



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno en tres especies de hortalizas, cebolla (*Allium cepa* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) y pápalo (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum*.

Tesis para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

AISLIN CARMONA HERNÁNDEZ

DIRECTOR:

DANIEL SIHUANCA MENDOZA



Septiembre 2024

*“No permitas que tus miedos y debilidades te alejen
de tus objetivos ¡Mantén tu corazón ardiendo!
No importa lo que pase, sigue avanzando y no te rindas a pesar
de haberte caído, recuerda que el tiempo no espera a nadie”*

Kyojuro Rengoku -Koyoharu Gotouge

Dedicatoria

Con todo mi amor a mis padres Obdulia Hernández Juárez y Edgar Carmona Sánchez y mi hermano Leonardo Carmona Hernández, por su comprensión, amor y sus consejos, apoyándome en cada paso que he dado, alentándome a seguir adelante. ¡Los amo!

Con cariño a mis amigos Ángel, Giovanna, Nelly, Xquenda, Eduardo y Daniel, que siempre me aconsejaron, apoyaron y me acompañaron a lo largo de la carrera formado una preciosa amistad y permitiéndome entrar en sus vidas.

Agradecimientos

Al Dr. Daniel Sihuana Mendoza por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mi para este proyecto apoyándome en la realización de este.

A mis compañeros Abraham y Eduardo por apoyarme a lo largo de los experimentos tanto en el laboratorio como en el invernadero.

A la Dra. Dalia Molina Romero y al Dr. Carlos Alberto Ruiz Jiménez por las observaciones en la revisión de esta tesis.

A las personas que he conocido a lo largo de mi vida, dejándome sus enseñanzas.

Indice

Indice de tablas

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Fijación biológica del nitrógeno	4
2.2. Importancia del nitrógeno en las plantas.....	6
2.3. Generalidades de las especies	7
2.3.1. Acelga (<i>Beta vulgaris</i> L. var. cicla)	7
2.3.2. Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)	8
2.3.3. Pápalo (<i>Porophyllum ruderale</i>) (Jacq.) Cass. var. macrocephalum	9
2.4. Investigaciones precedentes.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPOTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos particulares.....	17
6. MATERIALES Y METODOS.....	18
6.1. Origen del material microbiológico	18
6.2. Aislamiento de las bacterias.....	19
6.3. Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias.....	19
6.4. Preparación y conteo de inóculos bacterianos.....	19
6.5. Diseño experimental.....	20
6.6. Desinfección e inoculación de semilla en placa	20
6.7. Siembra de pápalo, cebolla y acelga y preparación del sustrato.	21
6.8. Inoculación de plantas de pápalo, cebolla y acelga en invernadero. ..	21
6.9. Evaluaciones.....	21
6.10. Análisis estadístico.....	22
7. RESULTADOS	23
7.1. Características morfológicas y pruebas bioquímicas.	23
7.2. Efecto de <i>Rhizobium</i> y <i>Azospirillum</i> sobre la germinación de semillas de pápalo, acelga y cebolla.....	25
7.3. Efecto de <i>Rhizobium</i> y <i>Azospirillum</i> sobre el crecimiento de plantas de pápalo, cebolla y acelga.....	28
8. DISCUSIÓN.....	33
9. CONCLUSIONES	38
10. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	39
11. ANEXOS.....	47

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la acelga (usda plants database, s. F.-a)	7
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la cebolla (usda plants database, s. F.-b)	8
Tabla 3. Clasificación taxonómica del pápalo (lara et al., 2011)	9
Tabla 4. Tratamientos de germinación de semillas en días y crecimiento de plantas de cebolla, acelga y pápalo.	20
Tabla 5. Medias de altura, peso de raíz, masa total en húmedo, peso de hojas en húmedo, numero de hojas e índice de efectividad de inoculación de plantas de pápalo, cebolla y acelga inoculadas con cepas de rhizobium y azospirillum.	28
Tabla 6. Medias de tamaño de hojas, peso de raíz en seco, peso de hojas es seco masa total en seco e índice de efectividad de inoculación de plantas de pápalo, cebolla y acelga inoculadas con cepas de rhizobium y azospirillum.	32

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de infección y formación de nódulos. (Modificado de Atlas & Bartha, 2002)	3
Figura 2. Representación del flujo de electrones en la fijación de nitrógeno. (Taiz & Zeiger, 2006)	4
Figura 3. Estequiometría de la fijación biológica del nitrógeno. (Wewelwela et al., 2021)	5
Figura 4. Ubicación de la zona de muestreo. (INEGI, 2010) (Modificada: Aislin C.H.)	18
Figura 5. Cultivos de bacterias aisladas de nódulos bacterianos A) planta de haba y B) frijol.	23
Figura 6. Tinción de Gram de bacterias, vista al microscopio en 40x: frijol A) y haba B)	23
Figura 7. Pruebas de identificación en cepas de frijol A) y haba B) PGA +VB.	24
Figura 8. Prueba de identificación en cepa de haba LLA+RB	24
Figura 9. Porcentaje de germinación de semillas de pápalo inoculadas con cepas de Rhizobium, Azospirillum y control sin inocular.	25
Figura 10. Porcentaje de germinación de semillas de acelga inoculadas con cepas de Rhizobium, Azospirillum y control sin inocular.	26
Figura 11. Semillas de cebolla infectadas con Fusarium en placa con tratamiento de Rhizobium y Azospirillum A) y B); vista microscópica de esporas de Fusarium en 40x en semillas de cebolla C) y D).	27
Figura 12. Efecto de Azospirillum (izq.) y Rhizobium (dcha.) en el crecimiento del pápalo.	29
Figura 13. Efecto de Azospirillum (dcha.) y Rhizobium (izq.) en el crecimiento de la acelga.	30

RESUMEN

El suelo es un ambiente donde encontramos una gran diversidad de microorganismos, dentro de esta diversidad existen bacterias diazotroficas de vida libre y en simbiosis como *Azospirillum* y *Rhizobium* que realizan un proceso llamado fijación biológica del nitrógeno, donde convierten el nitrógeno atmosférico en amonio, nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de plantas, los fertilizantes inorgánicos son la fuente principal de nitrógeno en los cultivos pero tiene impactos negativos en el ambiente. La cebolla, la acelga y el pápalo son hortalizas que se producen en México en grandes cantidades pues son de importancia económica. En esta investigación se evaluó la influencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la germinación y crecimiento del Pápalo (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cass. var. macrocephalum), cebolla (*Allium cepa* L.) y acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla). Se identificó una bacteria del género *Rhizobium* en nódulos de planta de haba por medio de las pruebas de identificación Peptona Glucosa Agar (PGA) + verde de bromocresol y Levadura Lactosa Agar (LLA) observación a nivel colonia y tinción de Gram. En el porcentaje de germinación *Azospirillum* alcanzó el máximo germinativo al tercer día con 53.33% de semillas germinadas en pápalo y *Rhizobium* un 33.3%, las semillas de acelga alcanzaron el máximo germinativo al cuarto día, con un porcentaje del 13.33% con *Rhizobium* y un 16.66 % con *Azospirillum*, en semillas de cebolla se notó la presencia de un hongo del género *Fusarium*. En cuanto al efecto de estas bacterias en el crecimiento de las plantas se observó que *Azospirillum* tuvo una mayor influencia en la altura, peso de raíz, masa total en húmedo, peso de hojas en húmedo, tamaño de hojas, peso de raíz en seco, peso de hojas en seco y masa total en seco en plantas de pápalo, en comparación con la inoculación con *Rhizobium*. En cuanto a las plantas de cebolla solo en la altura, masa total en húmedo y el peso de la hoja en húmedo, se observó un efecto positivo de *Azospirillum*, en las plantas de acelga no se observó un efecto de la inoculación de ambas bacterias. Se concluye que *Azospirillum* tuvo un efecto significativamente mayor que la cepa de *Rhizobium* que fue aislada de la planta de haba, en las variables evaluadas en el crecimiento de plantas de pápalo y cebolla, ambas cepas aceleraron la germinación y *Azospirillum* aumento del porcentaje de germinación en las semillas de las hortalizas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacterias fijadoras de nitrógeno

