



Bioquímica
y
Biológicos

Ingeniantes

Efectos de *Rhizobium* sp., y *Azospirillum* sp., inoculados a la planta de chayote (*Shechium edules* Jacq Sw.)

RESUMEN: Veracruz genera más del 80% de la producción nacional de chayote, esto exige a los productores el uso de tecnologías sustentables y económicas, como la aplicación de bioinoculantes bacterianos que permita sustituir parcial o totalmente las necesidades de fertilización química.

Este trabajo evaluó los efectos de cepas nativas de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*, en el crecimiento de la planta de chayote, mediante un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos (Rhiz, Rhiz-SE, Test-Rhiz, Azos, Test-Azos y el co-inoculado Rhiz-Azos).

Las cepas purificadas se identificaron mediante su morfología, tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Se sembraron en caldos YMA y NFB para la obtención del inóculo con una concentración de 10^7 UFC mL⁻¹, que fue aplicado a las semillas de chayote previo a su siembra para evaluar las variables de estudio por los siguientes 60 días.

Los resultados mostraron que las plantas de chayote inoculadas con *Azospirillum* respondieron en las variables de crecimiento (longitud y diámetro del tallo, número de entrenudos y hojas) superando su testigo. Por otra parte, *Rhizobium* favorece el incremento de la longitud del tallo, el número de entrenudos y la concentración de NH_4^+ .

PALABRAS CLAVE: *Azospirillum*, biofertilizantes, cepas nativas, chayote, PGPR, *Rhizobium*.



Colaboración

Janelive Duarte Ortiz, Evaristo López Guerrero, Instituto Tecnológico Superior Juan Rodríguez Clara; Norma Anabeli Coria Gil, Araceli Montiel Flores, María Alva Ángel Lara, Universidad Veracruzana

ABSTRACT: Veracruz generates more than 80% of the national production of chayote, this requires the producers to use sustainable and economic technologies, such as the application of bacterial bioinoculants that allow partial or total replacement of chemical fertilization needs.

This work evaluated the effects of native strains of *Rhizobium* spp. and *Azospirillum* spp. on the growth of the chayote plant, using a completely randomized design with six treatments: Rhiz, Rhiz-SE, Test-Rhiz, Azos, Test-Azos and The co-inoculated Rhiz-Azos.

The purified strains were identified by their morphology, Gram staining and biochemical tests; Were seeded in YMA and NFB broths to obtain the inoculum with a concentration of 10^7 CFU mL⁻¹, which was applied to chayote seeds prior to sowing to evaluate the study variables for the following 60 days.

The results showed that chayote plants inoculated with *Azospirillum* responded in growth variables (stem length and diameter, number of internodes and leaves), exceeding their control. On the other hand, *Rhizobium* increased the stem length, the number of internodes and the NH_4^+ concentration.

KEYWORDS: *Azospirillum*, Biofertilizers, chayote, native strains, PGPR, *Rhizobium*.

INTRODUCCIÓN

El Estado de Veracruz es el mayor productor del fruto de chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) en todo el país, su cultivo se concentra en tres regiones, que incluye a los municipios de Actopan, Orizaba y Coscomatepec de Bravo; tan sólo en el año 2014 se cosecharon 134,522 mil toneladas, equivalente al 82.4% de la producción nacional [38].

La deficiencia de nutrientes en los cultivos, principalmente de N-P-K, es corregida a través de la adición de fertilizantes (Armenta et al., 2010) del que solo se absorbe entre el 20-40% [16]. Por ello, la fertilización es uno de los factores limitantes en la producción agrícola [20]. Actualmente, se aplican en excesivas cantidades y sin el rigor técnico necesario [32]. Sin embargo, lograr los más altos rendimientos por unidad de superficie, se ha vuelto una prioridad, pero fuera de un control racional y un entorno sostenible. Ésta política ha generado secuelas que recaen en una explotación desmedida de los recursos naturales, pérdida de la biodiversidad, erosión del suelo y cambio climático.

