

# Cambios morfológicos y bioquímicos por inoculación de Rizobacterias en la planta de chayote (*Shechium edules* Jacq Sw)



## Colaboración

Janelive Duarte Ortiz, CBTa No.85; Norma Anabeli Coria Gil, Universidad Veracruzana / Campus Peñuela; Alondra Yajaira Sánchez Camarillo; Armando Domínguez Cervantes CBTa No.85; María Alva Ángel Lara; Universidad Veracruzana / Campus Peñuela

Fecha de recepción: 31 de julio de 2021

Fecha de aceptación: 21 de febrero 2022

**RESUMEN:** El experimento se realizó en la ciudad de Córdoba, Veracruz; usando cepas nativas de *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp., inoculadas en semillas de chayote en cinco tratamientos: Rhiz (*Rhizobium* 107 UFC/mL); Test-Rhiz (caldo YMA sin inocular); Azos (*Azospirillum* 107 UFC/mL); Test-Azos (caldo NFB sin inocular) y Rhiz-Azos (*Rhizobium*-*Azospirillum*). Durante 90 días, se evaluó el área foliar (AF), velocidad de crecimiento (VC), contenido de biomasa; así como la concentración de  $\text{NH}_4^+$ , clorofila, ácido indolacético (AIA) y proteína.

Los resultados indican que *Rhizobium* incrementa el desarrollo radicular en 13%, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en 76% y de AIA en 115%. Por otro lado, la cepa de *Azospirillum* favorece el desarrollo foliar y el contenido de clorofila (15-70%). Cabe resaltar que la inoculación simultánea con estas dos bacterias, manifiesta un efecto sinérgico positivo en la planta de chayote. En virtud de los resultados, es factible la creación un biofertilizante con estas bacterias, para ser usado en el cultivo de chayote con beneficios sustentables.

**PALABRAS CLAVE:** AIA, *Azospirillum*, Biofertilizantes, Chayote, Clorofila, Crecimiento, NFB, PGPR, *Rhizobium*.

**ABSTRACT:** The experiment was carried out in the city of Córdoba, Veracruz; using native strains of *Rhizobium* sp. and *Azospirillum* sp., inoculated in chayote seeds in five treatments: Rhiz (*Rhizobium* 107 CFU/mL); Test-Rhiz (YMA broth without inoculation); Azos (*Azospirillum* 107 CFU/mL); Test-Azos (NFB broth without inoculation) and Rhiz-Azos (*Rhizobium*-*Azospirillum*). During 90 days, leaf area (AF), growth rate (VC), biomass content were evaluated; as well as the concentration of  $\text{NH}_4^+$ , chlorophyll, indoleacetic acid (IAA) and protein.

The results indicate that *Rhizobium* increases root development by 13%, the concentration of  $\text{NH}_4^+$  by 76% and IAA by 115%. On the other hand, the *Azospirillum* strain favors foliar development and chlorophyll content (15-70%). It should be noted that the simultaneous inoculation with these two bacteria shows a positive synergistic effect on the chayote plant. Based on the results, it is feasible to create a biofertilizer with these bacteria, to be used in chayote cultivation with sustainable benefits.

**KEYWORDS:** *Azospirillum*, biofertilizers, chayote, chlorophyll, growth, IAA, NFB, PGPR, *Rhizobium*.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente es de suma importancia identificar tecnologías que funcionen como una alternativa viable, dentro de un régimen sustentable y sostenible. Ya que algunas prácticas agrícolas comunes como el uso irracional de agroquímicos, han incrementado los problemas de salud, generan altos costos en la producción y el deterioro en los suelos.

En este sentido, los biofertilizantes o inoculantes microbianos se han descrito como preparados de microorganismos y consi-

derados como “biotecnologías apropiadas”; dado que, son capaces de contribuir al desarrollo sostenible de la agricultura. Además proveen beneficios tangibles a los productores puesto que pueden sustituir de forma parcial o total la fertilización sintética [2] [38]. México es un ejemplo del impacto positivo del uso de biofertilizantes en los años 70's y 80's [5].

En este contexto, los agentes microbianos usados para la creación de estas biotecnologías se clasifican de acuerdo a los beneficios que generan en los cultivos. Por un lado, están las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o también llamadas PGPR (por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Por otra parte, se encuentran las bacterias que fijan biológicamente el nitrógeno atmosférico, conocidas con las siglas FBN (Fixation Biology of Nitrogen).

