

## Uso de microorganismos diazotróficos de vida libre durante la etapa de adaptación de plántulas de piña (*Ananas comosus*) propagadas *in vitro*

### *Use of free life diazotrophic microorganisms during adaptation stage of in vitro propagated plantlets of pineapple (*Ananas comosus*)*

María de Lourdes Adriano-Anaya  
Mónica B. López-Hernández  
Isidro Ovando-Medina  
Patricia Ortiz-Garzón  
Miguel Salvador-Figueroa<sup>1</sup>

#### RESUMEN

La muerte, durante la etapa de adaptación de plantas propagadas *in vitro*, es uno de los problemas a resolver. Se piensa que el empleo de microorganismos promotores del crecimiento de plantas pudiera revertir dicha problemática. En este trabajo se estudió el efecto de la inoculación con microorganismos diazotróficos en la sobrevivencia, y características morfológicas, de plántulas de piña propagadas *in vitro*, durante la fase de adaptación (*ex vitro*). Las plántulas de piña se obtuvieron por organogénesis de meristemas apicales de hijuelos vegetativos. *In vitro*, las plántulas se desarrollaron en el medio de cultivo de De Fossard, a temperatura de  $26 \pm 2$  °C, humedad relativa de 80-90% y fotoperíodo de 14:10 h. Los brotes se desarrollaron en 8 semanas a partir de la siembra de los explantes. Previo a la etapa de adaptación, y a la inoculación con los microorganismos diazotróficos, de las raíces de las plantas se retiraron los restos del medio de cultivo mediante lavados con agua destilada estéril. Las plantas se sembraron en un sustrato a base de fibra de coco, se inocularon con los diazotrofos 11B, PACHAZ008 y PACHAZ013 (108 UFC/planta) y se colocaron en una casahombra. Noventa días después de la inoculación se evaluó la longitud del tallo, longitud de parte aérea, número de raíces, número de hojas, peso seco y el porcentaje de supervivencia. Se encontró mayor sobrevivencia en las plantas inoculadas con los diazotrofos que en las no inoculadas. En las variables morfológicas estudiadas, las plantas inoculadas fueron superiores a las plantas no inoculadas.

**Palabras clave:** bacterias, inoculación, adaptación, plántulas.

#### ABSTRACT

Through the stage of adaptation of plants spread *in vitro*, death is one of the problems to be solved. It is thought the employment of plant promoting growth microorganisms that this problem could be solved. In this work, the effect of the inoculation with diazotrophic microorganisms in the survival, and in the morphologic characteristics, during adaptation phase (*ex vitro*) of *in vitro* propagates pineapple plantlets, was studied. The plantlets of pineapple were obtained by organogenesis of apical meristems of vegetative buds. *In vitro*, the plantlets were developed in the De Fossard culture media, at temperature of  $26 \pm 2$  °C, relative humidity of 80-90% and photoperiod of 14:10 h. The buds developed in 8 weeks starting from the explants sows. Previous to the stage of adaptation, and to the inoculation with the diazotrophic microorganisms, the remains of culture media on the roots were removed by sterile distilled water washer. The plants were sowed in a coconut fiber substrate, inoculated with the diazotrophic 11B, PACHAZ008 and PACHAZ013 (108 UFC/plant) and placed in a shadehouse. Ninety days after the inoculation, the longitude of the shaft, longitude of air part, number of roots, number of leaves, dry weight and the percentage of survival were evaluated. Survival was higher in the plants inoculated with the diazotrophic that in those not inoculated. In the morphologic variable studied, the inoculated plants rated higher to the not inoculated plants.

**Key words:** bacteria, inoculation, adaptation stage, plantlets.

#### INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) es originaria de la zona tropical de América del Sur. Es una planta monocotiledónea, herbácea, perenne y de reproducción, principalmente, asexual. Las variedades que se comercializan en el mercado internacional son Cambrey (Milagrera), Cayena Lisa (Hawaiana), Champaka y Golden Sweet o MD2. En el año 2008, en México esta planta se sembró en una superficie superior a las 29,000 ha (SIAP-SAGARPA, 2009).

