. Se permitió la entrada de las bacterias a los capilares a tiempos de 20, 40 y 60 min de exposición. Posteriormente fueron extraídos los capilares y su contenido se diluyó en agua destilada estéril para tomar alícuotas de 100 µl y sembrarlas en cajas Petri conteniendo medio agar nutritivo. Se incubaron a 30°C durante 48 h. Se cuantificó el número de UFC/ml.

Producción de compuestos indólicos. Para el inóculo microbiano se utilizó medio líquido¹⁰ conteniendo dilitriptófano a una concentración de 0.1 g/litro.²³ Se preparó un preinóculo en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio, se colocaron en agitación (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Posteriormente se inocularon al 1% matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo por duplicado, los cuales fueron colocados en agitación durante 48 h.

La extracción se realizó a partir de cultivos que se centrifugaron a 15,000 rpm durante 20 min. Se tomaron 5 ml del sobrenadante para realizar la extracción. La muestra se acidificó con HCL 1N hasta un pH 2.8 - 3. Se realizaron tres extracciones con acetato de etilo (1:1) y se unieron las fases orgánicas. Se evaporaron en rotoevaporador y se resuspendieron en 1 ml de metanol.²³

La cuantificación se realizó mezclando 20 µl del reactivo de Salkowski. Se calentó a 60°C durante 5 min y se añadió 1.5 ml de metanol, agitándose bien y leyéndose a 540 nm. Previamente se realizó una curva patrón de ácido indol acético en un intervalo entre 20 y 100 µg/ml.

Producción de sideróforos. Se preparó un inóculo microbiano utilizando el medio King B (líquido). A partir de un preinóculo preparado en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo y crecido durante 24 h a 37°C, se inocularon al 1% matraces Erlenmeyer de 1 litro con 250 ml de medio y se incubaron durante 96 h a 37°C. La extracción se realizó en forma de desferri-sideróforo,²⁰ adicionando al cultivo microbiano FeCl₃ 1M a razón de 4 ml/litro. Posteriormente los cultivos fueron agitados y centrifugados a 10,000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se esterizaron por filtración utilizando una membrana de 0.2 µm y se liofilizaron. Posteriormente fue-

ron resuspendidos en 1 ml de agua desionizada saturándose con NaCl.

La extracción se realizó con la mezcla cloroformo-fenol (1:1). La fase orgánica se mezcló con tres volúmenes de eter dietílico y se extrajo con agua desionizada hasta lograr desaparición total del color. El extracto acuoso obtenido se lavó tres veces con eter dietílico. Se concentró mediante evaporación en rotoevaporador a 55°C. Finalmente las muestras se diluyeron en 1 ml de agua desionizada. Para la cuantificación, el extracto de sideróforo crudo se leyó a 400 nm contra agua desionizada. La concentración se determinó aplicando el coeficiente de extinción molar.

Los extractos de sideróforos producidos por la cepa estudiada fueron purificados mediante cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex. Se utilizó una columna de vidrio C (Pharmacia Fine Chemicals, 15 x 900 mm), utilizando carboximetil Sephadex, equilibrada previamente con regulador piridina-acetato 50 mM, pH 5. Las muestras fueron eluidas de la columna con el regulador de fijación a una velocidad de 20 ml/h y las fracciones colectadas (3 ml) se leyeron a 405 nm. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente. La pureza se determinó por cromatografía, utilizando la sílica gel G y la mezcla etanol-agua (70:30) como sistema de solventes. Las placas fueron observadas mediante luz ultravioleta (UV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del efecto espermosfera. La zona de influencia alrededor de las semillas en proceso de germinación conocida como espermosfera, tiene importancia en la interacción planta-microorganismos, influyendo en el establecimiento temprano de esta asociación. Las semillas durante su proceso de germinación pueden excretar diferentes compuestos químicos que ejercen un efecto de estimulación o inhibición sobre los microorganismos que se encuentran a su alrededor. La fig. 1 muestra que existe un efecto inhibitorio de las semillas de maíz de la variedad "Francisco mejorado" sobre la cepa de *B. cepacia* estudiada, se pueden estar liberando diferentes compuestos que son capaces de afectar el crecimiento bacteriano. Existen estudios²⁷ donde se hace evidente que las semillas de maíz en vías de germinación liberan metabolitos que son dañinos para los microorganismos, tales como metanol, acetaldehído, etanol, ácido fórmico, etileno y propileno.