El suelo es un ambiente donde encontramos una gran diversidad de microorganismos, en estos ecosistemas existen eucariotas y procariontes en mutua interacción que contribuyen en las características del suelo (Duchen & Torres, 2021).

En el siglo XVII a partir de estudios anatómicos de raíces de leguminosas se identificaron bacterias diazotróficas y actualmente se conocen más de 19.000 especies con esta actividad (Cruz *et al.*, 2021).

Las bacterias diazotróficas se clasifican en tres grupos: 1) Fijadoras de vida libre, son bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno, 2) En asociación con otros huéspedes (fijadoras asociativas), 3) Simbiontes de plantas, (son bacterias fijadoras simbióticas). Aquellas que pueden realizar fijación de N en vida libre y las que forman una asociación con otros huéspedes son mayormente utilizadas en cultivos no leguminosos (Maheshwari *et al.*, 2022).

Azospirillum es una bacteria que se relaciona con cultivos no leguminosos, por lo que se clasifica como organismo simbiote asociativo (Maheshwari *et al.*, 2022), colonizan el interior y la superficie de las raíces principalmente en la zona de elongación y los pelos radicales, así como los espacios intercelulares de la raíz, utiliza diferentes fuentes de nitrógeno como amoníaco, nitritos y nitratos. La especie más estudiada de este género es *A. brasilense*. de la cual varios estudios demuestran que promueve el crecimiento vegetal (Duarte *et al.*, 2020).

Las bacterias de vida libre como *Azotobacter* sp. proporciona compuestos nitrogenados como el amonio además de establecer las condiciones óptimas para desarrollar una cubierta vegetal estable, se encuentran en casi todos los hábitats, como el suelo, el mar, fuentes de agua dulce y sedimentos (Rodríguez *et al.*, 2020).

Algunas especies de plantas establecen una relación mutualista con bacterias fijadoras de nitrógeno que derivan en la formación de nódulos en la

raíz, proporcionando un ambiente adecuado para que estas bacterias transformen el dinitrógeno atmosférico en amoníaco (Biseeling & Geurts, 2020).

Los géneros como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (grupo colectivo conocido como rizobia) se asocian con leguminosas. La simbiosis de leguminosa-rizobio se lleva a cabo por señales moleculares a través la secreción de flavonoides por parte de las raíces de la planta que pueden inducir la transcripción del gen *nod*. Los rizobios perciben los flavonoides a través de la proteína NodD, los cuales se encargan de activar los genes de nodulación bacteriana (Figura 1) (Lima et al., 2022).

El siguiente paso es la invasión de los rizobios, donde se segrega el factor Nod, presentando cambios como la deformación de los pelos de la raíz, la despolarización de la membrana, las oscilaciones de calcio intracelular y el inicio de la división de la corteza de la raíz, el pelo radicular deformado forma una curva que atrapa bacterias adheridas (Bianco, 2020).

El tercer paso es la formación del nódulos, las células corticales de la raíz comienzan a dividirse teniendo como resultado una masa celular que contiene el primordio del nódulo, la división celular se da antes de que el hilo de infección alcance la base de la célula pilosa radicular, las células corticales de la raíz son las primeras en recibir las bacterias intracelulares que se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno, después las células de la corteza media se dividen y forman el meristema del nódulo, la población de rizobios aumenta e ingresando al primordio del nódulo, por medio de la endocitosis, los rizobios son liberados en bacteroides, la bacteria una vez encerrada en la membrana vegetal se forma el simbiosoma. (Wewalwela et al., 2021)

El nudo y el hilo de infección siguen creciendo, y va formando una red llamada zona de infección, el simbiosoma está compuesto por la membrana de este, el bacteroide y el espacio del simbiosoma. La membrana del simbioma es una interfaz estructural y funcional entre la leguminosa y la bacteria, esta se

encarga de los procesos del transporte, metabolismo, formación de nódulos y señalización (Wewalwela *et al.*, 2021).

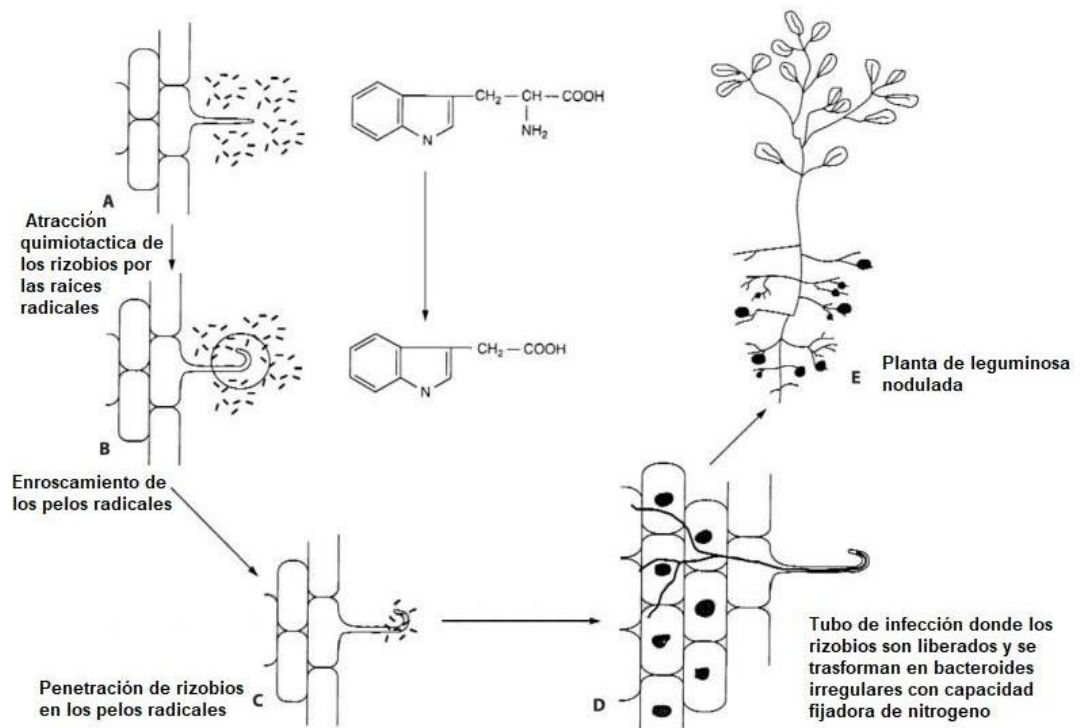


Figura 1. Proceso de infección y formación de nódulos. (Modificado de Atlas & Bartha, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1. Fijación biológica del nitrógeno

