

Efecto de la biofertilización con *Azospirillum* en el crecimiento y producción de Jitomate

ESQUIVEL-COTE, Rosalba, URZÚA-HERNÁNDEZ, María del Carmen y RAMÍREZ-GAMA, Rosa María

R. Esquivel, M. Urzúa y R. Ramírez

Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510
rosesquivel_cote@hotmail.com

E. Figueroa, L. Godínez, F. Pérez (eds.) Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2015.

Abstract

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is a worldwide edible vegetable whose cultivation demands agricultural inputs such as fertilization, resulting in high economic and ecological costs. Alternate agricultural practices like biofertilization, are proposed for diminishing production costs in accordance to sustainable agriculture. This research evaluated the effects of *Azospirillum* strains (Cd, C4, VS1, VS7, or VS9) as biofertilizers on growth and production of tomato plants, by setting three experimental stages. First experiment was conducted under hydroponic conditions in which plants were inoculated with the *Azospirillum* strains (Cd, C4, VS1, VS7, and VS9) in a randomly experimental design, during 190 days. The five strains significantly increased root length and stem diameter. Experiment 2 considered treatments, parameters and duration as described for experiment 1, but established at greenhouse conditions using pots with soil. Strain VS9 significantly promoted plant growth in comparison to the remaining treatments. Third experiment conducted in the field, compared the nitrogen fertilization (100 %) with the inoculation of the strains Cd, VS1, and VS9 combined with 50% of such fertilization on production of tomato plants. Experiment was set in a randomized block experimental design including four treatments with ten replicates. Strain VS9 significantly enhanced in 28% the fruit yield when compared to non-inoculated plants.

5 Introducción

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una hortalizas de consumo mundial, su cultivo genera divisas para numerosos países que lo cultivan y lo exportan. En México, el cultivo y producción de jitomate se extiende a un gran número de estados. Se estima que para el año agrícola 2008 abarcó a un total de 27 entidades federativas, de las cuales sólo siete estados concentraron más del 60% de la producción, tanto de superficie cosechada como sembrada. El método de cultivo predominante en todo el país es el almácigo. En 2012 se obtuvo un rendimiento total de 51.38 ton/ha, lo cual generó un valor de producción de 13,146,384.85 miles de pesos (SIAP-SAGARPA, 2012). El jitomate requiere de elevadas dosis de fertilizantes durante todo el ciclo del cultivo, así como de otros agroquímicos. El abuso de este tipo de productos ha generado un alto costo económico y ecológico; por ejemplo, el remanente del nitrógeno aplicado con los fertilizantes químicos nitrogenados, es perdido por volatilización a la atmósfera o por lixiviación a través de suelo hasta aguas subterráneas, donde los nitratos son transformados a nitritos y posteriormente a nitrosaminas (compuestos carcinogénicos) (Ward, 2009). Ante esta situación, urge emplear prácticas agrícolas que permitan disminuir la cantidad de fertilizante químico nitrogenado, como la biofertilización, que disminuyan el costo de producción y que sean acordes con la agricultura sostenible.

Los biofertilizantes son formulaciones de microorganismos benéficos para la planta, usados como sustitutos parciales o completos de la fertilización química (Bashan, 1998; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000), y son considerados como un requerimiento indispensable de la agricultura sostenible. El éxito de los biofertilizantes depende en gran medida del uso de cepas debidamente seleccionadas y de soportes que aseguren la viabilidad de los microorganismos. La interacción microorganismo-planta ha sido estudiada ampliamente en leguminosas y gramíneas; sin embargo, en hortalizas las investigaciones son más restringidas, principalmente en cultivos en campo.

Uno de los géneros bacterianos más empleado como biofertilizante es *Azospirillum*, una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, capaz de afectar el desarrollo y el rendimiento de numerosas especies de plantas de importancia agronómica y ecológica (Bashan et al., 2004).