La tabla 1 refleja los halos de inhibición de crecimiento bacteriano expresados en milímetros, donde se corrobora que durante el proceso de germinación, la población bacteriana sufre afectaciones para poder multiplicarse y lograr establecerse en las semillas. Este efecto también puede estar determinado por factores propios de la semilla como el genotipo, la presencia de fungicidas y en algunos casos el pH de su superficie.¹⁷

Investigaciones realizadas¹⁵ demuestran la diferente sensibilidad de cepas bacterianas endógenas e inoculantes

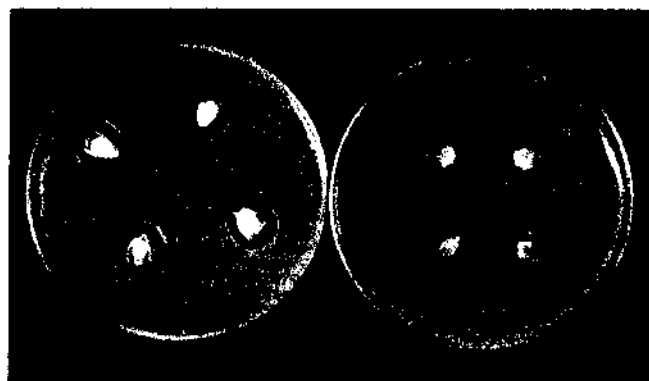


Fig. 1. Efecto espermosfera. A; semillas viables B: Semillas no viables

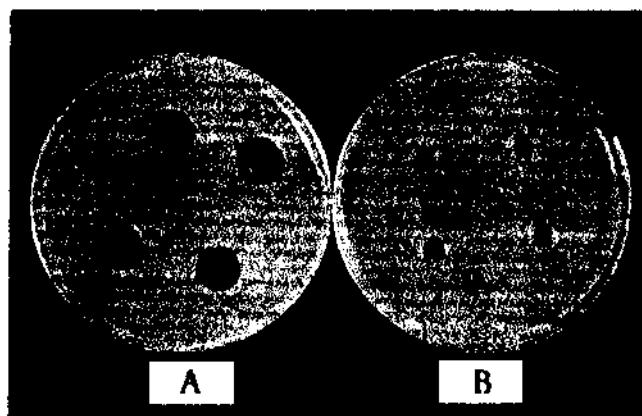


Fig. 2. Efecto espermosfera. A, extractos acuosos de semillas; B, agua destilada estéril

a los compuestos volátiles y a los extractos acuosos de dos variedades de arroz. Este efecto es también observado en nuestros resultados. La fig. 2 refleja la inhibición del crecimiento de *B. cepacia* cuando es enfrentada a extractos solubles de las semillas de maíz empleadas. La tabla 2 presenta los halos de inhibición evaluados, los cuales fueron menores a los observados con semillas de maíz. Los compuestos volátiles y los extractos acuosos de las semillas poseen diferente composición química puesto que proceden de etapas distintas dentro del proceso de germinación donde la glicolisis, el ciclo del ácido tricarboxílico y el ciclo de las pentosas operan comúnmente aunque no son de igual importancia en las diferentes fases de la germinación.¹⁵

Los inoculantes comerciales utilizados en la actualidad prestan especial atención a la concentración bacteriana, quedando claramente demostrado la diferencia existente entre el inóculo aplicado y el que realmente sobrevive en la semilla y ejerce su efecto beneficioso sobre el cultivo. Resultados satisfactorios⁶ se han obtenido al utilizar inóculos de *Azospirillum* con un número elevado de células viables dentro de semillas preemergentes.

Diversos autores han evaluado utilizar diferentes for-



Tabla 1. Evaluación del efecto espermosfera por semillas en vías de germinación.

