



IMPACT OF *AZOSPIRILLUM* *BRASILENSE*, A RHIZOBACTERIUM STIMULATING THE PRODUCTION OF INDOLE-3-ACETIC ACID AS THE MECHANISM OF IMPROVING PLANTS' GROW IN AGRICULTURAL CROPS

IMPACTO DE *AZOSPIRILLUM* *BRASILENSE*, UNA RIZOBACTERIA QUE ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO COMO EL MECANISMO DE MEJORA DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN LOS CULTIVOS AGRÍCOLAS

Received 12 30 2019
Accepted 04 16 2020
Published 04 30 2020

Vol. 37, No.1, pp. 34-39, Ene./Abr.2020
Revista Boliviana de Química

37(1), 34-39, Jan./Apr. 2020
Bolivian Journal of Chemistry
DOI: 10.34098/2078-3949.37.1.5



Short review

Peer-reviewed

Jessica I. Licea-Herrera*, Jesús Di Carlo Quiroz-Velásquez y José L. Hernández-Mendoza

Laboratorio de Biotecnología Experimental, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, de Bioorgánica, Cd. Reynosa, Tamaulipas México, C.P. 88710

Keywords: *Indole-3-acetic acid, Inoculation with rhizobacteria, Azospirillum brasilense, Metabolic pathway, Phytohormones.*

Palabras clave: *Ácido-3-indol acético, Inoculación con rizobacterias, Azospirillum brasilense, Ruta metabólica, Fitohormonas.*

ABSTRACT

Azospirillum is a rhizobacteria capable of promoting the plant growth of different crops of agronomic interest. Up to now, 21 species are known, the most studied being *Azospirillum brasilense*. The effect of the use of the bacterium in corn crops has been reported, having been determined in parameters such as plant height and chlorophyll content, including an increase in the amount of fixed nitrogen from the atmosphere. Similarly, in soybean and wheat crops, a significant benefit has been reported in the increase in chlorophyll content related to the increase in grain yield per hectare. The main mechanism by which *Azospirillum* improves plant growth is through the production of phytohormones, mainly the indole-3-acetic acid (IAA), which is generated in the plant, but in nanomolar quantities, participating in various functions. It is known that the main route to the production of IAA is through the amino acid tryptophan (TRP) by means of four routes: 1) indole-3-acetonitrile (IAN), 2) indole-3-acetamide (IAM) 3) indole-3-pyruvic acid (IPyA) and 4) Tryptamine (TAM). Through various studies, it is known that there is an independent TRP route but, until now, the metabolites involved in the route, the levels of expression and the environmental circumstances in which it is expressed are not known.

*Corresponding author: jllicea1800@alumno.ipn.mx



RESUMEN

Azospirillum es una rizobacteria capaz de promover el crecimiento vegetal de diferentes cultivos de interés agronómico. Se conocen hasta ahora 21 especies, siendo la más estudiada *Azospirillum brasilense*. Se ha reportado el efecto del uso de la bacteria en cultivos de maíz, habiéndose determinado el mismo en parámetros como ser la altura de la planta y el contenido de clorofila, incluido un aumento de la cantidad de nitrógeno fijado de la atmósfera. De forma similar, en cultivos de soya y trigo, se ha reportado un beneficio significativo en el aumento del contenido de clorofila relacionado con el aumento en el rendimiento de grano por hectárea. El mecanismo principal por el cual *Azospirillum* mejora el crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas, principalmente el ácido-3-indol acético (AIA), el cual es generado en la planta, pero en cantidades nanomolares, participando en diversas funciones. Se conoce que la vía principal a la producción de AIA es a través del aminoácido triptofano (TRP) mediante cuatro rutas: 1) indol-3-acetonitrilo (IAN), 2) indol-3-acetamida (IAM) 3) ácido indol-3-pirúvico (IPyA) y 4) Triptamina (TAM). Gracias a diversos estudios se sabe que existe una ruta independiente de TRP, pero hasta el momento, no se conocen los metabolitos que intervienen en la ruta ni sus niveles de expresión, ni las circunstancias ambientales en las que se expresan.

INTRODUCCIÓN

Un mecanismo alternativo en la recuperación de suelos agrícolas, consiste en la incorporación de rizobacterias que mejoran las características morfológicas de las especies vegetales y la estructura del suelo, incluso realizando simbiosis con otras bacterias o con la misma planta [1]. A las bacterias que se encuentran en la rizosfera y se asocian a efectos benéficos para la planta, se les conoce como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) Los principales beneficios de las rizobacterias a las plantas son: 1) la síntesis de fitohormonas, 2) mejora de los factores en nutrición mineral y 3) protección de plantas hacia problemas fitopatógenos [2]. Los géneros de algunas rizobacterias más estudiadas son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* [3].