Se ha demostrado que la inoculación con *Azospirillum brasilense* a escala comercial, ofrece un aumento significativo en la producción de gramíneas, sin el costo económico y ecológico desfavorable que ocasionan los fertilizantes químicos. No obstante, el efecto de la biofertilización con esta bacteria, varía de acuerdo con el tipo de cepa bacteriana y del vegetal en prueba, así como las condiciones ambientales y prácticas de cultivo. Las investigaciones *Azospirillum*-jitomate se restringen principalmente a nivel de plántula, donde se reporta que la inoculación con *Azospirillum* estimula la germinación de las semillas (Digat, 1988), aumenta la longitud, peso y volumen de la raíz, y peso de la parte aérea (Bashan, 1986). Así mismo, se ha demostrado que cepas aisladas de diversos cultivos colonizan eficientemente y producen efectos significativos en el crecimiento de jitomate. Algunas cepas presentan mayor afinidad con el cultivo; lo que se atribuye al genotipo de la planta y a la cepa (Bashan y Levanony, 1990; Romero et al., 2003). De acuerdo a los antecedentes, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *Azospirillum* como biofertilizante, en el crecimiento y producción de plantas de jitomate en tres sistemas de cultivo.

5.1 Materiales y métodos

Cepas de *Azospirillum*

Se emplearon la cepa C4, de *A. brasilense*, aislada de raíces de trigo (*Triticum aestivum*); VS7 y VS9, de *A. brasilense*, aisladas de sorgo (*Shorgum bicolor*); VS1, de *A. lipoferum*, aislada de sorgo (*Shorgum bicolor*), todas pertenecientes a la colección del Cepario del Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM. El efecto se comparó con la cepa de referencia Cd, de *A. brasilense*, donada por el Dr Yaacov Okon (The Hebrew University of Jerusalem, Israel). Las cepas se activaron en medio de cultivo NFb-ss (semisólido) (Döbereiner et al., 1976). Y se propagaron en medio de cultivo NFb-l (líquido). Los inóculos se ajustaron a una concentración de 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro de medio de cultivo (UFC/ml).

Pruebas para verificar la colonización bacteriana en raíces

Las raíces se separaron de las plantas, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de sustrato, y se cortaron en fragmentos de 5 cm, los cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (5%) por 3 min. Se lavaron ocho veces con agua destilada estéril. Fragmentos de 1 cm se inocularon en tubos de ensaye (16x150) con medio de cultivo NFb-ss, y se incubaron a 34°C, por 3-5 días.

Solución nutritiva

En los experimentos 1 y 3 (E1 y E3, respectivamente) se empleó como fertilizante químico, la solución nutritiva recomendada por Hazera Quality Seeds (Hazera Seeds, Inc. (FL, EU)), cuya formulación es la siguiente: (mg L^{-1}): KNO_3 , 50; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 950; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50; H_2PO_4 , 100; K_2SO_4 , 500; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 800; FeSO_4 , 15; MnSO_4 , 3; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 5; CuSO_4 , 0.5; ZnSO_4 , 0.5; pH 6.0 ± 0.2 . La solución se modificó para reducir 50% la cantidad de nitrógeno (N). La solución nutritiva preparada con el 100% de N, proporciona 340 kg N/ha, y el 50%, 170 kg N/ha. En el experimento E1 la solución nutritiva fue esterilizada (20 min, a 1.1 kg/cm^2 a 120°C) previamente.

Experimento 1 (E1). Cultivo hidropónico

Invernadero, unidades experimentales, fertilización y riego

El experimento se llevó a cabo en un invernadero rústico con cubierta plástica, a 30/18°C (día/noche) y 70% de humedad relativa. Se emplearon macetas de plástico de 12 l de capacidad, desinfectadas con etanol (70%). El sustrato (agrolita estéril, pH 7.0) se humedeció con agua destilada estéril 24 horas previo a la siembra. El riego se mantuvo con sólo agua destilada estéril durante los primeros siete días. A partir del décimo día, después de la siembra (DDS), se aplicó solución nutritiva 50% N, y a los 30 días DDS solución nutritiva 100% N. En cada caso, el riego se aplicó cada 3 o 4 días, alternando con agua destilada estéril.

Siembra e inoculación de semillas.