<i>Burkholderia cepacia</i>				
1	2	3	4	5
4.1 *	5.0	5.2	4.7	4.5
4.3	4.5	4.7	5.2	5.0
5.8	5.3	5.0	4.9	4.8
5.2	4.9	3.8	4.9	4.6
4.85 **	4.92	4.67	4.92	4.72
±0.69	±0.28	±0.53	±0.18	±0.19

*Diámetro de halo de inhibición en mm

**Promedio y desviación estándar

mas de inoculación con el propósito de proteger a los microorganismos, además han estudiado algunos soportes inertes que faciliten la lenta liberación microbiana y así disminuir el riesgo de su afectación, sobresaliendo los estudios de microencapsulación.⁵

Quimiotaxis de la interacción planta-bacteria. Los exudados radicales de maíz colectados durante 7, 14 y 21 días a través del sistema axénico utilizado (fig. 3) pueden contener diferentes sustancias liberadas por las raíces de las plantas, las cuales pueden ser metabolizadas por diferentes especies bacterianas. Diversos estudios¹⁸ avalan que en los exudados radicales se encuentran presentes compuestos tales como azúcares y aminoácidos que ejercen una acción importante sobre el establecimiento de los microorganismos en la zona rizosférica.

Constituye un principio básico de las relaciones planta-microorganismos conocer el comportamiento de las especies estudiadas ante exudados radicales de las plantas de interés, debido a que ellos son utilizados inmediatamente por los microorganismos que viven en la superficie de la raíz y la rizosfera, sirviendo como fuente de nutrientes y energía. De este modo inhiben o estimulan la actividad bioquímica microbiana e influyen indirectamente en las interrelaciones entre los microorganismos colonizadores a través de la acción selectiva que ejercen sobre especies o grupos particulares.

Los exudados radicales de maíz contienen aminoácidos tales como alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, serina y valina.² Ellos pudieran ejercer un efecto positivo sobre la producción de fitohormonas, debido a que el crecimiento de *Azotobacter chroococcum* fue estimulado en presencia de exudados radicales de maíz, incrementándose la producción de auxinas, giberelinas y citoquininas cuando se adicionaron exudados de 7 y 30 días al medio de cultivo.¹⁹

La Fig. 4 refleja la respuesta quimiotáctica de *B. cepa-*

Tabla 2: Evaluación del efecto espermosfera por extractos acuosos de semillas en vías de germinación

<i>Burkholderia cepacia</i>				
1	2	3	4	5
4.4 *	3.9	3.8	3.7	4.1
4.5	5.0	4.2	4.1	4.0
3.8	4.3	3.9	3.5	3.8
5.1	4.4	4.0	4.9	3.7
4.45**	4.4	3.97	4.05	3.9
±0.46	±0.39	±0.15	±0.54	±0.16