El uso de biofertilizantes a los que se les atribuyen los procesos de fijación biológica de nitrógeno y promoción de crecimiento vegetal [37], favorece el desarrollo de tecnologías de producción menos contaminantes y ecológicamente más racionales [2].

Las rizobacterias llamadas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) incrementan la biomasa vegetal [31], la síntesis de sideróforos [4] [33] [35] y fitohormonas como las auxinas [3, 20], citocininas [25] y giberelinas [10]; favorecen el control biológico de enfermedades y plagas [1, 10, 15], además mejoran la resistencia a condiciones de estrés mediante la síntesis de etileno [3, 28, 39].

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) o BNF (Biological Nitrogen Fixation) es un proceso clave en la biósfera; mediante el cual, los microorganismos del género *Frankia* sp., *Rhizobium* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Azolla* sp. y las *Cianobacterias* [24] son portadores de la enzima Nitrogenasa o Nasa [6] que transforma el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado [12][26], reduciendo hasta en un 20-50% la aplicación de fertilizantes a base de nitrógeno [21].

La PGPR *Azospirillum* es de particular interés por su capacidad para fijar nitrógeno, sintetizar fitohormonas [22] y la formación de células tipo quistes, las cuales le brindan la capacidad de adherirse a cualquier sistema radicular [23] y resistir diferentes tipos de estrés ambiental [19]. La inoculación de cepas *Azospirillum* brasilense en la planta de chayote puede ser una alternativa que favorece los síntomas de deficiencias nutrimentales [9].

Investigaciones previas señalan que las bacterias del género *Rhizobium* sp. funciona como FBN y como PGPR en caña de azúcar [17] y maíz [40], incrementando su cre-

cimiento mediante la síntesis de aminoácidos, vitaminas, ácido indolacético y giberelinas, aun cuando no siempre se presente la fijación de nitrógeno.

La co-inoculación *Azospirillum-Rhizobium* en alfalfa [42], frijol [13] y *Bradyrhizobium japonicum-Azospirillum* brasilense en soja [7] favorece la expresión de genes nod de *Rhizobium*, mejorando la asociación con la planta en la formación de nódulos y la fijación de N₂ [7,8,13].

Por todo lo anterior, es prioritario la búsqueda de una opción viable que permita mantener los estándares de producción en el cultivo de chayote bajo un régimen de fertilización sostenible. El uso de microorganismos benéficos que han sido usados con éxito en otros cultivos puede favorecer a los procesos de fijación biológica de nitrógeno y promoción de crecimiento vegetal.

Este trabajo tiene como propósito identificar los efectos de la inoculación de cepas nativas de los géneros *Azospirillum* sp. y *Rhizobium* sp. en la planta de chayote, mismas que pueden favorecer el incremento en la fijación de nitrógeno y biomasa radicular y aérea, bajo condiciones de invernadero. Este proceso puede reducir parcial o totalmente la aplicación de fertilizantes químicos. Es una opción viable que beneficie a todos los productores de chayote a corto plazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el invernadero y laboratorio de Investigación Bioquímica y Fisiología Vegetal, ubicados dentro de las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana Campus Peñuela, en la ciudad de Córdoba, Veracruz durante el periodo comprendido entre el mes de octubre del 2015 a julio del 2016. Con un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos Rhiz (*Rhizobium* sp. 107 UFC mL⁻¹), Rhiz-SE (*Rhizobium* sp. 107 UFC mL⁻¹ con sustrato estéril), Azos (*Azospirillum* sp. 107 UFC mL⁻¹) Rhiz-Azos (*Rhizobium* sp. - *Azospirillum* sp.), Test-Rhiz (Testigo caldo YMA) Test-Azos (Testigo caldo NFB).

El proceso de investigación se realizó en dos fases. En la primera, se trabajó en el aislamiento de las cepas bacterianas nativas en cultivo axénico, para la obtención del biofertilizante. En la segunda, se inocularon las semillas, y se evaluó los efectos en las variables de crecimiento.