Las semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bola (Cobo^{MR}), se lavaron diez veces con agua destilada estéril para eliminar la cubierta de funguicida. Las semillas se escurrieron perfectamente y se sumergieron en 10 ml del inóculo bacteriano respectivo, por una hora a temperatura ambiente. El tratamiento testigo consistió en usar el medio de cultivo estéril. Se sembraron cinco semillas por maceta, y cinco macetas por tratamiento. A los 35 DDS, se realizó un aclareo donde se eliminaron tres plántulas de cada maceta, las cuales se emplearon para confirmar la colonización bacteriana en las raíces. Las dos plantas restantes fueron podadas y tutoradas a los 60 y 70 DDS, respectivamente.

Variables de respuesta.

A los 190 DDS se determinaron la longitud y peso de la raíz, altura de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y seco de la parte aérea, y área foliar.

Experimento 2 (E2). Cultivo en macetas con suelo

Invernadero, unidades experimentales, fertilización y riego

El experimento se realizó en el invernadero descrito para el experimento E1. Se emplearon macetas de plástico de 12 l de capacidad, con suelo no estéril como sustrato (materia orgánica, 3.0%; CICT 42.4 meq/100g suelo; nitrógeno total, 0.018%; fósforo total 0.03%; pH 7.5; textura migajón arenosa), el cual se fertilizó y humedeció con agua destilada 24 horas previo a la siembra. Se aplicaron 180 kg/ha de sulfato de amonio, 250 kg/ha de sulfato de potasa y 250 kg/ha de superfosfato triple.

Siembra, inoculación de semillas y variables de respuesta

Las semillas, las condiciones de inoculación, siembra y variables de respuesta para el experimento E2 se realizaron siguiendo la metodología descrita para el experimento E1.

Experimento 3 (E3). Cultivo en suelo en campo

Cepas de *Azospirillum*

En el experimento 3 se emplearon las cepas Cd, VS1, y VS9. Los inóculos se prepararon de acuerdo a lo descrito previamente.

Instalaciones, fertilización y riego.

El experimento se condujo en las instalaciones de una empresa productora y comercializadora de hortalizas, ubicada en San Santiago, Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F. Se empleó un invernadero de 510 m² (10x50), organizado en siete camas preparadas con una mezcla de suelo y abono (conejo, gallina y cerdo), en una proporción 2:1. Seis semanas antes del trasplante el sustrato se sanitizó con una solución nematicida (Busan 1020^{MR}, 30 l/500 l de agua). Sobre las camas se colocaron dos hileras de mangueras para riego por goteo. Posteriormente, las camas se cubrieron con plástico y se horadaron (8 cm diámetro) cada 25 cm a doble línea (11 plantas/m²). Las condiciones ambientales para el cultivo en almácigo y después del trasplante, fueron: luz natural, 35-40/10-15°C (día/noche) y 80% de humedad relativa.

Siembra por almácigo e inoculación de semillas.

Se empleó semilla certificada de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bola, var. Ball Beef Steak (Ball Seeds^{MR}). La siembra se realizó por almácigo, donde se emplearon charolas de 200 cavidades por tratamiento, colocando una semilla por cavidad. El sustrato fue una mezcla de turba:agrolita:vermiculita (8:1:1), al cual se le aplicó una solución de funguicidas (Ridomil^{MR} y Tetrazan^{MR}, 1 g/l). Quince días después de la germinación (DDG), y tras la aparición de los dos cotiledones, las plántulas fueron inoculadas con 200 µl del respectivo inoculante bacteriano. El trasplante se efectuó a los 30 DDG. Plántulas homogéneas fueron extraídas de las charolas. La raíz se sumergió en una solución funguicida (Quintozeno^{MR} y Thiram^{MR}, 1 g/l) e inmediatamente se colocaron en las camas de siembra previamente humedecidas. A partir de las plántulas restantes impregnadas con el funguicida, se tomaron cinco de cada tratamiento para realizar las pruebas de colonización bacteriana en raíces. Quince días después del trasplante (DDT), se inició la fertilización química mediante el riego por goteo de la solución nutritiva 50% N.