El N_2 (nitrógeno molecular o nitrógeno) es un elemento de los más abundantes en la naturaleza, pues se encuentra distribuido en la atmósfera, representando del 78%. El N_2 es relativamente inerte, aunque puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en productos que pueden ser fácil de asimilar para las plantas y otros organismos. La cantidad que se fija va de 230×10^6 Tm por año. Del cual el 13% se fija por oxidación que es originado por las descargas eléctricas de las tormentas, pues el N_2 pasa a ácido nítrico en presencia de O^2 y vapor de agua, el 87% restante es fijado por microorganismos cuyo proceso se le conoce como fijación biológica del N_2 (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

La fijación biológica del nitrógeno es la conversión de nitrógeno atmosférico en amonio orgánico por medio de microorganismos que se encuentran en el suelo (Jürgen Evert *et al.*, 2010).

Aunque existen diferencias morfológicas y fisiológicas entre los microorganismos fijadores de nitrógeno, hay una similitud estructural de la enzima nitrogenasa tanto en los simbioses como en las bacterias de vida libre, sin embargo, en los simbioses hay una mayor eficiencia pues reciben productos fotosintéticos de la planta huésped, estos productos proporcionan ATP para el proceso de fijación (Figura 2).

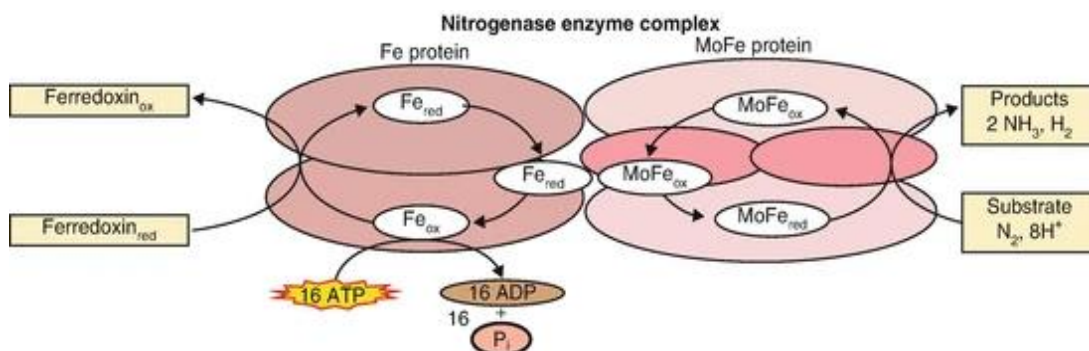


Figura 2. Representación del flujo de electrones en la fijación de nitrógeno. (Taiz & Zeiger, 2006).

La nitrogenasa está compuesta por dos proteínas llamadas componente I y componente II, el componente I es también conocido como proteína FeMo o

dinitrogenasa y el componente II se conoce como proteína Fe o dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa (proteína FeMo) es la que lleva a cabo la reducción del sustrato contiene dos grupos metales únicos, el grupo P y el cofactor hierro-molibdeno (cofactor FeMo) este componente es menos sensible al oxígeno (Ciencia y tecnología,2016).

La proteína Fe o componente II (dinitrogenasa reductasas) es el donante de electrones dependiente de ATP de la dinitrogenasa, es un homodímero que consta de subunidades, cada dímero contiene cuatro átomos de Fe y cuatro de S lábiles a las ácidos denominados grupo [4Fe-4S] que se unen a dos moléculas de MgATP dinitrogenasa reductasa además se requiere de la dinitrogenasa reductasa para la correcta inserción del cofactor hierro-molibdeno en la proteína dinitrogenasa y es extremadamente sensible al oxígeno (Bahuguna *et al.*, 2021).

El mecanismo de acción de la nitrogenasa es un ciclo redox entre la dinitrogenasa reductasa (proteína Fe) y la dinitrogenasa (proteína MoFe) y el ciclo de reducción del sustrato, la dinitrogenasa reductasa proporciona electrones a la dinitrogenasa a través de la hidrólisis de dos moléculas de MgATP, los encargados de donar estos electrones son las ferredoxinas que son proteínas de hierro y azufre mientras que las flavodoxinas son proteínas que contiene el grupo prostético, mononucleotido de flavina, la dinitrogenasa reductasa reacciona con MgATP después de la aceptación de los electrones de ferredoxina o flavodoxina reducida, el ATP y la hidrólisis inducirán un cambio conformacional de la proteína MoFe requerida para la transferencia de electrones del par del grupo P al cofactor FeMo, cuando la dinitrogenasa ha recolectado suficientes electrones de la dinitrogenasa reductasa se une con el N₂, este ciclo se debe repetir ocho veces para que la enzima nitrogenasa pueda reducir el N₂ a dos moléculas amoniaco y una molécula de H₂ (Figura 3) (Saha *et al.*, 2017).

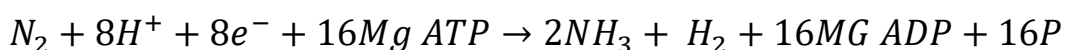


Figura 3. Estequiometría de la fijación biológica del nitrógeno. (Wewalwela *et al.*, 2021)

2.2. Importancia del nitrógeno en las plantas.

El N₂ es uno de los diecisiete elementos esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas pues se encuentra en una proporción de 1 a 3 % en materia seca dependiendo de la especie, su función tiene que ver con el aspecto estructural ya que se relaciona con la síntesis de moléculas principales para el crecimiento como ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, clorofilas y alcaloides (Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004) además el N₂ ayuda a la producción de componente químicos, que protegen contra parásitos y enfermedades a las plantas (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). Otra de las funciones importantes del N₂ es su acción directa con el aumento de la masa seca, favoreciendo el desarrollo del tallo, crecimiento del follaje y aporta en la formación de frutos y granos (Palomino *et al.*, 2004).

El exceso o la deficiencia de N₂ tiene consecuencias, si hay una deficiencia, puede presentar atrofia del crecimiento, coloración foliar, que va desde hojas verdes pálidas hasta amarillas y que son pequeñas o caída temprana de hojas. Por otro lado, si se presenta un exceso, el color de las hojas es un verde oscuro además de presentar debilidad en los tejidos y crecimiento vegetativo suculento, también se encuentra el retraso o la ausencia de la floración o frutos, pero todos estos aspectos dependerán de cada tipo de planta o cultivo, pues cada una tienen necesidades diferentes de este elemento (Gordon & Barden, 1979).