Dado que el agricultor emplea hijuelos vegetativos para mantener la población de las áreas establecidas y/o para abrir nuevas áreas, las plagas y enfermedades que atacan el cultivo de piña constantemente expanden sus fronteras. Una alternativa para resolver dicha problemática es contar con material vegetal sano, de bajo costo y en grandes cantidades. En este sentido, la propagación *in vitro* es una alternativa que permite alcanzar tales metas. Esta biotecnología ofrece diversas ventajas, entre las que se encuentran la obtención de plantas homogé-

<sup>1</sup> Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera a Puerto Madero Km. 2.0, Tapachula, Chiapas. C.P. 30700. Correo-e: msalvad@hotmail.com

neas y libres de plagas y enfermedades (Lindsey y Jones, 1989). Sin embargo, en la fase de adaptación, y posterior transferencia de las plantas al suelo, la muerte de individuos es el factor negativo más importante a considerar. En dicha etapa las vitroplantas tienen escaso desarrollo de la cutícula, las hojas son fotosintéticamente poco activas y los estomas pueden ser disfuncionales (Pierik, 1990; Roca y Mroginski, 1991). Se piensa que una alternativa para mejorar la adaptación y el desarrollo de las vitroplantas de piña es con el empleo de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCP).

Las BPCP promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante mecanismos directos e indirectos. Entre los primeros se encuentra la producción de diferentes fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquinas, etileno), la producción de ácidos grasos, la fijación de nitrógeno atmosférico y la solubilización y movilización de fósforo y otros nutrimentos. Entre los últimos se encuentran la producción de antibióticos, liberación de enzimas (quitinasas y glucanasas) e inducción de resistencia sistémica a virus, bacterias y hongos.

Las BPCP se han empleado en cultivos de maíz (Reyes y Valery, 2007), trigo (Urzúa y Tsuzuki, 1995), arroz (Rives, Acebo y Hernández, 2007), algodón (Ferrera-Cerrato, 1995), tomate (Santillana, Arellano y Zúñiga, 2005), papaya (Becerra, 2001), caña de azúcar (Pérez y Casas, 2005), lechuga (Díaz-Vargas, Ferrera-Cerrato, Almaraz-Suárez y González, 2001), sorgo (Toro, Bazó y López, 2008), entre otros cultivos.

En plantas propagadas *in vitro* Azcón, Palenzuela, García y Barea (1999), Ovando-Medina, Adriano-Anaya, Chávez-Aguilar, Oliva-Llaven, Ayora-Talavera, Dendooven, Gutiérrez-Micelli y Salvador-Figueroa (2007) y Gutiérrez-Miceli, Ayora-Talavera, Abud-Archila, Salvador-Figueroa, Adriano-Anaya, Arias Hernández y Dendooven (2008) encontraron que la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento de plantas, durante la fase de aclimatación, estimuló el enraizamiento y el desarrollo de las plántulas, incrementó la resistencia al estrés biótico y abiótico y mejoró la supervivencia en *Citrus sp*, *Alpinnia purpurata* y *Guarjanthe skinnerii*, respectivamente.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la biofertilización en la supervivencia y crecimiento de plántulas de piña propagadas *in vitro* durante la etapa de adaptación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Propagación *in vitro*