Variables de respuesta.

A los 30 DDT se registró el número de racimos florales y la longitud de la cuarta hoja a partir de la zona apical (Rodríguez-Fuentes y Rodríguez-Absi, 2002). A los 72 DDT se registró el número de racimos florales con formación de fruto, para ello se consideraron frutos verdes de aproximadamente 2 cm de diámetro. La producción se evaluó con la cosecha de los dos primeros cortes correspondientes a los dos primeros racimos florales.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental de los experimentos E1 y E2 fue completamente aleatorizado con seis tratamientos y cinco repeticiones. El diseño experimental del experimento E3 fue por bloques al azar con cuatro tratamientos (tres inoculados, un testigo no inoculado) y diez repeticiones. Cada cama fue dividida en 17 bloques (área de 4.8 m), la unidad experimental consistió de un bloque con 16 plantas. Entre cada bloque-tratamiento se dejó un bloque con plantas sin inocular que sirviera como barrera entre tratamientos. El muestreo se realizó de acuerdo a Alcántar y Sandoval (1999). En los tres experimentos se realizó un análisis de varianza ($p=0.05$) de una vía de las medias de los tratamientos. Para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se realizó una comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey, para lo cual se empleó el paquete estadístico Statistica V.6 (StatSoft, Tulsa, OK).

5.2 Resultados y discusión

Las pruebas de colonización bacteriana confirmaron la presencia de las cepas de *Azospirillum* en las raíces de jitomate (Tabla 5).

Las raíces de las plantas no inoculadas (testigo) no presentaron las características típicas de desarrollo de *Azospirillum* en medio NFb-ss. Por lo tanto, podemos asegurar que las cinco cepas empleadas en el estudio son inespecíficas y son capaces de colonizar raíces de jitomate (*Lycopersicon esculentum*), var. Bola y var. Ball Beef Steak (Ball Seeds^{MR}). A este respecto, se ha reportado que la colonización de *Azospirillum* en raíces de jitomate se lleva a cabo: exo y endofíticamente (Mohandas, 1988; Bashan et al., 1991).

Tabla 5 Colonización de raíces de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) por diferentes cepas de *Azospirillum*

Tratamientos		Experimentos		
Cepa	<i>Azospirillum</i>	E1	E2	E3
Cd	<i>A. brasilense</i>	+++*	+++	++
C4	<i>A. brasilense</i>	+++	+++	-
VS1	<i>A. lipoferum</i>	+++	+++	++
VS7	<i>A. brasilense</i>	+++	+++	-
VS9	<i>A. brasilense</i>	+++	+++	++
T	-	-	+	-

*Abundancia del desarrollo típico de *Azospirillum* en el medio de cultivo NFb-ss. +++=alta, ++=media, +=escasa, -=sin desarrollo, T=testigo sin inocular

En el experimento E1, se observó que las plantas inoculadas con los diferentes inóculos incrementaron significativamente la longitud de la raíz y el diámetro del tallo, 28% y 66% mayor respecto a las plantas no inoculadas. El peso fresco de la parte aérea y área foliar no presentaron diferencias significativas; no obstante los valores registrados en las plantas inoculadas fue superior en un 11% respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Efecto de diferentes cepas de *Azospirillum* en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Bola, en un cultivo hidropónico (Experimento E1)

Tratamientos	Raíz	Parte aérea	Diámetro de tallo (cm)	Peso fresco (g)	Área foliar (dm ² /g)
	Longitud (cm)	Altura (cm)			
Cd	51.2 a	108	0.77 a	179.3	75.99
C4	60.4 a	119	0.77 a	183.4	77.72
VS1	55.6 a	102	0.92 a	175.4	74.57
VS7	54.9 a	114	0.84 a	189.9	80.85
VS9	54.1 a	104	0.87 a	187.0	84.50
TF*	39.8 b	104	0.50 b	164.4	69.77

Los valores que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p=0.05). *TF=Testigo fertilizado