Las PGPR al ser aplicadas a los cultivos, cuentan con mecanismos de acción muy variados, sus beneficios están relacionados con varios procesos fisiológicos y se clasifican en mecanismos directos e indirectos [3] [11] [32] [37] [38].

Los mecanismos directos: son aquellos procesos donde los metabolitos sintetizados por las bacterias son reguladores de crecimiento; por ejemplo, la producción de fitohormonas; o también, aquellos que intervienen directamente en la absorción de Nitrógeno y en la solubilización de nutrientes como el Cobre, el Hierro o el Fósforo [5] [6] [11] [33] [35] [44]. En cambio, los mecanismos indirectos: son aquellos que contribuyen en la inducción de la resistencia sistémica a fitopatógenos; como la producción de antibióticos [42], sideróforos [3], enzimas líticas como glucanasas y quitinasas [39], incluso son capaces de incrementar la tolerancia al estrés biótico y abiótico [3].

En consecuencia es factible su uso como parte primordial en la formulación de los biofertilizantes; no obstante, es importante elegir los microorganismos más adecuados con base en su capacidad para penetrar y establecerse en los tejidos vegetales.

En el grupo de las PGPR y NFB, destacan los microorganismos de los géneros *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Beijerinckia* sp. y *Klebsiella* sp., que son catalogados como organismos de vida libre [5] [3]; por otro lado, están los agentes microbianos que poseen la capacidad de formar relaciones asociativas o simbióticas con las plantas y generar la formación de nódulos radiculares. En este grupo destacan los géneros *Rhizobium* sp., *Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Actinomycetos* y *Frankia* sp. [10]. En este contexto, se ha comprobado que su efectividad en campo se incrementa al usar cepas nativas, por estar adaptadas a las condiciones del suelo de cada región [5].

De forma muy particular, la inoculación en los cultivos con las bacterias del género *Azospirillum* sp., incremen-

tan la masa radicular, que origina una mayor superficie de contacto con el suelo y en consecuencia, favorece la absorción de agua y nutrientes [30] [31] [34]. Estos efectos son dependientes de la concentración del inóculo y cantidad de ácido indolacético (AIA) secretadas por *Azospirillum* sp. [30]. También, son capaces de fijar de 20-60 kg de N/ha/año [24]. Como ejemplo, se reporta los efectos de *Azospirillum* en los cultivos de soya [8], arroz [1] [14] [20], chile jalapeño [48] y cebolla [49], donde destacan los incrementos en la acumulación de nitrógeno. Adicionalmente, en tomate [36], café [40], maíz [50], cilantro [7], chile habanero [12] y sorgo [16], se han reportado incrementos significativo en la altura y diámetro del tallo, el peso fresco y seco tanto foliar como radicular; de igual manera, hay reportes donde se asegura que incrementa la concentración de ácido indol acético [1] [20] [29] y el rendimiento en la producción de los cultivos como pepino [47], café [40] y cilantro [7].

De manera similar, las bacterias del género *Rhizobium* sp. son capaces de fijar de 100-200 kg de Nitrógeno por ha/año [24]. Posee una predilección por los cultivos leguminosos como frijol [15] [19] y soya [13]; sin embargo, se ha comprobado sus efectos favorables en otros cultivos no leguminosos, por ejemplo, pimiento [46], caña de azúcar [18], tomate [41], maíz [45], encino [22], cebada [42] y lechuga [33]. En estos reportan incrementos en la concentración de ácido indol acético o AIA, en la altura de la planta, y en la cantidad de biomasa (peso fresco y seco).

Con relación a la inoculación conjunta de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* se ha demostrado que induce sinérgicamente los genes nod [51] activadores de la secreción de flavonoides en la raíz, que a su vez, promueven la nodulación y la fijación de nitrógeno [28], tanto en leguminosas y no leguminosas [8] [9] [15] [44].

En otro aspecto, cabe destacar la importancia del cultivo de chayote, cuya producción debe ser constante al ser considerada como una de las hortalizas de mayor consumo por sus características nutritivas [21]; además, del impacto que tendrá el experimento, sabiendo que tan solo en el año 2019 en México se sembraron y cosecharon alrededor de 2967 hectáreas del este cultivo, con una producción superior a las 195 mil toneladas y un valor comercial superior a los 791,595 millones de pesos. Particularmente, el Estado de Veracruz es el máximo productor, posee las condiciones agroclimatológicas propicias para el cultivo de éste fruto, de forma tal que representa el 85% del total de la producción nacional [43].