Las cepas bacterianas se obtuvieron de muestras de raíces de plantas leguminosas y gramíneas, que fueron recolectadas en los municipios de Córdoba y Coscomatepec de Bravo. Se aislaron en cultivo axénico para su identificación en base a las características morfológicas, bioquímicas y tinción de Gram comunes para cada género de estudio, que posteriormente se usaron para producir el inoculante que se aplicaría a las plantas de chayote.

Para la obtención del biofertilizante, las cepas nativas de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp., se sembraron en caldo, extracto de levadura Manitol (caldo YMA) [12][33][36] y caldo libre de Nitrógeno con azul de bromotimol (caldo NFB) [11] respectivamente. Se determinó su curva de crecimiento microbiano, para calcular los parámetros cinéticos, y así estandarizar los procesos de obtención de los bio-inoculantes, que se aplicaron a las semillas de chayote, previo a su siembra.

Las semillas de chayote verde liso, fueron recolectadas en el mes de enero de 2016, en un predio localizado a orilla de la carretera Fortín-Huatusco, a 19°01'12" LN y 97°01'47" LW. En el municipio de Coscomatepec de Bravo, Veracruz. Fueron seleccionadas de 35 días después de antésis, con dimensiones de 17 ± 1.0 cm de largo, 12±0.5 cm de ancho ecuatorial y un peso promedio de 415 g.

Las semillas de chayote inoculadas se sembraron en bolsas de polietileno (30 cm ancho x 45 cm largo), que se llenaron con 7 (K). de suelo. Estas bolsas se colocaron dentro del invernadero.

Se evaluó el desarrollo vegetativo durante los 60 días posteriores a la inoculación con el biofertilizante. Se aplicaron re-inoculaciones cada 15 días con alícuotas de la misma concentración inicial (10⁷ UFC mL⁻¹) en un volumen de 10 mL por cada semilla, que se aplicó directamente al sustrato en la base de la planta y cerca de la raíz.

Cada 4 días se evaluaron y registraron los datos de las variables de crecimiento: longitud del tallo (cm) apical más larga, diámetro de tallo, número de hojas y número de entrenudos. La concentración de NH₄⁺ foliar se cuantificó a los 60 después de la siembra, mediante el método colorimétrico de Nessler con una longitud de onda de 630 nm (Reactivo de Nessler: 100 g de Hgl₂ y 70 g de KI en 50 mL de agua destilada. Esta mezcla se añade posteriormente, a una solución fría de 160 g de NaOH en 500 mL de agua destilada. Ambas soluciones se mezclan y se lleva a 1 L).

Los datos de las variables de estudio de los seis tratamientos establecidos se analizaron estadísticamente usando el paquete Minitab® 17.1.0, (2013).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las cepas en cultivo axénico señaladas como MA-04 y MR-03 del género *Azospirillum* sp. y *Rhizobium* sp. respectivamente. Se identificaron mediante morfología celular (Tabla 1), morfología de colonia (Tabla 2), pruebas bioquímicas y tinción de Gram propias de cada uno de los géneros de estudio. Se determinó los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano para estandarizar la obtención del inóculo bacteriano.

Cuadro 1. Morfología celular de las cepas elegidas

Cepas	Tamaño (µm)	Tinción Gram	Morfología en fresco	Movilidad
MA-04	≈ 1.0	Gram (-) Bacilos cortos	Bacilos	Flagelados
MR-03	≈ 1.0	Gram (-) Bacilos	Bacilos	Flagelados

MA-04 (*Azospirillum* sp.) y MR-03 (*Rhizobium* sp.)