En el experimento E2, los inoculantes que influyeron significativamente en el crecimiento de las plantas fueron: la cepa Cd en el peso seco de raíces, y la cepa VS9 en el diámetro del tallo, peso fresco de la parte aérea y área foliar, con incrementos del 83%, 7% y 75%, respectivamente respecto a las plantas no inoculadas. El resto de las variables de respuesta no presentaron diferencias significativas. No obstante, las plantas inoculadas con la cepa VS9 mostraron los resultados más sobresalientes, con un incremento del 7.4% en la longitud de la raíz, y del 12.8% en la altura de la planta, respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 5.2). A pesar de que, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables de crecimiento de plantas inoculadas respecto a las no inoculadas, en palabras de los productores de hortalizas de San Santiago, Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F., las plantas inoculadas se apreciaron visualmente más vigorosas y sanas, fenómeno que permite augurar una buena producción de frutos (comunicación personal).

Es importante mencionar, que el efecto de las cepas de *Azospirillum* no fue influenciado significativamente por el factor suelo.

Tabla 5.2 Efecto de diferentes cepas de *Azospirillum* en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Bola, en un cultivo en maceta con suelo (Experimento E2)

Tratamientos	Raíz		Parte aérea			
	Longitud (cm)	Peso seco (g)	Altura (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Peso fresco (g)	Área foliar (dm ² /g)
Cd	17.7	27.1	114.6	0.70 ab	146.4 ab	48.8 ab
C4	14.2	12.1	118.7	0.65 ab	100.3 bc	29.0 b
VS1	15.5	18.2	109.7	0.52 b	108.2 bc	32.7 b
VS7	18.5	17.9	109.5	0.57 ab	112.0 bc	34.6 b
VS9	20.8	20.0	120.5	0.60 ab	174.6 a	64.3 a
TF*	13.4	14.8	107.7	0.75 a	121.8 abc	36.7 ab

Los valores que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p=0.05). *TF=Testigo fertilizado

En el experimento E3, se observó que las plantas inoculadas con la cepa VS9 presentaron diferencias significativas en el número de racimos florales (Tabla 5.3) y en la producción de frutos, incrementado en más del 100% respecto al obtenido en plantas no inoculadas (Tabla 5.4). En este sentido Bashan y Levanony (1990) reportan que un incremento superior al 25% es considerado comercialmente útil para cultivos inoculados. Por tanto, podemos sugerir el uso de las cepas empleadas en este estudio, principalmente VS9, como biofertilizantes potenciales para promover el crecimiento y producción de plantas de jitomate.

Tabla 5.3 Efecto de diferentes cepas de *Azospirillum* en el crecimiento de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Ball Beef Steak (Ball Seeds^{MR}), en un cultivo en campo bajo invernadero (Experimento E3)

Tratamientos	30 DDS*		72 DDS
	Número de racimos florales	Longitud de hoja (cm)	Número de racimos florales con formación de fruto
Cd	3.10 ab	35.31	3.67
VS1	3.11 ab	35.48	3.65
VS9	3.24 a	35.85	3.77
TF**	2.95 b	33.12	3.50

Los valores que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p=0.05). *DDS=días después de la siembra, **TF=Testigo fertilizado

Tabla 5.4 Efecto de diferentes cepas de *Azospirillum* en la producción de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Ball Beef Steak (Ball Seeds^{MR}), en un cultivo en campo bajo invernadero (Experimento E3)

Tratamientos	Producción* (g)		Producción total (g/planta)
	1er corte	2º corte	
Cd	3860.0	3645.0	107.21 b
VS1	4218.7	3552.5	111.02 b
VS9	5068.0	4898.8	142.38 a
TF**	3577.0	4242.5	111.71 b

Los valores que comparten letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (p=0.05). *La producción se consideró el corte de los frutos maduros de 70 plantas de dos racimos florales, **TF=Testigo fertilizado