*Diámetro de halo de inhibición en mm

**Promedio y desviación estándar

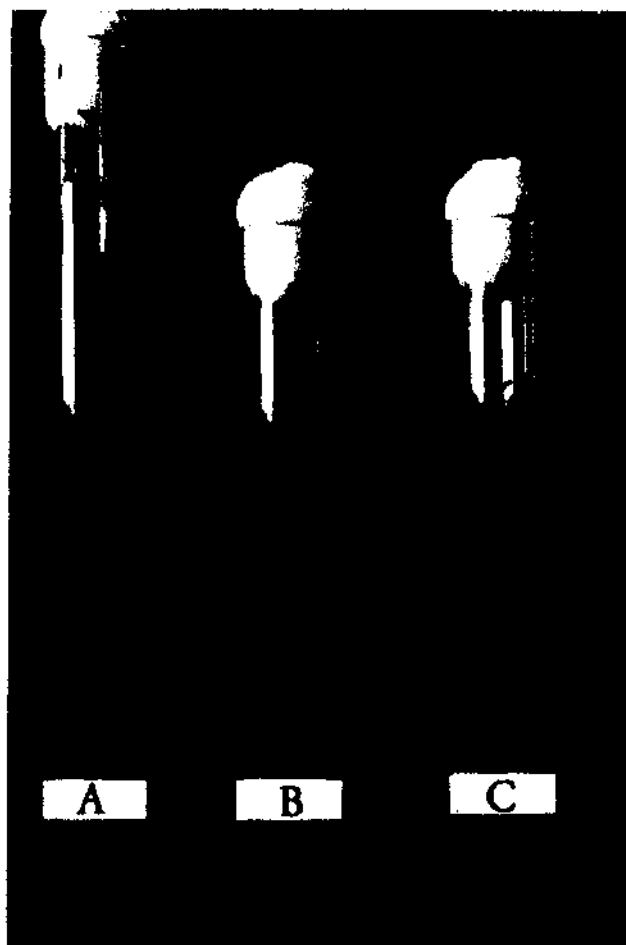


Fig. 3. Colección de exudados radicales de maíz. A, 21 días; B, 14 días; C, 7 días.

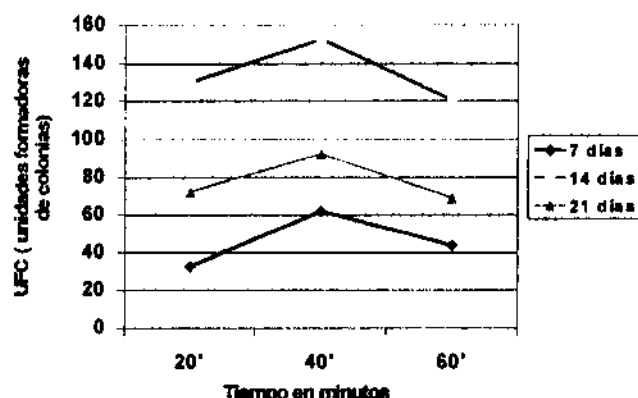


Fig. 4. Respuesta quimiotáctica de *B. cepacia* hacia exudados radiculares.

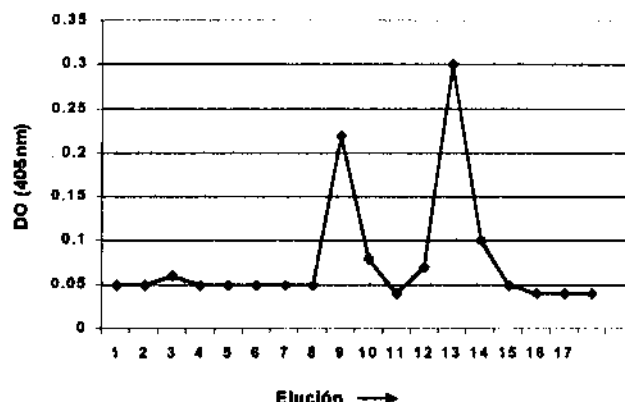


Fig. 5. Purificación de sideróforos *B. Cepacia* hacia exudados radiculares.

cia hacia exudados radiculares de 7, 14 y 21 días de edad, evidenciándose que el tiempo óptimo para evaluar el potencial quimiotáctico es alrededor de los 40 min, ya que fue donde se observó la mayor entrada de los microorganismos al capilar. Se puede comprobar que *B. cepacia* es atraída quimiotácticamente por los exudados radiculares de maíz, siendo mayor la respuesta observada con exudados de 14 días de edad.

A través de la cámara de quimiotaxis fue posible conocer que los compuestos presentes en los exudados de maíz son capaces de atraer a la cepa bacteriana estudiada, no sucediendo así en el caso del capilar que contenía solución de Hoagland estéril (utilizado como testigo) donde no existió crecimiento microbiano en medio agar nutritivo.