Por todo lo anterior, este trabajo tiene la finalidad de evaluar los efectos bioquímicos y fisiológicos de biofertilizantes microbianos en el crecimiento del cultivo de la planta de chayote, al inocular cepas nativas de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. en su la raíz.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el invernadero y laboratorio de Investigación Bioquímica y Fisiología Vegetal 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 los meses de enero a julio del 2016.

Las cepas bacterianas nativas se recolectaron, aislaron e identificaron con base a las características morfológicas, bioquímicas y tinción de Gram comunes para cada género. Para el proceso de obtención del biofertilizante, las cepas nativas en cultivo axénico de los géneros *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp., se sembraron en caldo extracto de levadura Manitol (caldo YMA) y caldo libre de Nitrógeno con azul de bromotimol (caldo NFB), respectivamente [17].

Aplicando un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos descritos como **Rhiz** (*Rhizobium* sp. 107 UFC / mL en caldo YMA); **Test-Rhiz** (Testigo caldo YMA sin inocular); **Azos** (*Azospirillum* sp. 107 UFC / mL en caldo NFB); **Test-Azos** (Testigo caldo NFB sin inocular) y **Rhiz-Azos** (*Rhizobium* sp. – *Azospirillum* sp.),

Las semillas de chayote verde liso con 35 días después de anthesis, se recolectaron en el mes de enero de 2016, en el municipio de Coscomatepec de Bravo, Veracruz, México (19°01'12" LN y 97°01'47" LW). Se pesaron y midieron, obteniendo un promedio en sus dimensiones de 17±1.0 cm de largo, 12±0.5 cm de ancho, con peso de 415 g. Posteriormente en el laboratorio, se lavaron y desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se enjuagaron con abundante agua destilada. Previo a la siembra, las semillas fueron inoculadas, por inmersión en un volumen de 10 mL del biofertilizante, preparado de acuerdo con las especificaciones de cada tratamiento. Para las semillas del tratamiento Rhiz-Azos, se usó una mezcla constituida por 5 mL de caldo YMA con 107 UFC / mL de *Rhizobium* sp. y 5 mL de caldo NFB 107 UFC / mL de *Azospirillum* sp. Las semillas de los controles Test-Rhiz y Test-Azos, se aplicó 10 mL del caldo YMA y caldo NFB respectiva y completamente libres de crecimiento bacteriano. Luego entonces, las semillas fueron sembradas en bolsas de polietileno (30 cm ancho x 45 cm largo) con 7 Kg de suelo, que se colocaron dentro del invernadero con base al arreglo experimental.

Durante este periodo se omitió cualquier tipo de fertilización y para el riego se usó agua purificada que se aplicó homogéneamente. Se le dio seguimiento al experimento durante 90 días después de la siembra (dds), se registraron los datos de las diferentes mediciones en cada una de las variables de estudio. Dentro de este tiempo se evaluó la expansión foliar (EF) y velocidad de crecimiento (VC); al término de éste periodo, se cuantificó la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), clorofila,

compuestos indólicos del tipo ácido indolacético (AIA) y proteína; finalmente, las mediciones destructivas del peso fresco (PF), peso seco (PS), contenido de materia orgánica y cenizas.

### Acumulación de Biomasa

Para determinar el peso fresco (PF), se pesaron las plantas, se sometieron a un tratamiento a 60°C durante dos semanas o hasta que el peso seco (PS) fue constante. De este material, se tomaron 10 g de raíz, hoja y tallo y se dejaron dentro de una mufla por 5 horas a 600°C, se determinó su peso para expresarlo como porcentaje de cenizas.