Cuadro 2. Morfología de colonia de las cepas elegidas. La morfología de colonia de la cepa MR-03 se evaluó en medio agar 79 y la cepa MA-04 en agar NFB-RC

CEPA	TDC	TC	CC	DO	EL	FC	B	S	IN
MR-03	2	3-5	B	B	E	P	E	Li	S
MA-04	≈ 1	4-6	R	B	P	R	E	Li	Li

TDC-Tamaño de las colonias en mm; TC-Tiempo de crecimiento en días; CC-Color de las colonias (R: Roja, B: Beige); DO-Detalles ópticos (B: brillante); EL-Elevación (P: plana; E: elevada); FC-Forma de las colonias (P: puntiforme, C: Circular, I: Irregular); B-Borde (E: Entero); S-Superficie (Li: Lisa); IN-Invasión (S: Superficial, In: Invasiva).

Se realizó el análisis de varianza por Anova de las medias obtenidas a los 60 días después de la siembra (dds) en cada una de las variables de crecimiento, con un índice de confianza (IC) del 95% y un nivel de significancia α=0.05; con agrupación de medias utilizando el método de Games-Howell y una Prueba de Welch de las medias obtenidas por cada tratamiento (Tabla 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de las medias en las variables de crecimiento a los 60 dds.

Tratamientos	Longitud del tallo (cm)	Número de entrenudos	Número de Hojas	Diámetro de tallo (mm)
1. Rhiz	188.2 a	20.9 a	37.2 b	8.5 b
2. Test-Rhiz	141.0 a	15.7 a	40.6 a b	8.7 a b
3. Rhiz-SE	191.3 a	21.3 a	51.3 a	8.5 a b
4. Azos	231.9 a	19.6 a	40.0 a b	10.3 a
5. Test-Azos	208.5 a	17.9 a	37.8 a b	10.1 a b
6. Rhiz-Azos	231.8 a	21.7 a	36.8 a b	9.5 a b
Valor p≥0.05	0.086 NS	0.140 NS	0.009 *	0.021 *
Valor F	2.60	2.11	5.54	4.29

Las medias obtenidas en la variable de la concentración de nitrógeno (NH₄⁺), se analizaron estadísticamente con Anova, mediante una prueba de Tukey al 5% (Tabla 4) con una desviación estándar agrupada de 0.12892 y un nivel de confianza individual de 99.43%. *Rhizobium* favorece la fijación de nitrógeno en la interacción con la planta de chayote con un incremento significativo del 43.7%.

Cuadro 4. Comparación de medias y desviación estándar en la concentración de NH_4^+ a los 60 dds.

Tratamientos	Medias (mg/g)	Desviación Estándar
1. Rhiz	2.331 a	± 0.151
2. Test-Rhiz	1.311 b	± 0.208
3. Rhiz-SE	1.6961 c	± 0.105
4. Azos	0.386 d	± 0.054
5. Test-Azos	0.595 d	± 0.123
6. Rhiz-Azos	0.667 d	± 0.068

Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Es importante hacer notar que en la interacción de la planta de chayote con *Rhizobium* sp., la respuesta se presentó alrededor de los 22 dds, evidente en las variables de longitud de tallo (Figura 1) y número de entrenudos (Figura 2). Aun cuando no se obtiene una diferencia estadística significativa en estas dos variables evaluadas, se puede observar de forma clara, los resultados favorables de los tratamientos Rhiz y Rhiz-SE que superan a su testigo. Es recomendable realizar más pruebas que permita evaluar ampliamente los efectos de este género bacteriano sobre el crecimiento en la planta de chayote.

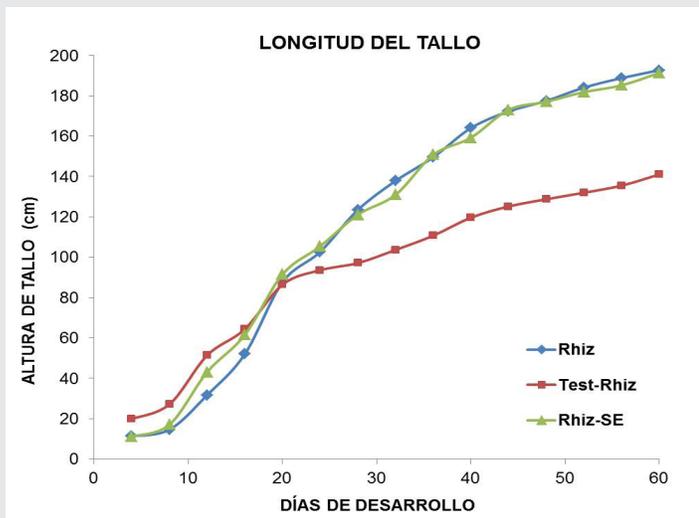


Figura 1. En la longitud del tallo la interacción *Rizobium*-planta de chayote durante los 60 días de desarrollo.