Para la propagación *in vitro* de plantas de piña de las variedades Champaka y Cayena se emplearon meristemos apicales de hijuelos de raíz, cultivados en el medio de De Fossard (De Fossard, 1976) suplementado con bencilaminopurina (5 mgL<sup>-1</sup> y ácido indol acético (1 mgL<sup>-1</sup>). Dicho medio se empleó tanto para la etapa de inducción como para la etapa de multiplicación. Los frascos, con los meristemos sembrados, se colocaron en un cuarto de incubación con fotoperíodo de 14/10 h luz/oscuridad, temperatura de 26 ± 2 °C, y humedad relativa de 80-90%. A partir de la siembra de los explantes, los brotes se desarrollaron en 56 días. En promedio se obtuvieron seis brotes por explante. La etapa de elongación de los brotes e inducción de raíces se realizó en el medio previamente referido, sin la adición de fitohormonas. Dicha etapa duró 21 días. Finalizada la propagación *in vitro*, las plántulas se retiraron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada hasta eliminar los restos del medio de cultivo. Posteriormente, las plántulas se sembraron, individualmente, en fibra de coco estéril como sustrato.

### Microorganismos empleados

Las cepas de bacterias empleadas fueron los diazotrofos PACHAZ008, PACHAZ013 y 11B, de la colección del CenBio-UNACH. Los microorganismos se crecieron, por 12 h, en caldo nutritivo a pH 7.0, temperatura de 28 °C y agitación de 200 rpm. Al finalizar el tiempo de cultivo, la concentración de microorganismos se estimó mediante el método del número más probable.

### Diseño experimental

Para determinar el efecto de las diferentes cepas de diazotrofos en la sobrevivencia y en el crecimiento de las plántulas de piña, se estableció un diseño de bloques al azar de cuatro tratamientos (las tres cepas de diazotrofos y el tratamiento sin inocular) con 12 repeticiones. Cada tratamiento estuvo constituido por 240 plántulas (20 por repetición). En todas las plántulas se hicieron mediciones.

### Inoculación y condiciones de cultivo en la etapa de adaptación

Las plántulas, de los correspondientes tratamientos, se inocularon con 108 UFC planta<sup>-1</sup>.

Después de la inoculación, y con el fin de mantener alta humedad relativa, las plántulas se cubrieron con bolsas de plástico. Posteriormente se colocaron en un cuarto de incubación (fotoperíodo de 14/10 h luz/oscuridad, temperatura de  $26 \pm 2$  °C, y humedad relativa de 70-80%) durante 21 días. Para disminuir la humedad relativa en el microambiente de las plantas, cada tercer día se realizó un orificio (5 mm de diámetro) en la bolsa de plástico. Así mismo, cada 5 días las plántulas se regaron con 5 mL de solución de sales de Hewit (Hewit, 1952). Concluida la etapa de cuarto de incubación, las plántulas se trasladaron a una casasmombra (cubierta con malla de 50% de sombra) donde permanecieron por 3 meses.

### VARIABLES DETERMINADAS

A todas las plantas sobrevivientes se les determinó longitud del tallo, longitud de la 2ª hoja, número de raíces y número de hojas. Con las sobrevivientes se calculó el porcentaje de sobrevivencia. Es necesario anotar cuántas plántulas se usaron para determinar cada variable de respuesta.

### ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de la varianza y donde hubo diferencias se empleó la prueba de Duncan ( $p \leq 0.05$ ), empleando el programa InfoStat versión 2008.

### RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los valores de las diferentes variables morfológicas determinadas a las plantas de piña, de las variedades Champaka

y Cayena, sobrevivientes al proceso de adaptación. Independientemente de la variedad de piña. En general las plantas que recibieron las diferentes cepas de diazotrofos mostraron mejores características morfológicas. En ese sentido, las longitudes de los tallos de las vitroplantas de piña de la variedad Champaka y de la variedad Cayena inoculadas con el diazotrofo 11B fueron 32% y 95%, respectivamente, más grandes que las plantas que no fueron inoculadas. Por su parte, las vitroplantas inoculadas con los diazotrofos PACHAS008 y PACHAS013, aunque más largas que las correspondientes testigo, no fueron mejores que las que recibieron a la cepa 11B.