El género *Azospirillum*, ha tomado gran relevancia desde la década de los setentas pues, su inoculación en las plantas conlleva a un aumento significativo del crecimiento en raíces, resistencia a agentes patógenos, aumento de elementos necesarios para la vida vegetal como el nitrógeno, inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal [4].

Una de las principales fitohormonas producidas por *Azospirillum* es el ácido-3-indol acético (AIA), auxina que controla diversos procesos fisiológicos [40]. Se ha propuesto que el 80% de las bacterias de la rizósfera son capaces de producir AIA, ya que se ha observado un alto grado de similitud en las vías de síntesis de AIA de plantas y bacterias [5,6,49].

Se conocen las vías de síntesis de AIA, en bacterias, de *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*, pero en *Azospirillum* se cuenta con datos parciales, incluso de las enzimas que participan, los genes que las codifican y su regulación [50]. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de las principales características del género *Azospirillum*, algunos resultados en la inoculación con diferentes especies de éste género, destacando *A. brasilense* y los trabajos relacionados con la producción de ácido-3-indol acético por *Azospirillum*.

HISTORIA

El género *Spirillum lipoferum* fue descrito por primera vez por Beijerinck en 1925. Posteriormente, resurgió el estudio de ésta bacteria a través de las observaciones de Peña-Cabrales y Döbereiner en 1936. Estudios taxonómicos de *S. lipoferum*, generaron una reclasificación en un género nuevo, *Azospirillum* [7].

Actualmente se han reportado 21 especies. Las primeras especies descritas y actualmente más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense* [8], posteriormente fueron descritas *A. amazonense* [9], *A. halopraeferans* [10], *A. irakense* [11], *A. largimobile* [12], *A. doebereineriae* [13], *A. oryzae* [14], *A. melinis* [15], *A. canadense* [16], *A. zaeae* [17], *A. rugosum* [18], *A. picis* [19], *A. palatum* [20], *A. thiophilum* [21], *A. formosense* [22], *A. humicireducens* [23], *A. fermentarium* [24], *A. himalayense* [25], *A. soli* [26], *A. agricola* [27].

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE AZOSPIRILLUM



Esta bacteria se caracteriza por presentar forma de varilla o bacilar, es una gram negativa, con movimiento vibratorio característico y patrón flagelar mixto. Tamaño de 0.8-1 μm de largo y 2-4 μm de ancho [28]. Son bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (N_2), se encuentran comúnmente en asociación con raíces de pastos y cereales de diferentes regiones del mundo [47]. Esto indica que presentan una amplia distribución ecológica, y se les ha encontrado en zonas templadas, tropicales y subtropicales. La morfología de las células de estas bacterias es diferente, dependiendo de las condiciones nutricionales a las que se vea sometida e incluso a la edad del cultivo. Las células son mótils tanto *in vitro* como en el mismo suelo e incluso pueden adaptar su flagelación a diferentes ambientes [48]. Estos microorganismos encajan en el grupo de diazotrofos endofíticos facultativos, ya que colonizan tanto el interior de las raíces, donde sus células pueden penetrar en el interior de la célula, así como en la parte externa de las raíces, encontrándose en el mucílago presente en la rizosfera de las plantas [29,30].

INOCULACIÓN EN CULTIVO CON AZOSPIRILLUM

De este género, la primera especie descrita y actualmente más estudiada es *Azospirillum brasilense*; la inoculación de los cultivos con esta bacteria ejerce efectos benéficos entre los que destacan el crecimiento vegetal e incremento en el rendimiento del cultivo hasta un 30% en cereales de alta importancia agronómica. Estos efectos se derivan principalmente de los cambios morfológicos y fisiológicos de las raíces, lo que lleva al incremento de una mayor absorción de agua y minerales [31].