En la interacción planta de chayote con *Azospirillum* sp. la respuesta en las variables de longitud del tallo (Figura 3) y número de entrenudos fue alrededor de los 30 dds. A pesar de ello, este incremento no debe menospreciarse, ya que existen trabajos en maíz donde se ha reportado que *Azospirillum brasilense* puede fijar hasta un 72% de nitrógeno [30]. Por otro lado, el incremento en la concentración del inóculo de 108 y 109 UFC mL⁻¹ pueden mejorar la respuesta, tal como se ha usado en los cultivos de tomate [27], chile [29], maíz [41], sorgo [14] y arroz [1][18].

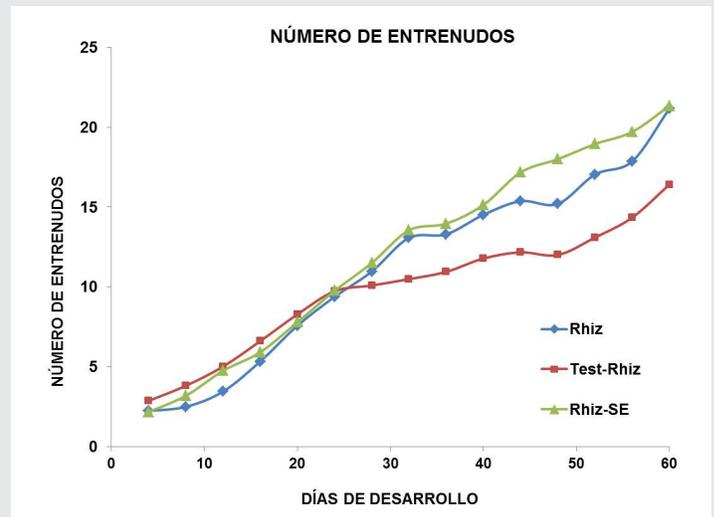


Figura 2. En el número de entrenudos la interacción *Rizobium*-planta de chayote durante los 60 dds.

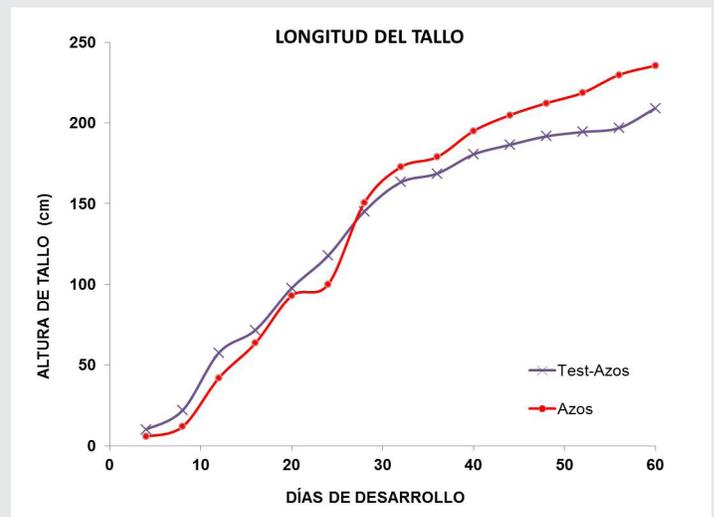


Figura 3. En la longitud del tallo la interacción *Azospirillum*-planta de chayote durante los 60 días de desarrollo.

La co-inoculación de bacterias de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. en la planta de chayote pueda funcionar con mayor eficiencia que si fueran inoculados por separado, tal como se han usado en otros cultivos [7][8][13][42].