Respecto a la variable longitud de la 2ª hoja de las vitroplantas de piña, no se encontró diferencia entre las variedades; sin embargo, fueron las más pequeñas de todos los tratamientos. Por su parte, la 2ª hoja de la variedad Cayena inoculada con el diazotrofo 11B fue 1.71 veces más larga que las de las plantas sin inocular. Así mismo, en las plantas de la variedad Champaka las inoculadas con el diazotrofo PACHAZ008 se encontró 49% más longitud en este carácter morfológico.

Con respecto al número de raíces, en las vitroplantas de piña de la variedad Champaka se encontró que las inoculadas con el diazotrofo PACHAZ013 tuvieron 27% menos cantidad de raíz que las no inoculadas. Resultados contrarios se observaron en las vitroplantas de la variedad Cayena, donde las vitroplantas inoculadas con los diazotrofos 11B y PACHAZ008 tuvieron, en promedio, 67% más raíces respecto a las plantas no inoculadas. Es importante notar que entre las plantas no inoculadas se encontraron diferencias entre las variedades de piña, siendo la variedad Champaka la que tuvo mayor número de raíces.

**Cuadro 1.** Valor promedio de longitud del tallo, longitud de la 2ª hoja, número de raíces y número de hojas en plantas de piña, sobrevivientes al proceso de adaptación y aclimatación

Tratamiento	Longitud del tallo (cm)		Longitud de la 2ª hoja (cm)		Número de raíces		Número de hojas	
	Variedad							
	Ch	Ca	Ch	Ca	Ch	Ca	Ch	Ca
Testigo	0.63 de	0.57 e	3.75 c	3.75 c	8.66 a	5.33 c	12.83 cd	11.41 d
Diazótrofo PACHAZ008	0.65 cde	0.76 bcd	5.58 ab	5.33 b	8.08 a	8.50 a	17.08 ab	18.58 a
Diazótrofo 11B	0.83 a	1.11 a	5.33 b	6.41 a	7.83 ab	9.25 a	19.08 a	15.33 bc
Diazótrofo PACHAZ013	0.80 bc	0.64 cde	4.75 b	4.75 b	6.33 bc	5.50 c	15.33 bc	14.08 cd

Valores con diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). Ch = variedad Champaka; Ca = variedad Cayena.

Así mismo, se encontró que las vitroplantas de la variedad Champaka inoculadas con el diazotrofo 11B y las vitroplantas de la variedad Cayena inoculadas con el diazotrofo PACHAZ008 tuvieron 49% y 63% más hojas que sus respectivos tratamientos sin inocular.

Finalmente, en el Cuadro 2 se muestra el porcentaje de vitroplantas de piña sobrevivientes al proceso de adaptación y aclimatación ex vitro. En general, las vitroplantas inoculadas fueron más resistentes al proceso de adaptación y aclimatación. Así, las vitroplantas de la variedad Champaka inoculadas con el diazotrofo PACHAZ008 tuvieron 31.6% más sobrevivientes que las no inoculadas. Por su parte, en la variedad Cayena, la mayor cantidad de sobrevivientes se encontró en las vitroplantas inoculadas con el diazotrofo 11B. En dicho tratamiento se encontró 21.8% más sobrevivencia que en las plantas no inoculadas.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la biofertilización tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y sobrevivencia de plántulas de piña variedad Champaka y Cayena. Bashan (1996) menciona que los efectos positivos de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (BPCP) se reflejan en diversos parámetros morfológicos de la raíz, incremento en la longitud de raíces laterales, incremento en el peso seco de la raíz, en el número, densidad y aparición temprana de pelos radiculares, entre otros, y la estimulación de la exudación radicular. Resultados similares han sido reportados por diversos autores, los cuales trabajaron con diversos tipos de microorganismos evaluados en cultivos diversos (Reyes y González, 1995; Urzúa y Tsuzuki, 1995; Díaz-Vargas, 2001; Ovando, 2005). En ese sentido, Díaz-Vargas et al. (2001) mencionan que los efectos más sobresalientes de algunas cepas bacterianas en plantas de lechuga (*Lactuca*