La quimiotaxis es una propiedad que puede contribuir a la sobrevivencia, colonización rizosférica y al inicio de las interacciones de mutualismo;⁴ esta contribución no está del todo dilucidada aunque resulta interesante observar la capacidad de las bacterias para responder "in situ" a las concentraciones de sustratos.¹⁶

Obtención de compuestos indólicos. Dentro de los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestarse, se menciona la producción de compuestos indólicos, atribuyéndose a los mismos incrementos en el desarrollo y rendimiento de diversas especies de plantas. Dado que la función primaria de las auxinas incluye la división celular y alteraciones enzimáticas.¹⁴

Se ha confirmado por algunos autores^{10,24} que un gran número de bacterias que habitan en los suelos como *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Rhizobium* producen auxinas y específicamente ácido indol acético. Por otra parte, son numerosos los reportes de la producción de esta fitohormona por bacterias del género *Azospirillum*.¹¹

De acuerdo a las determinaciones realizadas la cepa 0057 de *B. cepacia*, produce 20.1 µg/ml de la auxina estudiada, cuya concentración puede ser suficiente para tener una influencia directa en la promoción del crecimiento vegetal, si tenemos en cuenta que los reguladores del creci-

miento vegetal en pequeñas concentraciones,²² incluso inferiores a la encontrada en esta cepa, influyen sobre el metabolismo de las plantas.

Resultados similares fueron obtenidos¹⁴ al comparar la producción de compuestos indólicos de la cepa estudiada con 28 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas mediante el modelo esfermosférico de la rizosfera del cultivo del maíz, resultando sobresaliente la cepa 0057 de *B. cepacia*. Además de corroborar que este efecto se tradujo en resultados satisfactorios en un bioensayo efectuado en condiciones de laboratorio, incrementándose la altura de las plantas y el contenido de proteínas solubles en hojas.

Se ha comprobado²² que los microorganismos productores de fitohormonas son capaces de alterar la síntesis de RNA y proteínas en plantas, causando incrementos en el desarrollo de las mismas. Su uso racional puede incrementar la productividad del suelo, reducir la fertilización y favorecer la producción en tierras pobres.²⁴

Producción y purificación de sideróforos. Los análisis realizados²⁸ demuestran que los sideróforos sirven como vehículo para el transporte de hierro III dentro de la célula microbiana, ya que el sistema de transporte de la célula y el receptor de membrana específico reconocen el complejo sideróforo-hierro.

La cepa 0057 de *B. cepacia* reflejó valores del orden de 0.069 mg/ml al evaluar la producción de sideróforos crudos, aspecto sustentado por otros investigadores⁸ quienes comprobaron la producción de estos compuestos por bacterias pertenecientes a este género bajo condiciones limitantes de hierro por lo que su extracción y purificación se realiza fundamentalmente en forma de desferri-sideróforo o complejo férrico.

En la Fig. 5 se puede observar que al realizar la cromatografía de intercambio iónico se obtuvieron dos picos. Por otra parte, al desarrollar la cromatografía en sílica gel G se obtuvo una sola mancha fluorescente de color amarillo - café, por lo que pudieramos inferir que se trata de dos tipos de sideróforos muy similares desde el punto de vista es-



tructural.

B. cepacia produce dos clases de sideróforos del tipo hidroxamato²¹ y se diferencian fundamentalmente en el tamaño y composición de la cadena peptídica que se encuentra unida al cromóforo fluorescente.

La aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de patógenos ha sido catalogada como una práctica importante en el manejo integrado de las enfermedades en plantas. Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas, atribuyéndose su efecto a la producción de sideróforos y/o de productos volátiles o difusibles (antibiosis).⁷

El estudio realizado nos ha permitido caracterizar a la cepa 0057 de *B. cepacia* en cuanto a producción de compuestos indólicos y sideróforos y de esta forma contribuir al esclarecimiento de las ventajas que posee este género bacteriano en cuanto a su posible utilización como inoculante microbiano, por otra parte nos permite aumentar el nivel de conocimientos acerca de la interacción planta - microorganismos al analizar la adaptación de esta rizobacteria al ambiente espermoférico, lo que hace posible la selección de formas de inoculación adecuadas, pudiéndose inferir que los inóculos en soporte sólido tendrán mayor posibilidades de éxito, aspecto además avalado a través de la respuesta quimiotáctica obtenida.