Hasta hace algunos años, se había limitado el uso de bacterias de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. a cultivos de leguminosas y gramíneas respectivamente. Sin embargo, existen trabajos donde se ha evaluado la interacción de estos microorganismos en otros cultivos como chile habanero [11], tomate [27], crisantemo [25], chile jalapeño [29] y caña de azúcar con *Rhizobium etli* [17]; donde se reporta incrementos en la altura y diámetro del tallo, biomasa de planta y producción de ácido indolacético (AIA). Del mismo modo, estos resultados comprueban que su aplicación en la planta de chayote, pueden mejorar las condiciones de desarrollo.

CONCLUSIONES

La inoculación de bacterias de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. en la planta de chayote incrementa su crecimiento, y responde favorablemente a los procesos de promoción de crecimiento vegetal (PGPR) y fijación de biológica de nitrógeno (FBN).

La inoculación de *Azospirillum* en la planta, incrementa los valores en las variables de crecimiento (longitud y diámetro del tallo, número de entrenudos y hojas) superando a su testigo en rangos que van desde un 2-22%. Por otra parte, *Rhizobium* incrementó en más de un 33% la longitud del tallo y el número de entrenudos; y un 56% la concentración de NH_4^+ .

Se recomienda ampliar los trabajos, en los que se pueda optimizar la dosis y concentración de los inóculos bacterianos, validar estos resultados en campo, evaluar el desarrollo del cultivo y su costo-rendimiento, sin dejar fuera la posibilidad de evaluar y comparar otros géneros microbianos.

BIBLIOGRAFIA

[1] Acebo, Y., Rives, N., Heydrich, M. y Hernández, A. (2007). Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp. en el cultivo de arroz. *Cultivos Tropicales*, 28(3), 29-32.

[2] Aguirre, J. F. M., Irizar, M. B. G., Durán, A. P., Grágeda, O., Peña, M. D. L. Á., Loredó, C. O. y Gutiérrez, Á. B. (2009). Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. INIFAP. Chiapas, México.

[3] Ahemad, M. y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective, *Journal of King Saud University-Science*. King Saud University, 26(1), 1-20.

[4] Alarcón, A. y Ferrera, R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México*, 26, 191-203.

[5] Armenta, A. D. B., García, C., Camacho, R., Apodaca, M., Gerardo, L. y Nava, E. P. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.

[6] Baca, B. E., Soto, L. U. y Pardo, M. P. R. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 36, 43-49.

[7] Benintende, M. S. M., Uhrich, W., Herrera, M. y Gange, F. (2010). Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de nitrógeno en el cultivo de soja. *Agriscientia*, XXVII (2), 71-77.

[8] Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, Y. y Okon, Y. (1996). Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots

inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 3030-3033.

[9] Cadena, J. I., Ruíz, L. P., Aguirre, J. F. M. y Sánchez, P. G. (2005). Estudios de los síntomas asociados a la pérdida de color en chayote. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(2), 309-316.

[10] Camelo, M. R., Vera, S. P. V. y Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.

[11] Canto, M. J. C., Medina, S. P. y Morales, A. D. (2004). Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4, 21-27.

[12] Carranza, C. L. (2004). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Universidad de San Carlos Guatemala, p.132.

[13] Dardanelli, M. S., Fernández de C. F. J., Espuny, M. R., Rodríguez C. M., Soria D. M. E., Gil S. A. M., Okon, Y. y Megías, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2713-2721.

[14] Díaz, A., Gálvez, D. y Ortiz, F. E. (2015). Bioinoculación y fertilización química reducida asociada con el crecimiento de plantas y producción de sorgo. *Introducción a la Contaminación Ambiental*, 31(3), 245-252.

[15] Di-Barbaro, G., González, V. y Batallan, S. (2014). *Trichoderma* sp. y *Azospirillum* sp., potenciales agentes de biocontrol de fitopatógenos. *Biología en Agronomía*, 4(1), 177-189.