Las fuentes de N₂ para los cultivos son los fertilizantes orgánicos e inorgánicos de N₂ y la fijación simbiótica de N₂, si bien el N₂ de la atmosfera puede ser una fuente infinita de N₂ para la elaboración de fertilizantes, este proceso industrial requiere grandes cantidades de energía por esto, la fabricación industrial de fertilizantes minerales no puede considerarse un recurso renovable debido a que depende de un consumo elevado de energía que se obtiene a partir de recursos no renovables; además de que estos tienen impacto negativos en el ambiente como la contaminación del agua (contaminación por nitratos) y la atmosfera (emisión de gases de efecto invernadero) (Quemada *et al.*, 2017).

2.3. Generalidades de las especies

México es el centro de origen y domesticación de muchas plantas incluyendo las hortalizas. Las hortalizas, son un alimento fundamental por su alto contenido nutricional ya que contienen agua, fibra, minerales y vitaminas, además de que tienen una baja densidad de calorías y carecen de grasas formando parte esencial de la dieta de los humanos (CEDRSSA, 2020). Las hortalizas son plantas herbáceas anuales o perennes y según la especie, se pueden consumir de forma cruda o cocida. Se clasifican en tres grupos ya sea la parte comestible de la planta: hortalizas de hoja y flor, de fruto, de bulbo y raíz (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, 2016).

2.3.1. Acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la acelga (USDA Plants Database, s. f.-a)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Genero	Beta
Especie	<i>Beta vulgaris</i>
Subespecie	<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>

Existen datos de este cultivo desde el siglo V a.C en Grecia y desde entonces ha sido un alimento base en la nutrición desde hace mucho tiempo y actualmente. Las hojas se utilizan crudas en una ensalada o cocidas junto con los tallos, es rica en fitopigmentos, flavonoides y minerales con propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, también contiene ácido alfa-lipoico, esta relaciona con niveles bajos de glucosa y una mayor sensibilidad a la insulina (Gamba *et al.*, 2020).

Esta planta destaca por sus grandes hojas de color verde brillante y sus nervios marcados, los tallos pueden ser blancos amarillos o rojos, esto depende de la variedad de acelga, las más conocidas son la amarilla de Lyon, se caracteriza por grandes hojas de color verde amarillo muy claro con tallos de color blanco y una anchura de sus hojas de 10 cm y la variedad verde con tallo blanco Bressane, pues tiene hojas muy onduladas de color verde oscuro con un tamaño de hasta 15 cm (Agricultura y Desarrollo Rural, 2018). Crece mejor en climas templados, en suelos ricos en materia orgánica, es tolerante a las heladas y la alta humedad favorece a la planta (FAO, 2011).

En México en el 2020, se produjeron alrededor de 12 mil toneladas de acelga, siendo Puebla el estado con mayor producción de esta hortaliza en el país (Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

2.3.2. Cebolla (*Allium cepa* L.)

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la cebolla (USDA Plants Database, s. f.-b)

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Liliidea
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Genero	Allium
Especie	<i>Allium cepa</i> L.

La palabra cebolla proviene del latín “unió” que significa “uno” o “único” pues esta planta produce un solo bulbo y es una de las verduras más antiguas ya que se hace mención en varias escrituras antiguas, debido a su importancia es demandada por todo el año, eso la convierte en el tercer cultivo más esencial en el mundo después de la papa y el tomate (Teshika *et al.*, 2018).

Su origen viene de Asia central por las regiones de Afganistán, Irán y Turkmenistán. La cebolla es una planta bienal de estación fría que tolera las heladas, se desarrolla mejor en temperaturas que van de los 12.8 °C a los 20°C.

Sus raíces son adventicias y fibrosas, el tallo real es reducido en la base, contiene de 3 a 8 hojas alternas que son dísticas, es decir, que las hojas salen en ambos lados del tallo formando dos hileras en lados opuestos, que se producen desde el ápice del tallo, la lámina de las hojas es cilíndrica que se vuelve hueca. El bulbo está conformado por escamas, a poca distancia por encima del tallo, el bulbo maduro es globoso ovoide o alargado, de tamaño variable. Sus flores son estrelladas a campanuladas de 3-7 mm; tépalos más o menos extendidos, de color blanco a rosado; estambres exertos; anteras blancas: polen blanco (Lim, 2014).

La cebolla tiene muchas acciones que son beneficiosas, cuando se consume, pues se sabe que contiene muchas vitaminas, minerales, aminoácidos azufrados, flavonoides y fitoesteroles, aunque también se utiliza para aliviar ciertos dolores incluyendo problemas digestivos, enfermedades en la piel, enfermedades metabólicas, picaduras de insectos entre otros, su gran actividad antimicrobiana se ha puesto a prueba pues muchas bacterias, hongos y virus son susceptibles a diferentes extractos de solventes (Teshika *et al.*, 2018)

En México es la tercera hortaliza que más se produce y a nivel mundial ocupamos el puesto 16 en la producción de cebolla, en el 2023 se produjeron 296 mil 271 toneladas de esta hortaliza donde Chihuahua fue el estado con mayor producción. (Agricultura y Desarrollo Rural, 2023).

2.3.3. Pápalo (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cass. var. *macrocephalum*

Tabla 3. Clasificación taxonómica del pápalo (Lara *et al.*, 2011)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliposida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Tribu	Heliantheae
Subtribu	Pectidinae
Género	<i>Porophyllum</i>
Especie	<i>Porophyllum ruderale</i>
Variedad	<i>Macrocephalum</i>

Los quelites son un grupo de plantas herbáceas como leñosas, cuyas partes vegetativas (hojas, tallos y ramas modificada), son consumidas de diferentes formas, el nombre quelite viene del término náhuatl “quilit”, haciendo referencia a una planta tierna comestible (Mera-Ovando *et al.*, 2011), dentro de estos destaca el pápalo o papaloquelite, pues esta planta es de origen mexicano y se extiende hasta Sudamérica, ha sido utilizado como verdura desde épocas prehispánicas ya que era consumido en crudo, en estado fresco acompañado de otros alimentos como se hace actualmente, donde a la planta se le realizaban podas en las ramas tiernas antes de que floreciera (Lara *et al.*, 2011).

Esta hierba tiene un sabor fuerte y único, su uso no solo es gastronómico, sino también medicinal, pues se utiliza para cerrar heridas y aliviar dolor en general (Conde-Hernández & Guerrero-Beltrán, 2014).

En cuanto a su descripción morfológica, es una planta que puede medir hasta 1.5 m de alto, con un tallo ramificado con hojas opuestas a alternas ovaladas con un tamaño de 5 cm de largo, redondas del ápice y con el margen ondulado, inflorescencia de cabezuelas, en cuanto al fruto es seco e indehisciente, contiene una semilla de forma cilíndrica y larga de color negro de un tamaño de 1 a 1.5 cm de largo, en el ápice, se encuentra el vilano conformado por estructuras largas y delgadas de color café claro (Hanan y Mondragón, 2009). Tiene un mejor desarrollo en climas cálido-húmedo o subhúmedos, necesita de suelos francos a arcillosos con presencia de materia orgánicas, requiere de sol directo o sombra ligera (SIAP, 2022).