El trabajo desarrollado por los microbiólogos agrícolas encausado al aislamiento y selección de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal, debe ser respaldado mediante estudios de diferentes capacidades microbianas por las cuales la inoculación puede tener un efecto beneficioso para el cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Universidad de las Naciones Unidas para la realización de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, J. 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *E. coli*. J. Gen. Microbiol. 74:77-91.
- Alvarez-Morales, A. y A. Lemos-Pastrana. 1980. Quimiotaxis de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*. II. Acción de los aminoácidos contenidos en exudados radicales de gramíneas. Rev. Lat. Microbiol. 22:137-142.
- Bashan, Y. 1993. Potential use of *Azospirillum* as biofertilizer. Turrialba. 23:286 - 291.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Carrillo, A. y Y. Bashan. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria, p.460-463. In: A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodoma, N. Kondo y S. Akino. (Ed) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria present status and future prospect. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Creus, C., R. Suelo y C. Barassi. 1996. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. Can. J. Microbiol. 42:83-86
- De la Cruz, A., J. Poplawsky y M. Wiese. 1992. Biological Suppression of Potato Ring Rot by fluorescent *Pseudomonads*. Appl. Environ. Microbiol. 58:1986-1981.
- Dybas, M., G. Tarara y C. Criddle. 1995. Localization of carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. Appl. Environ. Microbiol. 61:758 - 762.
- Gorecki, R., E. Harman y L. Mattick. 1985. The volatile exudate from germinating pea seeds of different viability and vigor. Can. J. Bot. 63:1035-1039.
- Grapelli, A. y W. Rossi. 1981. The effect of phytohormones produced by *Arthrobacter* sp. On the phosphatase activity in plants roots. Folia Microbiol. 26:137-141.
- Hartmann, A., M. Singh y W. Klimuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amount of AIA. Can. J. Microbiol. 29:916-923.
- Hebbar, K., M. Martel y T. Heulin. 1994. *Burkholderia cepacia* a plant growth promoting rhizobacteria associate of maize. Proceedings of the Third International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. 201-203.
- Heinrich, D. y D. Hess. 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. Can. J. Microbiol. 31:26-31.
- Hernández, A. 1998. Caracterización de cepas de *P. cepacia* y *P. fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, especialidad en Ecología microbiana. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. MES. La Habana, Cuba. 63 p.
- Jiménez, M. 1997. Estudio de la interacción plantas de arroz-rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias, especialidad en Fisiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - IPN. México, DF. 101 p.
- López de Victoria, G. y C. Lovell. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 59:2951-2955.
- Mahaffee, W. y P. Backman. 1993. Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis*. Gb03. Phytopathology. 83:1120-1125.
- Manson, M., J. Armitage, J. Hoch y R. Macnab. 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. J. Bacteriol. 180:1009-1022.



19. Martínez-Toledo, M., T. de la Rubia, J. Moreno y J. González-López. 1988. Characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and N uptake of wheat crop. *Plant Soil*. 110:149-152.
20. Meyer, J. y A. Abdala. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107:319-328.
21. Meyer, J., D. Hohna y F. Hallé. 1989. Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore. *J. Gen. Microbiol.* 135:1479-1487.
22. Nieto, K. y T. Frankenberger. 1990. Microbial production of cytokinins soil. *Biochemistry*. 6:191-248.
23. Rovira, A. 1991. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.* 74:77-91.
24. Santín-Ortega, I. y M. Valdés. 1998. El efecto de las fitohormonas microbianas sobre las plantas. *Investigación Hoy*. Dic. 8-12.
25. Tien, T., M. Gaskins y D. Hubbell. 1979. Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37:219-226.
26. Vancura, V. y G. Stotzky. 1971. Excretions of germinating plant seeds. *Folia Microbiol.* 16:512-516.
27. Vancura, V. y G. Stotzky. 1976. Gaseous and volatile exudates from germinating seeds and seedlings. *Can. J. Bot.* 54:518-532.
28. Xiao, R. y W. Kisaalita. 1995. Purification of pyoverdines of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 by cooper-chelate chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3769-3374.
29. Zaki, K., J. Misaghi y A. Heydari. 1998. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*. *Plant Disease* 82:291-293.