Las diferentes cepas de *Azospirillum* promovieron el crecimiento de las plantas de jitomate y la producción de frutos, lo que se atribuye a los diferentes sistemas de cultivo, las condiciones ambientales y al genotipo, tanto de las cepas como de la planta. No obstante, a través de los tres experimentos los resultados consistentes estuvieron dados por las plantas inoculadas con la cepa VS9. En este trabajo se comprobaron las observaciones de otros autores respecto a que la inoculación de plantas de jitomate con *Azospirillum*, promueve el crecimiento de la raíz en longitud y desarrollo de raíces adventicias, pelos radicales, y consecuentemente origina un mayor peso. Así mismo, en parte aérea incrementa el diámetro de tallo y el número de hojas (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1990). Es conveniente señalar que son pocos los reportes relacionados con el efecto de este género bacteriano en la etapa reproductiva y de producción de jitomate (Esquivel-Cote et al., 2004; Urzúa, 2001); en tanto que, para cereales y pastos forrajeros existe más información bibliográfica; por ejemplo se ha documentado que *Azospirillum* induce la aparición temprana de espigas y una mayor producción de grano (Okon y Labandera-González, 1994; Dobbelaere et al., 2001; Díaz et al., 2005; Garza et al., 2005; Díaz y Ortegón, 2006).

5.3 Conclusiones

El empleo de cepas de *Azospirillum* como biofertilizantes en el cultivo de jitomate, puede colaborar a reducir la dosis de fertilizantes nitrogenados hasta un 50%. Con base en los resultados obtenidos, se recomienda el uso de la cepa VS9 de *A. brasilense* como biofertilizante de plantas de jitomate en sistemas hidropónicos y en condiciones de campo.

5.4 Referencias

- Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2000). Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México*, 26(2), 191-203.
- Alcántar, G.G., & Sandoval, S.M. (1999). Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. 156 pp.
- Bashan, Y. (1998). *Azospirillum* plant growth-promoting strains are non-pathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(2), 168-174.
- Bashan, Y. (1986). Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary depression of the rhizosphere microflora. *Applied Environmental Microbiology*, 51(5), 1067-1071.
- Bashan, Y., Holguín, G., & de-Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521-577.
- Bashan, Y., Levanony, H., & Whitmoyer, R. (1991). Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*, 137, 187-196.
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* as a challenge for agricultura. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 591-608.

Díaz, F.A., Alvarado C.M., Cantú, A.M., & Garza, C.I. (2005). Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. *Agricultura Técnica de México*, 31(3), 153-163.

Díaz, F.A., & Ortegón, M.A. (2006). Efecto de inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1), 63-67.

Digat, B. (1988). The bacterization of horticultural substrates and its effects on plant growth. *Acta Horticulturae*, 221, 279-288.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Labandera, G., Caballero, M.J., Aguirre, J., Burdman, S., Sang, S., & Okon, J. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal Plant Physiology*. 28(9), 871-879.

Döbereiner, J., Marriel, I.E., & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(10), 1464-1473.

Esquivel-Cote R., Jiménez-Flores F., Tsuzuki-Reyes G. & Ramírez-Gama RM. 2004. Reducción de la fertilización química en jitomate mediante la biofertilización con *Azospirillum*. XXXII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. León, Guanajuato.

Garza, C.I., Pecina, Q.V., Díaz, F.A., Williams, A.H., & Ramírez, L.A. (2005). Sorgo cultivado con biofertilizantes, fitohormonas y fósforo inorgánico. *Terra Latinoamericana*, 23, 581-586.

Mohandas, S. (1988). Nitrogen fixation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill 'Pusa Ruby'). *Plant and Soil*, 107(2), 219-225.

Okon, Y., & Labandera-González, R. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant and Soil*, 90(4), 1521-1601.

Rodríguez-Fuentes, H., & Rodríguez-Absi, A. (2002). Métodos de análisis de suelos y plantas. Criterios de Interpretación. Trillas. México.

Romero, A.M., Correa, S.O., Moccia, S., & Rivas, J.G. (2003). Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 832-838.

SIAP-SAGARPA. Producción agropecuaria y pesquera. Consultado el el 23 de junio de 2012 en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>

Urzúa HMC. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Ward MH. 2009. Too much of good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. *Rev Environ Health*. 24: 357-363.