De acuerdo con (Agricultura y Desarrollo Rural, 2021) la producción de pápalo en México creció un 21%, los principales productores fueron Guerrero con 4597 toneladas, Morelos 1210 y Puebla con 1008 toneladas.

2.4. Investigaciones previas.

Se han realizado investigaciones de microorganismos que son favorables en el crecimiento de plantas de importancia comercial, ya que son una buena opción para sustituir a los fertilizantes químicos tal es el caso de Venegas-González *et al.* (2019) que evaluaron el efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* (A1 y CH90_3T), *Thichoderma harziamun* (Th_C2) y en combinación con sustratos orgánicos en el crecimiento de la acelga (*Beta vulgaris. cicla*), en la producción de biomasa fresca y seca en tres cosechas con una sola inoculación. Sus resultado muestran que, en la segunda cosecha, el tratamiento de la cepa CH90_3T tuvo un mayor rendimiento del 27% en masa fresca con respecto al testigo, y la combinación de las cepas A1+ CH90_3T presentó un 38% menos en rendimiento que el testigo. Para la tercera cosecha, el peso fresco fue de 750.1g de la inoculación de la cepa CH90_3T mientras que la combinación de CH90_3T + Th_C2 presento un peso fresco de 220.46 g. Los pesos totales muestran que la cepa CH90_3T y A1 fueron favorable sobre la biomasa fresca de acelga.

En cuanto a la biomasa seca de la acelga los efectos se muestran desde la primera cosecha pues las combinaciones de las cepas A1 + Th_C2, A1 + CH90_3T y CH90_3T + Th_C2 y CH90_3T + Th_C2+A1 y el tratamiento A1 mostraron diferencias estadísticas significativas, en la segunda cosecha los tratamientos CH90_3T, A1, Th_C2, A1 + Th_C2 el peso seco se vio favorecido, pero en la tercera cosecha no hubo diferencias significativas. Concluyen que la bacteria *B. subtilis* tuvo una influencia positiva en la producción de materia fresca y seca de la acelga.

Por otro lado, Martínez *et al.* (2013), aislaron e identificaron cuatro rizobacterias de genero *Bacillus* que fueron evaluadas en la germinación y crecimiento de plántulas en el tomate (*Lycopersicum esculentum*) y el pimiento (*Capsicum annunm L.*) cuyas bacterias se denominaron MA04, MA06, MA12 y MA17. Además, evaluaron los efectos de la inoculación de las bacterias en la semilla del tomate y observaron que MA04 y MA17 aumentaron el porcentaje de germinación entre en 5 y 6%, mientras que en las plántulas después de los 30 días de iniciar las pruebas, las cepas MA06 y MA12 aumentaron de manera significativa el diámetro del tallo, el peso fresco y seco del vástago de las plántulas aumentado la biomasa entre el 17 y 20%, ninguna cepa tuvo efecto

significativo en el peso de la raíz. En las semillas del pimiento la cepa MA06 mejoro la germinación en un 7%, con la cepa MA12 hubo incrementos en las variables evaluadas aumentado un 37% la biomasa de la planta y con la cepa MA17 solo mejoro el peso fresco del vástago aumentando la biomasa un 16%, por lo que MA12 fue la que presentó un mejor efecto sobre las plántulas de tomate y pimiento.

Quishpe *et al.* (2021) evaluaron la efectividad de microorganismos de diferentes suelos andinos de cultivos de amaranto (*Amaranthus quitensis Kunth*), mora (*Rubus glaucus Benth*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza Bancr.*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en la germinación y crecimiento de plántulas de tomate y lechuga, midieron los días de la germinación, altura de la planta, número de hojas. Seleccionaron 12 cepas para la evaluación, las bacterias se asemejaban al género *Azotobacter sp.*, Para los días de germinación en las semillas del cultivo de lechuga no se encontraron diferencias significativas, sin embargo en los cultivos del tomate se observó diferencia significativas con los tratamientos de dos cepas aisladas en el amaranto (AR2, AS2) y una cepa del mora (MR1) pues se observó un adelanto en el tiempo de germinación de 3-4 días en comparación al control sin inocular. En cuanto al crecimiento de las plantas la mayoría de las cepas tuvieron efectos significativos en la altura y número de hojas de las plantas de tomate y lechuga en el caso de la lechuga los efectos se observaron a los 28 días de la germinación donde, 9 cepas aumentaron el crecimiento en un rango del 45-125%, con respecto a las plantas de tomate sin inocular se observaron los mismos resultados, la cepa MR4 fue la que produjo un mayor aumento.

Otro de los trabajos realizados por López-Alcocer *et al.* (2020) observaron la eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de 27 cepas de *Rhizobium spp.*, utilizaron la variedad de frijol cuarenteño y evaluaron la longitud de vástago y de la raíz, peso seco de vástago y de raíz, número de nódulos y peso seco de nódulos. Obtenieron una altura en promedio del vástago de 37.2 cm con la cepa Rhizojal SA3, sobresaliendo al testigo con una altura de 28.1 cm y al testigo fertilizado con 32.1 cm, aunque 5 cepas iguales a Rhizojal SA3 mostraron alturas superiores de los 35 cm. En cuanto a la longitud de la raíz no se observó algún efecto de las cepas sobre esta variable. Sin embargo, en el peso seco de vástago

la cepa Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP3 con un peso de 1.25 g, sobrepasaron al testigo con un peso de 0.97 g mientras que en el peso seco de la raíz la cepa Rhizojal BH3 con un peso de 0.86g superó al testigo con 0.48g y al testigo fertilizado con 0.47g. En el número de nódulos seis cepas superaron al testigo que contenía un total de 162 nódulos, destacando Rhizojal VC3, Rhizojal ZGZ3 y Rhizojal ZCB3 con más de 340 nódulos por planta, en el peso seco de nódulos la cepa Rhizojal ZCB3 presentó 137 mg superando al testigo fertilizado con 65 mg; otras cepas iguales a Rhizojal ZCB3 como Rhizojal VC3, Rhizojal ZAT1 y Rhizojal TP2 tuvieron valores altos.

Hernández-Chontal *et al.* (2020) analizaron y evaluaron la efectividad de *Azospirillum* spp sobre el contenido nutrimental de la moringa (*Moringa oleifera* Lam.), aislaron la bacteria de suelo rizosférico de cacahuate forrajero (*Arachis pinto*), en cantidades diferentes (0.5, 1, 1.5 ml) a una concentración de 9.8×10^5 ml, evaluaron peso seco en hojas y tallo, proteína cruda, macro y micronutrientes, no se encontraron diferencias significativas en el peso seco de hojas y tallo al igual que en el contenido de proteína, en cuanto al contenido nutrimental de las hojas se encontraron diferencias significativas en el contenido de K, pues los tratamientos T₁AZ (0.5 ml de suspensión) y T₂AZ (1 ml de suspensión) fueron los que mostraron mejores resultados por otra parte en el tallo de la moringa se encontraron diferencias significativas para el contenido de Ca, Na y Fe, pues el tratamiento control fue el mejor para el contenido de Ca para el Na fueron los tres tratamiento de *Azospirillum* y para el Fe el mejor fue T₁AZ.