[16] Duxbury, J. M. (1994). The significance of agricultural sources of greenhouse gases. *Fertilizer research*, 38(2), 151-163.

[17] Ferrel, N. y Soriano, B. (2014). Efecto de *Rhizobium etli* en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*, 2(1).

[18] García, F., Muñoz, H., Carreño, C. y Mendoza, G. (2010). Characterization of native strains of *Azospirillum* spp. and its effect on growth of *Oryza sativa* L. "rice" in Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 107-116.

[19] García De Salomone, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 1-3.

- [20] Grágeda, O., Díaz, A., Peña, J. y Vera, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261-1274.
- [21] Helman, Y., Burdman, S., y Okon, Y. (2011). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In *beneficial microorganisms in multi-cellular life forms* Springer Berlin Heidelberg, 89-103.
- [22] Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvai, G., Vázquez, P., Toledo, G., Jiménez, M. B., Glick, B. R., González, L. D. B., Lebsky, V., Moreno, M. y Hernández, P. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizósfera. *Agricultura Técnica en México*, 29(2), 201-211.
- [23] Jiménez, J. A. (2015) Efecto de Rizobacterias sobre los caracteres morfológicos de la planta de tomate var. Río Grande. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*, p-89.
- [24] López, M. y Estrada, H. (2015). Propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Bioagrocencias*, 8(1), 3-11.
- [25] Mantilla, M. E. (2007) Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko-ono) en periodo de enraizamiento. *Pontificia Universidad Javeriana*, p-156.
- [26] Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- [27] Medina, N., Cuevas, F., Díaz, G. S. y Morejón, R. (2000). Efecto de la biofertilización de bacterias rizosféricas en el cultivo de tomate. *CITMA, Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente*, 2(2), 11.
- [28] Moreno, L., Pérez, A., Ramírez, M. y Franco, M. (2014). Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, (2013), 45-56.
- [29] Nuncio, G. L. (2013). Aislamiento y caracterización de *Azospirillum* sp. inoculado en cultivo de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. híbrido grande). *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*, p-113.
- [30] Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. *Pontificia Universidad Católica Argentina*, p-152.
- [31] Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Fernández S. A., De Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., Baldani, V. L. y Bonilla, R. R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos., *Revista Corpoica*, 11, 155-164.
- [32] Peña C. J. J., Grágeda C. O. A.; y Vera N. J. A.(2001). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: uso de las técnicas isotópicas (15N). *Terra* 20, 51-56
- [33] Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T. y Cesco, S. (2015). Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 87, 45-52.
- [34] Rivera, M. (2012). Formulación de un prototipo de biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. *Universidad Nacional de Colombia*.
- [35] Rives, N., Acebo, Y., Almaguer, M., García, J. C. y Hernández, A. (2009). Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (SACC) y fitoestimulación en el cultivo de arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (TREV), *Protección Vegetal*, 24(2), 106-116.
- [36] Rojas, J. y Moreno, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, X(2), 50-62.
- [37] Rueda, E. O., Ortega, J., Barrón, J. M., López, J. E., Bernardo, M. A., Hernández, L. G., Alvarado, A. G. y Valdez, R. D. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invurnus*, 10(1), 10-17.
- [38] SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/> (17 de mayo de 2016).
- [39] Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Libro *Fisiología Vegetal Vol-2. 3a edición*. USA: Publicaciones de la Universidad Jaume I, D.L.
- [40] Valenzuela, J. S., Julio, A., Crespo, L., Borbor, G. y Borbor, V. (2016). Efecto de la inoculación de bacterias nativas en dos híbridos de maíz (*Zea mays*) provincia de Santa Elena. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, III (2), 50-60.
- [41] Villa, L., Mayek, N., García O. J. G. y Hernández, J. L. (2014). Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de *Azospirillum* sp. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18.
- [42] Volpin, H., Burdman, S., Castro S., Kapulnik, S. Y. y Okon, Y. (1996). Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial nod-Gene inducers by alfalfa roots. *MPMI*, 9, 388-394.