### Expansión foliar y velocidad de crecimiento

En el periodo comprendido entre 54-64 dds se realizó esta medición. Las hojas seleccionadas en cada una de las plantas de los cinco tratamientos se marcaron y fueron medidas durante 10 días consecutivos y en las primeras horas de la mañana. Se usó el método indirecto de calcado, por lo que, se dibujó diariamente el contorno de las hojas pequeñas hasta su crecimiento máximo; el calcado obtenido de cada hoja se cortó y se pesó. Para obtener el área foliar se usó una curva estándar, en la que se pesaron cuadros de diferentes áreas; 1, 2, 4, 8, 10 y 12 cm<sup>2</sup> de papel del mismo tipo que fue usado en el proceso del calcado. Una vez obtenidas las mediciones y realizados los cálculos correspondientes, se graficaron las medias en cada una de las variables.

### Cuantificación de Nitrógeno amoniacal

La concentración de Nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) foliar, se cuantificó mediante el método colorimétrico con el reactivo de Nessler (100 g de  $\text{HgI}_2$  y 70 g de KI en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; esta solución se mezcló con 160 g de NaOH en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada fría; y se aforó a 1 L). Se maceraron 0.2 g de hoja con 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, posteriormente se centrifugó, se tomó 1 mL de sobrenadante se le agregó 0.5 mL del reactivo de Nessler y se dejó reposar por 20 minutos. Para tomar la lectura, se empleó un espectrofotómetro marca Quant 1300 GE a  $\lambda=630$  nm; la concentración se calculó mediante una curva de calibración, con un rango de concentración de 5 - 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

### Cuantificación de compuestos indólicos

Se determinó la concentración de los compuestos indólicos del tipo ácido indolacético (AIA), con el reactivo de Salkowski (60 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.45 g  $\text{FeCl}_3$ ; aforó a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) [1] [23] [27]. Para ello, se tomaron 0.4 gr de hoja y se maceraron en un mortero con 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se llevó a centrifugó y del sobrenadante se tomó 1 mL al que se le agregó 1 mL del reactivo de Salkowski, se mezcló e incubó en obscuridad por 20 minutos y posteriormente se midió la absorbencia con una  $\lambda=535$  nm. La concentración de AIA se calculó mediante una curva de calibración, con un rango de concentración de 5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIA (marca SIGMA) y los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  por g de tejido foliar.

## Cuantificación de clorofila

Para la cuantificación de clorofila, se maceró 0.1 g de tejido con 1 mL de acetona; se tomaron 0.1 mL y se agregó a 1.9 mL de acetona. Se incubó durante 10 minutos, se midió la absorbencia a una  $\lambda=663$  y  $645$  nm. La concentración se calculó con base al coeficiente de extinción, técnica propuesta por Lichtenholer (1987).

## Cuantificación de proteína foliar y radicular

Se determinó la concentración de proteína radicular y foliar mediante el método colorimétrico de Bradford (Reactivo de Bradford Azul de Coomassie G-250 5 mg; Etanol 2.5 mL, Ac. fosfórico 5 mL, se aforó a 50 mL con agua destilada). Finalmente se añadió 1 mL del reactivo de Bradford a todos los tubos; se agitaron y llevó a lectura en el espectrofotómetro a  $\lambda=595$  nm, la concentración se calculó con base en una curva de calibración con albumina.

## RESULTADOS

Las plantas de chayote se desarrollaron sin problemas de plagas, se regaron en forma homogénea suficiente y libre de fertilizantes. Los resultados obtenidos en las variables de estudio fueron analizados estadísticamente por Anova, con índice de confianza (IC) del 95% y un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , con agrupación de medias mediante el método de Games-Howell y una Prueba de Welch, en caso de existir diferencia significativa se aplicó la prueba de Tukey al 5%, mediante el paquete Minitab® 17.1.0, (2013).

En la acumulación de biomasa radicular, no se presentó una diferencia estadística significativa; sin embargo, la inoculación con bacterias del género *Rhizobium* sp. en las plantas de chayote a los 60 días después de su siembra, incrementó la masa radicular en un rango del 6 - 13% (Cuadro 1). Mientras que en las plantas con *Azospirillum* las medias obtenidas quedaron por debajo del testigo. Por otra parte, no se observó cambio en las variables de la biomasa foliar; solo sobresalen los valores obtenidos en el % de cenizas, donde ambas bacterias provocaron un incremento del 104% en las plantas con *Rhizobium* y un 35% con *Azospirillum*.