Granda Mora *et al.* (2016,) determinaron el efecto de la inoculación de cepas de *Rhizobium*, sobre *Phaseolus vulgaris* cv Mantequilla evaluaron los parámetros de nodulación, biomasa, fijación de nitrógeno y la eficiencia de la simbiosis en un lapso de 30 días después de la siembra, comprobaron que las cepas (CB1, RC2, PNI1, COL6, NAM1, VP1 y CNPAF512) formaron nódulos en la plantas pero no todas las plantas tenían el mismo número de nódulos, las cepas *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* COL6 y *R. etli* bv. mimosae VP1 mostraron altos valores en el número de nódulos. Con respecto a la biomasa nodular (masa fresca y seca) se observaron diferencias entre cepas, *Rhizobium tropici* RC2 a pesar de no tener el mayor número de nódulos la biomasa nodular

alcanzó valores muy altos en la masa fresca y sin diferencias significativas con *Rhizobium mesoamericanum* NAM1 con respecto a la masa seca, en cuanto a la fijación de nitrógeno se encontró una correlación positiva con el número de nódulos y las cepas *R. mesoamericanum* NAM1, *R. leguminosarum* bv. viciae COL6 y *R. etli*. PIN1 mostraron valores de nitrógeno fijado ≥ 0.5 con índices de efectividad de inoculación arriba del 60%, para la biomasa foliar no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. La cepa *R. etli* PIN1 mostro diferencias significativas en cuanto a la biomasa radical con respecto a los demás tratamientos.

Las cepas NAM1, COL6 y PIN1 mostraron resultados favorables en cuanto a la masa seca de la raíz, la masa del follaje y el porcentaje de nitrógeno total en el follaje con respecto al índice de efectividad de inoculación.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen la cualidad de convertir el nitrógeno atmosférico en moléculas que las plantas pueden absorber y utilizar. Debido a que la población ha incrementado en los últimos años y hay una alta demanda de consumo de hortalizas que tiene una gran importancia económica, la única manera de cubrir esta demanda es por medio de fertilizantes químicos, pero estos generan impactos negativos en el medio ambiente. Es por esto, que en la actualidad se sigue buscando alternativas como el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno, que puedan asociarse con diferentes especies de hortalizas pues no solo aceleran el proceso y la capacidad de producción de los cultivos, sino que también, reducen la utilización de fertilizantes químicos, asimismo, ayudan a disminuir la contaminación de suelos y del agua, a su vez, ayudan a mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero. Debido a esto, el presente estudio, se enfocó en reportar el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de plantas de haba y frijol, y la evaluación de su inoculación en la germinación y el crecimiento de plantas de pápalo, cebolla y acelga.

4. HIPOTESIS.

El uso de bacterias fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium* sp. que es un simbiote de leguminosas y *Azospirillum* sp. que es una bacteria de vida libre, influirá en la germinación de semillas y desarrollo de plantas de pápalo, cebolla y acelga.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la germinación y el crecimiento en tres tipos de hortaliza (pápalo, cebolla y acelga)

5.2. Objetivos particulares

- Aislar e identificar el género de los microorganismos bacterianos que se encuentran en los nódulos de las raíces del haba y del frijol.
- Evaluar la germinación de semillas de hortalizas mediante la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Evaluar la efectividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el crecimiento de las plantas de pápalo, cebolla, y acelga.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Origen del material microbiológico

Las bacterias se obtuvieron en el estado de Puebla, en la comunidad de San Francisco Cuautlancingo municipio de Chalchicomula de Sesma, se aislaron de cultivos de haba (*Vicia faba* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) la parcela agrícola ubicada en las coordenadas ($18^{\circ}59'36''$ y $18^{\circ}59'28''$ de latitud norte y entre los $97^{\circ}22'57''$ y $97^{\circ}23'56''$ longitud oeste)(Figura 4), se seleccionaron las plantas con presencia de nódulos bacterianos en las raíces y extrayendo la planta completa desde la raíz anotando el tipo de suelo, la altitud y lugar donde se encontraba la planta, posteriormente, se retiró toda la tierra con abundante agua para después mantenerlas húmedas envueltas en papel y poniéndolas en una bolsa de plástico para su traslado. La cepa de *Azospirillum* fue comprada en Microbiología de suelos (BIOFERTI-BUAP).

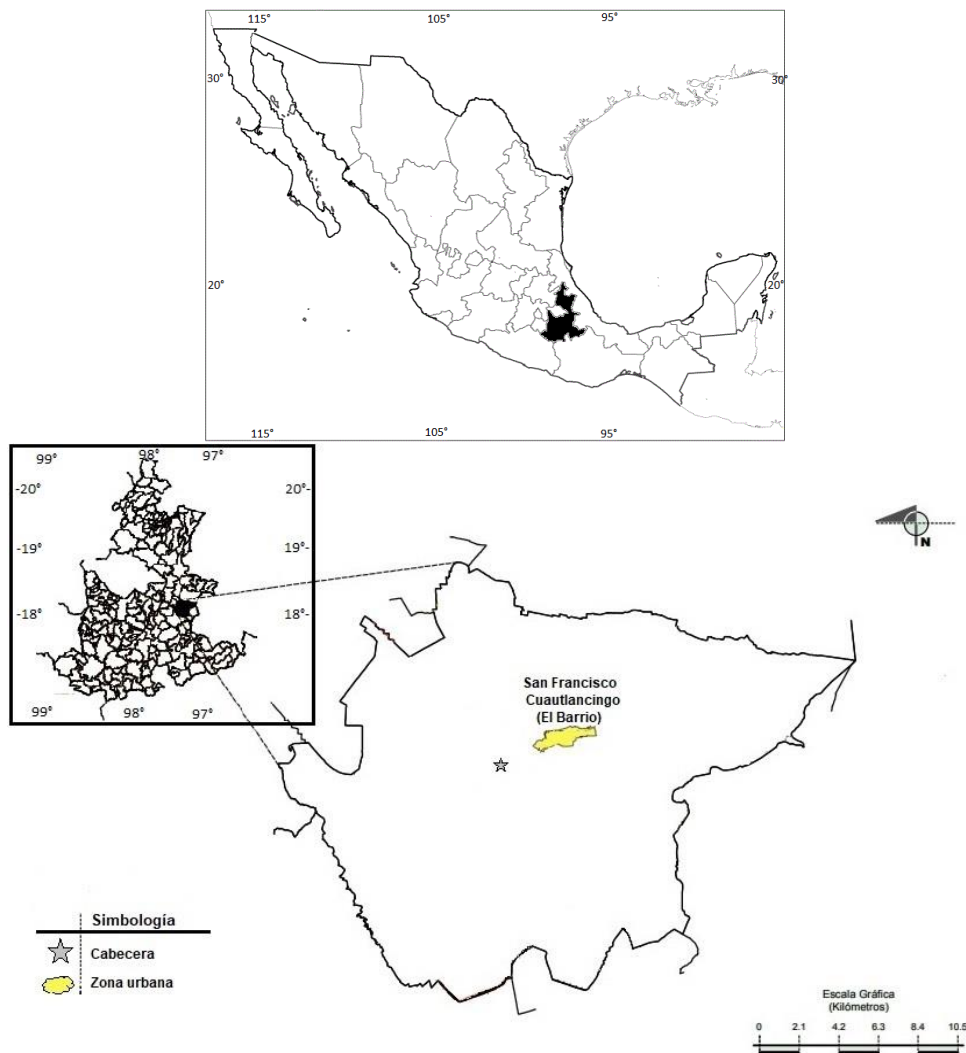


Figura 4. Ubicación de la zona de muestreo. (INEGI, 2010) (Modificada: Aislin C.H.)