En cultivos de maíz (*Zea mays L.*) inoculados con diferentes cepas de *Azospirillum sp* se ha visto un mayor efecto en el aumento de la altura de la planta y contenido de clorofila [32]. Incluso en interacción con otras bacterias PGPR, un análisis de expresión diferencial reveló que las transcripciones predominantemente *nif* (genes que codifican enzimas relacionadas con la fijación de nitrógeno atmosférico) de *Azospirillum* están sobre expresadas, lo que sugiere que fue responsable de la fijación de nitrógeno en el maíz [34]. En cultivos de soya (*Glycine max*) inoculados con productos bacterianos comerciales de *Azospirillum spp*, se ha visto un efecto en el aumento del número de vainas, biomasa radical, diámetro del tallo, altura de la planta y sobretodo en el índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) relacionándolo con el aumento en el rendimiento de grano por hectárea. En el mismo estudio, se comprobó que la interacción entre la fertilización inorgánica y los inoculantes no contribuyen a optimizar la productividad de la soya [35], permitiendo notar el papel que ejercen éste tipo de microorganismos en el desarrollo de la planta de forma natural.

Resultados similares se han obtenido de cultivos de trigo (*Triticumaestivum L.*) [32] inoculados con *Azospirillum brasilense*. En la madurez, las plantas inoculadas mostraron una mayor biomasa, rendimiento de grano y contenido de nitrógeno que las no inoculadas en ambos suelos, y una mayor concentración de proteína de grano que las no inoculadas; de tal manera que *A. brasilense* aumentó el crecimiento de las plantas al estimular la absorción de nitrógeno por las raíces [36]. Los beneficios anteriores se ven reflejados en un mayor rendimiento de los cultivos por hectárea y representa menores costos de producción, incluso sin el empleo de fertilizantes inorgánicos [35].

En general, se cree que el mecanismo principal por el cual *Azospirillum* mejora el crecimiento de las plantas es mediante la producción de hormonas vegetales o fitohormonas [37]. Las fitohormonas son moléculas orgánicas sencillas que regulan la expresión de genes determinados, actúan como mensajeros químicos, controlan el crecimiento y desarrollo de la planta, responden a cambios ambientales [38].

Las principales hormonas vegetales son: las citocininas, las giberelinas, el etileno, el ácido abscísico y las auxinas [39].

PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO POR AZOSPIRILLUM

El ácido-3-indol acético (AIA), es la auxina que juegan el rol más importante en el desarrollo y crecimiento vegetal, presente en todas las plantas, comúnmente en cantidades nanomolares, sin embargo, una mayor concentración se encuentra en las regiones de crecimiento activo. La función principal de ésta es el alargamiento y división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo y en las respuestas defensivas [40].

Las plantas superiores exudan, entre otros componentes, el aminoácido triptófano, que es el principal precursor de la biosíntesis de AIA microbiano [51-53]. La síntesis de AIA ocurre especialmente en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. Utilizan dos rutas biosintéticas de producción, una dependiente del aminoácido triptófano (TRP): por la vía de la Triptamina (TAM), indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrilo (IAN) y ácido



indol-3-pirúvico (IPyA); y otra independiente de él, siendo la primera la más importante y de la que se tiene más información [39].

En bacterias, el AIA es un metabolito derivado del TRP, aunque puede ser tomado directamente de la planta, por lo tanto, se conocen diferentes vías de síntesis [41]. Para averiguar acerca de los compuestos que intervienen en la formación de AIA en *Azospirillum*, otros estudios han tratado de obtener mutantes incapaces de sintetizar AIA, sin embargo, en el mejor de los casos solamente se logró obtener mutantes hipoproducidas de este compuesto. Esto sugirió la existencia de más de una vía biosintética del AIA [42,43].

Mediante un HPLC de derivados indólicos y cuantificación de metabolitos presentes, Zakharova et col., identificaron tres vías por las que se puede sintetizar AIA a través de TRP, en *Azospirillum brasilense*; 1) mediante IAN, 2) IAM y 3) IPyA [44]. Sin embargo, conforme avanzaron las investigaciones, se descubrió que además presenta una cuarta vía a través de TAM independiente de TRP [38]. Uribe en 2016, reporta una vía independiente de TRP, presente en *Trichoderma koningiopsis*, en la que a partir del ácido chorísmico se produce ácido antranílico que, a través de diferentes intermediarios, genera AIA [45]. Se conoce que en ausencia de TRP, *Azospirillum* sigue produciendo AIA, lo que permite suponer la existencia de una vía independiente [46]; sin embargo, hasta el momento, no se conocen los metabolitos que intervienen en la ruta, sus niveles de expresión y circunstancias ambientales en las que se expresan, dejando un área de oportunidad para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

Azospirillum presenta una alternativa en la recuperación de suelos erosionados, debido a su efecto benéfico en inoculación de cultivos de interés agronómico. El mecanismo principal de éste efecto es debido a fitohormonas como el AIA del cual se conoce las rutas dependientes de TRP y se propone una ruta independiente de él. Sin embargo, se desconocen aún diversas características de la ruta que abren posibilidad a futuras investigaciones en la manipulación de la misma.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional – Centro de Biotecnología Genómica, al proyecto SIP-20190016 por el financiamiento económico otorgado además al programa BEIFI-IPN por el apoyo económico otorgado al estudiante Licea-Herrera.