Cuadro 1. Acumulación de biomasa radicular en el peso fresco (PFr), peso seco (PSr) y porcentaje de materia orgánica

Tratamientos	PFr (g)	PSr (g)	% Materia Orgánica
<b>Rhiz</b>	91.5 a	10.8 a	10.6 a
<b>Test-Rhiz</b>	86.5 a	9.7 a	9.4 a
<b>Rhi-Azo</b>	112.0 a	11.6 a	11.2 a
<b>Azos</b>	60.7 a	8.46 a	8.3 a
<b>Test-Azos</b>	95.8 a	11.7 a	11.4 a
<b>p<math>\geq</math>0.05</b>	0.133	0.828	0.811
<b>Valor F</b>	4.9	0.39	0.42

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

## Expansión foliar y velocidad de crecimiento

Los datos obtenidos de expansión foliar no presentaron una diferencia estadística significativa; sin embargo, se puede comprobar que la presencia de las bacterias en la plantas de chayote favorece esta variable, destacando el tratamiento Rhi-Azos (Figura 1) que presenta la mayor acumulación en los días 8, 9 y 10 de la medición.

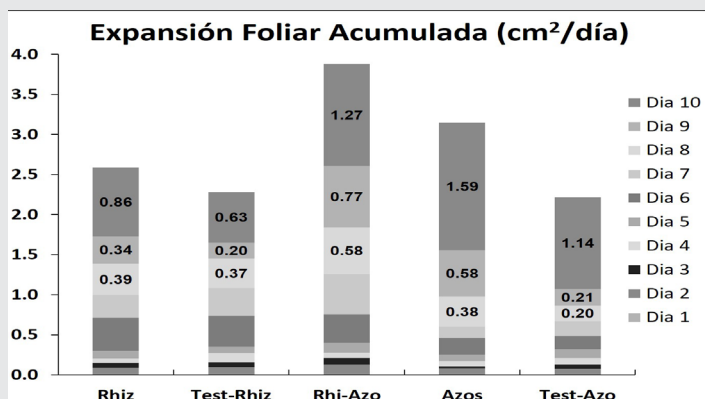


Figura 1. Expansión foliar acumulada durante los 10 días dentro del periodo comprendido entre 54-64 dds.

El análisis estadístico y las medias obtenidas de cada tratamiento en los resultados cuantificados durante los 10 días en la variable de velocidad de crecimiento se graficaron en la Figura 2, donde el tratamiento Rhi-Azos mostró la mayor velocidad en el crecimiento.

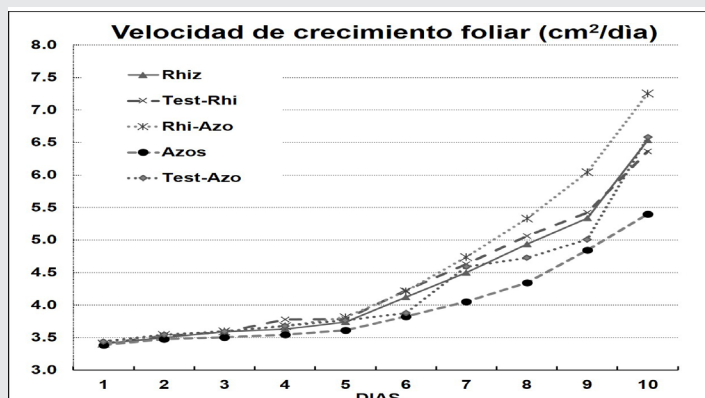


Figura 2. Velocidad de crecimiento en la planta de chayote en los distintos tratamientos.

## Nitrógeno amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), compuestos indólicos del tipo AIA, clorofila y proteína.

A los 70 días después de la siembra, se cuantificaron las variables bioquímicas, que incluyó la concentración de amoníaco foliar, indoles del tipo AIA, clorofila, así como proteína foliar y radicular.

La inoculación de bacterias del género *Rhizobium* sp. en la planta de chayote, incrementó significativamente la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en un 76% y la concentración de AIA en un 115% (Cuadro 2). De igual forma, cabe destacar los efectos del tratamiento Rhi-Azo, ya que a pesar de que no fue significativa la diferencia es favorable para la planta y en el caso de AIA fue de 109% contra Test-Rhiz.