6.2. Aislamiento de las bacterias

Se seleccionaron al azar 4 nódulos bacterianos de las raíces de ambas plantas, después se lavaron con abundante agua hasta retirar todo el exceso de tierra posteriormente, en una campana de flujo laminar se desinfectaron los nódulos con alcohol al 70% y fueron macerados con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una porción del macerado para sembrar en las cajas Petri con agar Luria Bertani (LBA) para incubarse a 27 °C durante 3 días.

6.3. Caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias.

Las bacterias se caracterizaron mediante la observación de las colonias en la placa y después se observaron en el microscopio con la tinción de Gram.

Las pruebas bioquímicas que se emplearon para la identificación de rizobios fueron:

Cultivo en medio Peptona Glucosa Agar (PGA) más verde de bromocresol.

Se preparó el medio de cultivo conforme a las instrucciones generales y se empleó verde de bromocresol en lugar de púrpura de bromocresol. El medio se vertió en cajas de Petri hasta que gelificó, se sembró el cultivo por duplicado y se incubó a 28°C por 5 días.

Cultivo en medio Levadura Lactosa Agar (LLA) + reactivo de Benedict.

Se preparó medio de cultivo (LLA) se vertió en cajas de Petri, sembrando por duplicado el cultivo y se incubó a 28°C por 5 días, al observar crecimiento bacteriano se agrugaron 5 ml del reactivo de Benedict durante 10 minutos, si se observaba un cambio de coloración amarillo después de la aplicación, indica la presencia de *Agrobacterium*. (CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988).

6.4. Preparación y conteo de inóculos bacterianos

Para la producción de inóculo líquido, se utilizó Caldo Levadura manitol y Caldo Luria Bertnani, se inocularon con 2 a 3 asadas del cultivo correspondiente y se metieron en la incubadora orbital a 30°C por 5 días a una agitación de 100 rpm. Se hizo el conteo por cuenta viable, tomando en

cuenta una concentración de 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) ml^{-1} (Marquina *et al.*, 2018).

6.5. Diseño experimental

Tabla 4. Tratamientos de germinación de semillas en días y crecimiento de plantas de cebolla, acelga y pápalo.

Tratamientos de germinación de semillas en días y crecimiento de plantas de cebolla, acelga y pápalo

<i>Rhizobium sp.</i>	<i>Azospirillum sp</i>	Control sin inocular
----------------------	------------------------	----------------------

Se colocaron 30 semillas de cada hortaliza en una caja de Petri, teniendo un total de 270 semillas, se observaron las semillas germinadas a lo largo de 15 días. Para obtener el porcentaje de germinación (PG) se calculó con la fórmula $PG = [(N^\circ \text{ semillas germinadas}) / (N^\circ \text{ semillas sembradas})] \times 100$ (Caroca *et al.*, 2016).

Para las plantas en invernadero se utilizó un diseño experimental al azar, 54 plantas por tratamiento y 54 plantas del control, 18 por cada hortaliza, teniendo un total de 162 plantas de las cuales se cosecharon 6 plantas por tratamiento.

6.6. Desinfección e inoculación de semilla en placa

Se utilizaron semillas de pápalo y acelga de la marca Eterno, la semilla de cebolla es de cosecha reciente donada por el Dr. Daniel Shiuanca, las fueron lavadas con abundante agua destilada estéril (ADE) hasta eliminar restos de fungicidas., posteriormente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por 15 min, después se lavaron varias veces con ADE hasta estar totalmente enjuagadas y se colocaron 30 semillas de cada hortaliza en cajas de Petri, con dos círculos de papel filtro, separados con una capa de algodón humedecida con ADE. Cada semilla se inoculó con 10 μL . (10^8 UFC) de los cultivos bacterianos correspondientes y un control sin inocular, todo esto se realizó en un ambiente estéril (Marquina *et al.*, 2018).

6.7. Siembra de pápalo, cebolla y acelga y preparaci3n del sustrato. Se sembraron un total de 66 semillas de cada hortaliza dando un total de 198 plantas en un semillero, las plántulas crecieron por tres semanas y posteriormente se trasplantaron a bolsas con tierra.

Se prepar3 un sustrato con tierra de hoja encino (materia orgánica), arena y tepezil (roca volcánica ligera) en proporciones iguales, posteriormente se mezclaron y se llenaron 90 bolsas para invernadero que fueron etiquetadas de acuerdo con los tratamientos correspondientes y el número de r3plica.

6.8. Inoculaci3n de plantas de pápalo, cebolla y acelga en invernadero. El experimento se realiz3 en los invernaderos de la Facultad de Ciencias Biol3gicas ubicado en la parte sur del campus de Ciudad Universitaria de la Benem3rita Universidad Aut3noma de Puebla, para el pápalo y la cebolla, se colocaron tres plantas por bolsa y para la acelga una planta por bolsa, la inoculaci3n de las bacterias fue en forma líquida agregando 3 ml del medio a una concentraci3n de 3.27×10^6 UFC ml a cada una de las plantas con las bacterias correspondientes a cada tratamiento.

6.9. Evaluaciones.

Para evaluar la evoluci3n de los diferentes tratamientos en las plantas de cebolla, pápalo y acelga, se monitoreo la altura (cm), peso total (g), peso de raíz y peso de hojas en húmedo, tamaño de hojas, peso de raíz, hojas y peso total de la planta en seco (g), en tres cortes de cada 15 días a partir del momento de la inoculaci3n, además se calcul3 el índice de efectividad de la inoculaci3n (IEI) expresado en porcentaje $IEI = \frac{[Trat\ Inoculaci3n - Control\ sin\ inocular]}{Control\ sin\ inocular} \times 100$ (Santillana *et al.*, 2005), el material se coloc3 en bolsas de papel previamente rotuladas y llevadas a un horno de secado a una temperatura de 46 C por 24 horas para la determinaci3n del peso en seco y pesándose en una balanza analítica marca OHAUS.