FILIACIONES

El Dr. Hernández-Mendoza es miembro del SNI, becario EDI y COFFA. El Dr. Quiroz-Velázquez es becario EDI. Jessica I. Licea-Herrera es tesista del Laboratorio de Biotecnología Experimental, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS

1. Saavedra, D.A.C., Martínez, H.F.C., Rosero, N.C., Cuenca, F.F.G., Fernández, R.G., Moreira, Á.V.C. **2017**. Rizobacterias que promueven el desarrollo e incremento en productividad de *Glycine max* L., *Revista Ciencia y Tecnología*, 10(1), 7-15.
2. Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., & Ruiz-Sainz, J.E. **2007**. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters*, 272(2), 127-136.
3. Döbereiner, J., Baldani, V. L., Reis, V. M. *Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops*. In: *Azospirillum VI and related microorganisms*, **1995**, Springer, Berlin, Heidelberg, 3-14.
4. Mehnaz, S. *Azospirillum: a biofertilizer for every crop*, In: *Plant microbes symbiosis: Applied facets*, **2015**, Springer, New Delhi. 297-314.
5. Beijerinck, M.W. **1922**, *Azotobacter chroococcum* als indicator de vruchtbaarheid van der grond, *K. Ned. Akad. Wet. Versl. Gewone Vergad. Afd. Natuurkd.*, 30, 431-438.
6. Döbereiner, J. *Ten years Azospirillum*, In: *Azospirillum II: Genetics, physiology, and ecology*, ed by Klingmüller, W., **1983**, Birkhauser, Experientia supplementum 48, Basel, Switzerland, 9-23.
7. Tarrand, J.J., Krieg N.R., Döbereiner, J. **1978**. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* Beijerinck comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov., *Can. J. Microbiol.*, 24, 967-980.
8. Magalhães, F.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R., Döbereiner, J. **1983**, A new acid-tolerant *Azospirillum* species, *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 55, 417-430.



9. Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., De Ley, J. **1987**, *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 43-51
10. Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Kaiser, P. **1989**, *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil, *Res. Microbiol.*, **140**, 679-693.
11. Sly, L.I., Stackebrandt, E. **1999**, Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 541-544.
12. Doebeiner, A., Eckert, B., Weber, O.B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A. **2001**, *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(1), 17-26.
13. Xie, C.H., Yokota, A. **2005**, *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**(4), 1435-1438.
14. Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E.T., Tan, Z. **2006**, *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(6), 1263-1271.
15. Mehnaz, S., Weselowski, B., Lazarovits, G. **2007**, *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **57**(3), 620-624.
16. Mehnaz, S., Weselowski, B., Lazarovits, G. **2007**, *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **57**(12), 2805-2809.
17. Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M.J., Arun, A.B., Lai, W. A., Yassin, A.F. **2008**, *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **58**(4), 959-963.
18. Lin, S.Y., Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A.B., Chen, W.M., Yassin, A.F. **2009**, *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **59**(4), 761-765.
19. Zhou, Y., Wei, W., Wang, X., Xu, L., Lai, R. **2009**, *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China, *The Journal of general and applied microbiology*, **55**(1), 1-7.
20. Lavrinenko, K., Chernousova, E., Gridneva, E., Dubinina, G., Akimov, V., Kuever, J., Grabovich, M. **2010**, *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **60**(12), 2832-2837.
21. Lin, S.Y., Shen, F.T., Young, L.S., Zhu, Z.L., Chen, W.M., Young, C.C. **2012**, *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **62**(5), 1185-1190.
22. Zhou, S., Han, L., Wang, Y., Yang, G., Zhuang, L., & Hu, P. **2013**, *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **63**(7), 2618-2624.
23. Lin, S.Y., Liu, Y.C., Hameed, A., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Shen, F.T., & Young, C.C. **2013**, *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **63**(10), 3762-3768.
24. Tyagi, S., Singh, D.K. **2014**, *Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India, *Annals of microbiology*, **64**(1), 259-266.
25. Lin, S.Y., Hameed, A., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Shen, F.T., & Young, C.C. **2015**, *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **65**(12), 4601-4607.
26. Lin, S.Y., Liu, Y.C., Hameed, A., Hsu, Y.H., Huang, H.I., Lai, W.A., Young, C.C. **2016**, *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **66**(3), 1453-1458.
27. Hall, P.G., Krieg, N.R. **1984**, Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*, *Applied and environmental microbiology*, **47**(2), 433.
28. Bashan, Y., Holguin, G. **1997**, *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances 1990-1996, *Canadian Journal of Microbiology*, **43**(2), 103-121.
29. Bashan, Y., De-Bashan, L.E. **2005**, Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, **1**, 103-115.
30. Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V.L., Goi, S.R., Döbereiner, J. **1997**, Recent advances in BNF with non-legume plants, *Soil Biology and Biochemistry*, **29**(5-6), 911-922.
31. Castellano, M.H., Espinosa, C.T., & Fernández, M.A. **2015** Uso de *Azospirillum* en la agricultura, *Revista Científica Agroecosistemas*, **3**(1).
32. Nguyen, M.L., Spaepen, S., du Jardin, P., Delaplace, P. **2019**, Biostimulant effects of rhizobacteria on wheat growth and nutrient uptake depend on nitrogen application and plant development, *Archives of Agronomy and Soil Science*, **65**(1), 58-73.
33. Villa-Castro, L., Mayek-Pérez, N., García-Olivares, J.G., Hernández-Mendoza, J.L. **2014**, Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp., *Avances en Investigación Agropecuaria*, **18**(1).
34. Gómez-Godínez, L.J., Valverde, S.L.F., Romero, J.C.M., Martínez-Romero, E. **2019**, Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs, *Systematic and Applied Microbiology*, **42**(4), 517-525.
35. Díaz Franco, A., Magallanes Estala, A., Aguado Santacruz, A., Hernández Mendoza, J.L. **2015**, Respuesta de la soya a inoculantes microbianos en el norte de Tamaulipas, México, *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, **6**(2), 227-238.
36. Saubidet, M.I., Fatta, N., Barneix, A.J. **2002**, The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants, *Plant and soil*, **245**(2), 215-222.
37. Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. **2000**, *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS microbiology reviews*, **24**(4), 487-506.



38. Aguilar-Piedras, J.J., Xiqui-Vásquez, M.L., García-García, S., Baca, B.E. **2008**. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 29-37.
39. Jordán, M., Casaretto, J. *Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas*, In: *Fisiología Vegetal*, ed by Squeo, F.A., Cardemil, L. **2006**, Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, v150806, 1-28.
40. Leveau, J.H., Lindow, S.E. **2005**, Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2365-2371.
41. Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., Seeger, M. **2016**, Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias, *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
42. Hartmann, A., Singh, M., Klingmüller, W. **1983**, Isolation and characterization of *Azospirillum mutants* excreting high amounts of indoleacetic acid, *Canadian Journal of Microbiology*, 29(8), 916-923.
43. Abdel-Salam, M.S., Klingmüller, W. **1987**, Transposon Tn5 mutagenesis in *Azospirillum lipoferum*: isolation of indole acetic acid mutants, *Molecular and general genetics MGG*, 210(1), 165-170.
44. Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S., Ignatov, V.V. **1999**, Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: Insights from quantum chemistry, *European journal of biochemistry*, 259(3), 572-576.
45. Uribe, M. Tesis de grado, Análisis bioinformático y molecular de la ruta de triptófano independiente hacia la síntesis de indol acético en *T. konigiopsis* y *T. asperellum*, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas, **2016**.
46. Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H. **1993**, *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6, 609-609.
47. Bashan, Y., Holguin, G. **1997**, *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances, 1990-1996, *Canadian Journal of Microbiology*, 43(2), 103-121.
48. Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C.A. **1994**, Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation, *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1591-1601.
49. Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. **2007**, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.
50. Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Reis, V.M. *Endophytic Occurrence of Diazotrophic Bacteria in Non-Leguminous Crops*, In: *Azospirillum VI and Related Microorganisms Fendrik I.*, ed by del Gallo M., Vanderleyden J., de Zamaroczy M, NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences), vol 37, **1995**, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.
51. Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Makarova, N.M., Tikhonovich, I.A. **2004**, The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria, *Microbiology*, 73(2), 156-158.
52. Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B. **2006**, Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250-256.
53. Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R. **2007**, Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.