Cuadro 2. Análisis de varianza de las medias obtenidas en las variables NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y AIA

Tratamientos	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		AIA	
	μg . g hoja		μg . g hoja	
Rhiz	2.33	±0.15 a	105.6	±10.7 a
Test-Rhiz	1.31	±0.21 b	48.7	±5.9 b
Rhi-Azo	0.67	±0.07 c	101.9	±23.6 a
Azos	0.39	±0.05 c	99.9	±4.6 a
Test-Azos	0.59	±0.21 c	89.9	±2.2 ab
<b>p≥0.05</b>	0.000 *		0.002 *	
<b>Valor F</b>	102.67		7.94	

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

Con relación a la cuantificación de clorofila, el análisis estadístico de los resultados no arrojó una diferencia significativa; no obstante, fue claro el efecto favorable por ambas bacterias en la planta de chayote; sobresale el tratamiento Azo que incrementó en un 48% el contenido de clorofila total, en un 70% la clorofila a y un 15% en la clorofila b; en este mismo contexto, cabe resaltar el tratamiento Rhi-Azo cuyas medias en esta variable fueron las más altas comparada con los otros cuatro tratamientos (Figura 3).

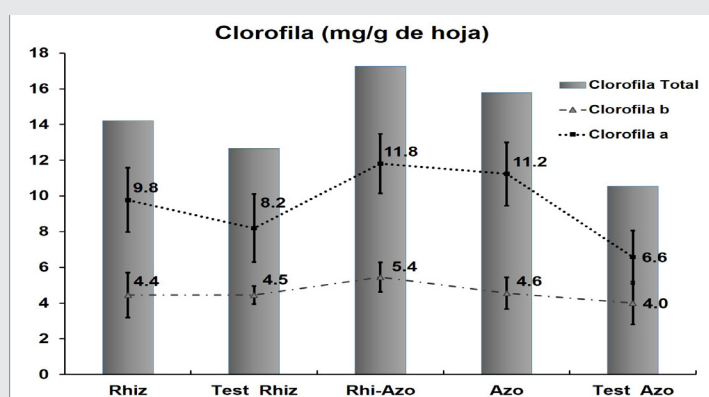


Figura 3. Análisis de varianza de las medias obtenidas en la variable de Clorofila a y b.

Los resultados en la cuantificación de la proteína foliar no mostraron diferencia estadística significativa de los tratamientos con sus respectivos testigos; no obstante, se observó que los tratamientos inoculados con una o ambas bacterias redujeron su contenido proteico en un 34% con Rhizobium y 56% con Azospirillum, En la cuantificación de proteína radicular, las medias obtenidas para cada tratamiento no presentaron diferencia estadística significativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de las medias obtenidas en la variable de proteína foliar y radicular.

Tratamientos	Proteína		Proteína	
	mg . g Hoja		mg . g Raíz	
Rhiz	3.9	±0.89 b	4.7	±0.44 a
Test-Rhiz	14.4	±0.73 ab	4.6	±0.78 a
Rhi-Azo	17.9	±3.37 ab	4.7	±0.71 a
Azos	13.3	±2.81 ab	4.9	±0.37 a
Test-Azos	23.5	±8.19 a	5.9	±0.60 a
<b>p≥0.05</b>	0.004*		0.002*	
<b>Valor F</b>	6.40		5.52	

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

CONCLUSIONES

Con este trabajo se comprueba que la inoculación de bacterias de los géneros Rhizobium sp y Azospirillum sp. son capaces de infectar la planta de chayote y producir efectos positivos en la acumulación de biomasa y en la concentración de metabolitos.

De modo semejante, a lo reportado en otros trabajos con PGPR, se confirma la eficacia de estos géneros bacterianos en la planta de chayote, con un incremento en el crecimiento radicular, en la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y en el ácido indolacético, cuyos valores fueron los más altos en las plantas de los tratamientos con Rhizobium sp. A su vez, Azospirillum sp. induce el incremento en la concentración de clorofila y la masa foliar.

En este contexto, es claro que no existe un antagonismo entre estos dos géneros bacterianos, que son capaces de interactuar con la planta de chayote e involucran diferentes procesos bioquímicos. De ello, resulta conveniente admitir que la aplicación conjunta de estos microorganismos puede generar mejores resultados; puesto que, las medias más altas obtenidas en las diferentes variables, corresponde en su mayoría al tratamiento Rhi-Azo; pese a que la densidad bacteriana y el volumen del biofertilizante usado en los procesos de inoculación para este tratamiento previo a la siembra fueron reducidos al 50%; es decir, un volumen de 1:1. En tal caso, este punto puede ser de suma importancia en la reducción de costos dentro de los procesos de producción y aplicación del biofertilizante en este cultivo.