*sativa* L.) se deben a que posiblemente existió un sinergismo entre el hospedante y los simbiosiontes, lo que permitió mejor absorción de nutrimentos esenciales, los cuales, junto con las fitohormonas que producen los microorganismos, provocan mayor desarrollo de la parte aérea del cultivo y el aumento en el peso seco. Por su parte, Jiménez et al. (2001) reportaron que dicho efecto se debe a que estas bacterias, además de proporcionar nitrógeno, modifican el desarrollo de las raíces y por tanto favorecen la absorción de agua y de nutrimentos, lo que se traduce en la acumulación de materia seca. Así mismo, el comportamiento del diazotrofo PACHAZ008 fue similar a lo encontrado por Becerra (2001), quien determinó el efecto de varias cepas de diazotrofos, sobre el desarrollo de plantas de papaya (*Carica papaya*), encontrando que dicho diazotrofo fue el que promovió el mayor diámetro de tallo y la mayor longitud de las raíces. Dicho autor atribuyó estos resultados a la capacidad que estos microorganismos tienen para sintetizar reguladores de crecimiento (fitohormonas) involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Por su parte, el menor efecto observado en las vitroplantas de piña inoculadas con el diazotrofo PACHAZ013, contrario a lo encontrado por López (2002) en plántulas de maíz (*Zea mays*), pudo deberse a la especificidad de las cepas bacterianas. En este sentido, la naturaleza y cantidad de los exudados de las raíces de las vitroplantas de piña, o no fueron de la calidad o no estuvieron en la cantidad necesaria para estimular el metabolismo, o la colonización de diazotrofo, situación que ha sido prevista por Rangel (1997). En este sentido Caballero-Mellado, Carcano-Montiel y Mascarua-Esparza (1992) encontraron que el rendimiento de plantas de trigo dependió de la cepa de *Azospirillum brasilense* utilizada. La posible especificidad entre microorganismo y planta aún está poco clarificada y, como lo comentan Loredo-Osti, López-Re-

**Cuadro 2.** Plántulas de piña sobrevivientes (%) durante la etapa de adaptación

TRATAMIENTO	Supervivencia (%)	
	Variedad Champaka	Variedad Cayena
Sin diazotrofo	64.6 d	75.6 d
Con el diazotrofo PACHAZ008	96.2 a	93.6 b
Con el diazotrofo 11B	92.3 b	97.4 a
Con el diazotrofo PACHAZ013	89.7 c	88.5 c

Valores con diferentes letras dentro de una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

yes y Espinosa-Victoria (2004), existen muchas preguntas pendientes de respuesta con relación a este tema.

Con respecto a la mejora en la sobrevivencia de las vitroplantas con la adición de los diazotrofos, se puede decir que es resultado de la combinación de todos los beneficios atribuidos, previamente, a este tipo de microorganismos: mayor disposición de nitrógeno asimilable, minerales y nutrimentos, estimulación del crecimiento vegetal por las fitohormonas producidas por los microorganismos, inducción de resistencia e inhibición del crecimiento de patógenos. Además de lo anterior, la mayor sobrevivencia pudiera ser resultado de la inducción de mayor tolerancia a estreses físicos, como lo demostró López (2002), quien encontró que las plantas de maíz inoculadas con los diazotrofos 11B y PACHAZ013 soportaron mejor el período de sequía (7 días) al que fueron sometidas. Podría ser que dicho beneficio se debe a que las plantas inoculadas absorben, y retienen en su tejido, una mayor cantidad de agua. Habrá que estudiar si dicho fenómeno se debe a la presencia de mayor cantidad de aquaporinas o a la mejora en la actividad de dichas proteínas.

De forma general se puede decir que la asociación de los diazotrofos, sobre todo la 11B y PACHAZ013, con las raíces de las vitroplantas resultó benéfico, ya que las plantas se adaptaron mejor al ser transferidas a condiciones de casombría.