Se sugiere profundizar en los estudios que pudieran especificar los procesos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la planta de chayote, además de considerar su evaluación durante el ciclo completo del cultivo en campo.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

[4].Alarcón, A., Ferrera, R. (2000) Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. Agricultura Técnica en México, 26(2), pp. 191-203.

- [5].Armenta, A. D. B., García, C., Camacho, R., Apodaca, M., Gerardo, L., Nava, E. P. (2010) Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), pp. 51-56.
- [6].Ashraf, M. A., Muhammad, A., Ahmad, Z., Arif, M., Qasim, A., Mahmood, R. (2013) Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: a review. *African journal of microbiology research*, 7(9), pp. 704-709.
- [7].Becerra, K. C., Colmenares, A., Ramírez, L., Moreno, L., Cárdenas, D. (2015) Inoculación de Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) con Rizobacterias en Villa del Rosario, Norte de Santander. *Rev. Facultad. Nal. Agrícola. Medellín*, 68(12), pp. 7459-7470.
- [8].Benintende, M. S. M., Urich, W., Herrera, M., Gangge, F. (2010) Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja, *Agriscientia*, xxvii (2), pp. 71-77.
- [9].Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, 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), pp. 3030-3033.
- [10].Calvo, S. (2011) 'Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno', *Cultivos Tropicales*, 3, pp. 173-186.
- [11].Camelo, M. R., Vera, S. P. V., Bonilla, R. R. (2011) Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), pp. 159-166.
- [12].Canto, M. J. C., Medina, S. P., Morales, A. D. (2004) Efecto de la inoculación con *azospirillum* sp. en plantas de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4, pp. 21-27.
- [13]. Catuto, A. (2013) Efecto de la inoculación de *Rhizobium* en el crecimiento y nutrición de plántula soya, en la zona de Manglaralto, Cantón Santa Elena. *Universidad Estatal Península de Santa Elena*.
- [14].Curá, A. J., Ribaudó, M. C., Gaetano, M. A. and Ghiglione, O. H. (2005) Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. *Biología aplicada y alimentos, Argentina*, pp. 10-12.
- [15].Dardanelli, M. S., Fernández de Córdoba, F. J., Espuny, M. R., Rodríguez Carvajal, M. a., Soria Díaz, M. E., Gil Serrano, A. M., Okon, 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), pp. 2713-2721.
- [16].Díaz, F. A., Gálvez, L. D., Ortiz, C. F. E. (2015) Bioinoculación y fertilización química reducida asociadas con el crecimiento de planta y productividad de sorgo. *Revista internacional de contaminación ambiental. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM*, 31(3), pp. 245-252.
- [17].Duarte, J., (2016). "Efecto de biofertilizantes en el cultivo de chayote (*Sechium edule* Jacq)." *Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias - U.V.*
- [18].Ferrel, N., 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).
- [19].García, D. C. (2015) Validación de un bioinoculante a base de bacterias diazotróficas en el crecimiento, desarrollo y rendimiento agrícola de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Universidad Nacional de Loja*.
- [20].García, F., Muñoz, H., Carreño, C., 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, pp. 107-116.
- [21].Guevara, F., Rodríguez, L., Rosales, M. D. L. Á., Ortiz, R., Gómez C., H., Aguilar J., C. E., Pinto R., R. (2014) Criterios de manejo local del cultivo de chayote (*Sechium edule* Jacq.Sw) en zonas rurales de Chiapas, México. *Cultivos Tropicales*, 35(2), pp. 5-13.
- [22].Hernández, E. (2014) Efecto de *Rhizobium* spp. y *Boletus frostii* en el crecimiento de plántula de *Quercus resinosa*. *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*.
- [23].Hernández, I., Nápoles, M. C., Morales, B. (2015) Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*. 36(1), pp. 65-72.
- [24].Hernández, M., Pereira, M., Tang, M. (1994) Utilización de los microorganismos biofertilizantes en los cultivos tropicales. *Pastos y Forrajes*, 17(3).
- [25].Irizar, M. B. G., Vargas, P. V., Garza, D. G., Tut y Couoh, C., Rojas Martínez, I., Trujillo Campos, A., García Silva, R., Aguirre Montoya, D., Martínez Gon-

- zález, J., Alvarado Mendoza, S., Grageda, O., Valero Garza, J., Aguirre, J. F. M. (2003) Respuestas de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agricultura Técnica en México*, 29(2), pp. 213-225.
- [26].Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- [27].Morgado, A. (2013) Eficiencia de la rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en plántulas de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Colegio de Postgraduados*.
- [28].Nápoles, M., Cabrera, J. C. P., Onderwater, R., Wattiez, R., Forte, I. H., González, L. M., Vázquez, N. (2016). Signals produced by *Rhizobium leguminosarum* in the interaction with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), pp. 37-44.
- [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*.
- [30].Okon, Y., Labandera, C., Lage, M., Lage, P. (2015). Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. *Biological nitrogen fixation*, 2, pp. 921-931.
- [31].Paredes, M. C. (2013) Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. *Pontificia Universidad Católica Argentina*.
- [32].Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. S., Fernández, A., Salamone, I. G., De Baca, B. E., Azcón, R. (2010) Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica Ciencia Tecnología. Agropecuaria*, 11(2), pp. 155-164.
- [33].Peña, H. B., Reyes, I. (2007) Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32(8), pp. 560-565.
- [34].Pérez, Y. de la F., Díaz, A., Restrepo, G. M., Diván, V. L., Hernández, A. (2015) Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1), pp. 17-26.
- [35].Rodríguez, A. (2015) Efecto de *Rhizobacterias Azotobacter*, *Acetobacter* y *Azospirillum sp.* sobre plántulas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *UAA A. Narro*.
- [36].Rodríguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4), 319-339.
- [37].Rojas, J., 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), pp. 50-62.
- [38].Rueda, E. O., Ortega, J., Barrón, J. M., López, J. E., Bernardo, M. A., Hernández, L. G., Alvarado, A. G., Valdez, R. D. (2015) Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invurnus*, 10(1), pp. 10-17.
- [39].Samaniego, B. Y., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O. A., Tun-Suárez, J. M. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus spp.* *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 10-22.
- [40].Santana, X. (2014) Efectos de la aplicación de MFN complementarios a la fertilización química en una plantación de café variedad caturra rojo en la zona de Babahoyo. *Universidad Técnica de Babahoyo*.
- [41].Santillana, N., Arellano, C., Zúñiga, D. (2005) Capacidad del *Rhizobium* del promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4(1), pp. 47-51.
- [42].Santillana, N., Zúñiga, D., Arellano, C. (2012) Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia Uruguay*, 16(2), pp. 11-17.
- [43].SIAP. 2021 <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- [44].Spaepen, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2009) Chapter 7 Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*, 51, pp. 283-320.
- [45].Valenzuela, J. S., Julio, A., Crespo, L., Borbor, G., Borbor, V. (2016) Efecto de la inoculación de bacterias nativas en dos híbridos de maíz (*Zea mays* L.), provincia de Santa Elena. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, III(2), pp. 50-60.
- [46].Vazallo, S. N., Ramírez, L. T., Carranza, L. T., Zárate, B., Soriano, B. (2013) Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annuum* var. *longum*. *REBIOLEST*, 1(1), pp. 11-21.

[47].Vázquez, E., Lira, R., Valdéz, L. A., Cárdenas, A., Ibarra, L. (2014) *Respuesta del pepino a la fertilización biológica y mineral con y sin acolchado*. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*. 10, p. 12.

[48].Vega, A. M. (2015) *Efecto en la absorción de minerales N, P, K en chile jalapeño (Capsicum annum L.) inoculado con Azospirillum en invernadero*. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.

[49].Velasco, L. (2015) *Azospirillum aumenta la concentración de nitratos en la solución del suelo y el crecimiento del cultivo de cebolla de rabo*. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*.

[50].Villa, L., Mayek, N., García, J. G., Hernández, J. L. (2014) *Efecto de la inoculación en maíz con cepas nativas de Azospirillum sp.* *Avances en Investigación Agropecuaria*. 18(February).

[51].Volpin, H., Burdman, S., Castro-Sowinski, S., Kapulnik, Y., Okon, Y. (1996) *Inoculation with azospirillum increased exudation of rhizobial nod-Gene inducers by alfalfa roots*, *MPMI*, 9, pp. 388-394.