## CONCLUSIONES

El empleo de bacterias diazotróficas, y promotoras del crecimiento a plantas, en plantas propagadas in vitro de piña permitió mejorar su sobrevivencia en la etapa de adaptación a condiciones de casombría e influyó positivamente en sus características morfológicas. Los diazotrofos 11B y PACHAZ008 fueron los que tuvieron el mejor efecto.

## REFERENCIAS

- Azcón, A., Palenzuela, J., García, L. y Barea, J.M. (1999). Aplicación de micorrizas en hortofruticultura. *Phytoma España*. 110:46-56.
- Becerra, C. (2001). Determinación del efecto de cepas autóctonas de *Azotobacter* sp. en *Carica papaya*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas. UNACH.
- Caballero-Mellado, J., Carcano-Montiel, M.G. & Mascarua-Esparza, M.A. (1992). Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate, *Symbiosis*, 13:243-253.
- De Fossard, R.A. (1976). Tissue Culture for Plant Micropropagation. University of New England Printery. Armidale. New South Wales. 408 p.
- Díaz-Vargas, P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz-Suárez y G. González. (2001). Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en *Lactuca sativa* L. *Terra Latinoamericana*. 19:327-335.
- Ferrera-Cerrato, R. (1995). Efecto de Rizósfera, en: Ferrera-Cerrato R. y J. Pérez-Moreno eds. *Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 36-43.
- Gutiérrez-Miceli, F. A., T. Ayora-Talavera, M. Abud-Archila, M. Salvador-Figueroa, L. Adriano-Anaya, M. L. Arias Hernández and L. Dendooven. (2008). Acclimatization of micropropagated orchid *Guarianthe skinnerii* inoculated with *Trichoderma harzianum*. *Asian Journal of Plant Sciences*. 7(3):327-330.
- Hewitt, E., J. 1952. Sand water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureau, Technical Communication. 22.
- Lindsey, K., y K. Jones. 1989. *Biotecnología Vegetal Agrícola*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 63-67 pp.
- López, A. 2002. Inducción del fenotipo de resistencia a estrés hídrico en plantas biofertilizadas con bacterias diazotróficas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. UNACH.
- Loredo-Osti, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22(2):225-239.
- Ovando-Medina I., L. Adriano-Anaya, A. Chavez-Aguilar, A. Oliva-Llaven, T. Ayora-Talavera, L. Dendooven, F. Gutiérrez-Miceli and M. Salvador-Figueroa. 2007. Ex vitro survival and early growth of *Alpinia purpurata* plantlet inoculated with *Azotobacter* and *Azospirillum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(19):3454-3457.
- Pérez, J. y M. Casas. Estudio de la interacción planta-Azospirillum en el cultivo caña de azúcar (*Saccharum* sp). *Cultivos Tropicales*. 2005. 26(4):13-19.
- Pierik, R., L. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Mundi Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Rengel, Z. 1997. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant and Soil*. 196:255-260.
- Reyes, A. y M. González. 1995. Influencia de micorrizas y de una bacteria solubilizadora de fosfatos en el desarrollo de plantas micropropagadas de banano. *Infomusa*. 4(2):9-10.
- Reyes, I. y A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*. 19(3) 117-126.
- Rives N., A. Acebo y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba*. *Cultivos Tropicales*. 28(2):29-38.
- Roca, W. y L. Mrogniski. 1991. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos, embriogénesis somática y organogénesis. *Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Colombia. 970 p.
- Santillana, N., A. Arellano y D. Zúñiga. 2005. Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*. 4:47-51.
- SIAP-SAGARPA. 2009. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [www:siap.mx](http://www.siap.mx)
- Toro, M., I. Bazó y M. López. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Tropical*. 58(3):215-221.
- Urzúa, H. M., y C. G. Tsuzuki. 1995. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* en la producción de jitomate. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 20:23-25.