6.10. Análisis estadístico

En el análisis de los resultados, se realizó una ANOVA multifactorial con un valor de significancia $p \leq 0.05$, donde el valor de α era menor, se tomaba como diferencia significativa en nuestros análisis. Después del análisis ANOVA, se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey para ver los grupos diferentes y ubicar los mejores tratamientos en las diferentes variables examinadas. Se utilizó el programa STATGRAPHICS versión centurión XVI.

7. RESULTADOS

7.1. Características morfológicas y pruebas bioquímicas.

Se aislaron dos cepas de bacterias a partir de nódulos recolectados en campo. Las características morfológicas a nivel colonia se observan en la figura 5, donde pueden distinguir colonias de color blanco con forma circular, convexas, semi traslucidas y mucilaginosas tanto en la cepa del haba como la del frijol. Por otro lado, en la placa de las bacterias obtenidas del nódulo del frijol, se observaron colonias pequeñas, lisas y de un color amarillo opaco.

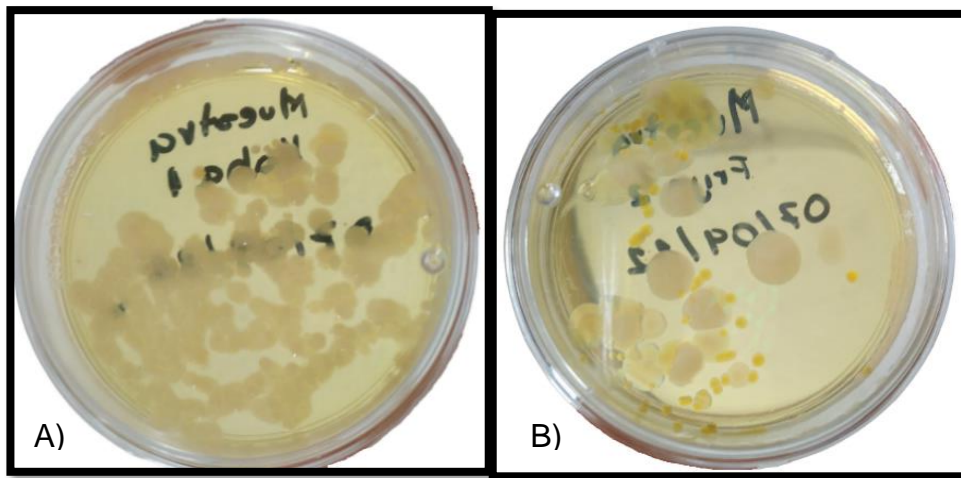


Figura 5. Cultivos de bacterias aisladas de nódulos bacterianos A) planta de haba y B) frijol.

A nivel microscópico, no se puede distinguir ninguna característica en las colonias amarillas. Sin embargo, las colonias blancas se sometieron a tinción de Gram para ser observadas al microscopio, revelando bacilos Gramnegativos móviles de tamaño corto como se muestra en la figura 6.

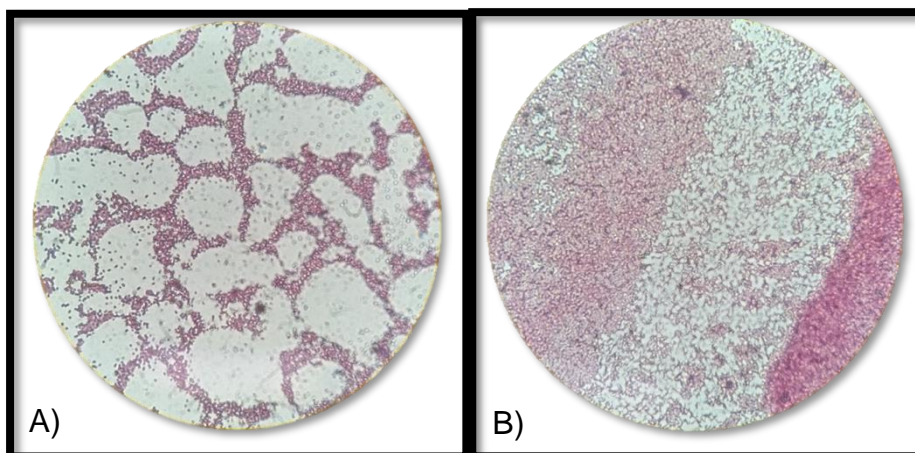


Figura 6. Tinción de Gram de bacterias, vista al microscopio en 40x: frijol A) y haba B)

Para la identificación de las bacterias mediante dos pruebas bioquímicas, la primera consistió en un medio PGA+ VBC en el cual después de cinco días de incubación (figura 7), no se observó crecimiento bacteriano en el cultivo de las bacterias aisladas de los nódulos del haba, por lo que, esto confirmo la presencia de rizobios, sin embargo, en la cepa de frijol denoto un cambio en el pH y en el crecimiento, provocando que el medio cambiara a un color verdoso, indicativo de descarte de rizobios.

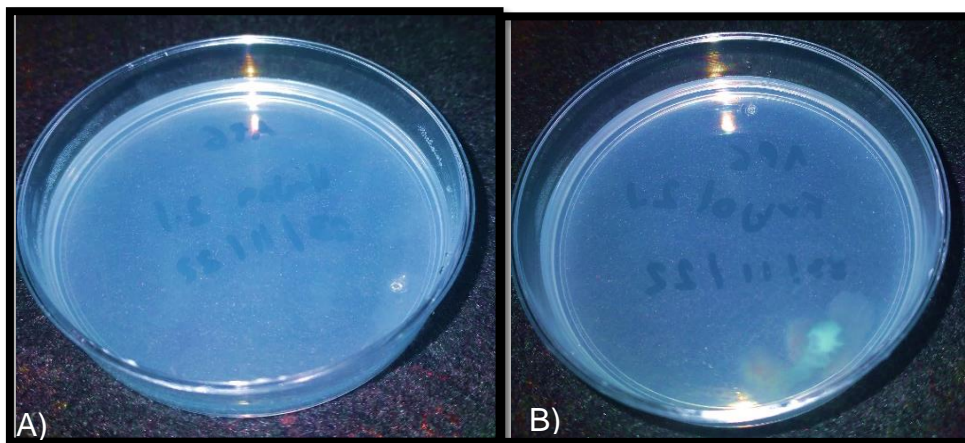


Figura 7. Pruebas de identificación en cepas de frijol A) y haba B) PGA +VB.

Debido a que la cepa del frijol no fue un rizobio, se descartó para la prueba del medio LLA + RB. No obstante, este medio se aplicó para la cepa del haba, de igual manera, se incubo cinco días el medio, una vez que se observó crecimiento bacteriano se agregó el reactivo de Benedict, dejando pasar diez minutos, una vez pasado el tiempo no se observó ningún cambio de coloración a amarillo, confirmando la presencia de *Rhizobium* (figura 8).



Figura 8. Prueba de identificación en cepa de haba LLA+RB

7.2. Efecto de *Rhizobium* y *Azospirillum* sobre la germinación de semillas de pápalo, acelga y cebolla.

El porcentaje de germinación (figura 9) mostró que las semillas de pápalo que fueron inoculadas con *Azospirillum* alcanzaron el máximo germinativo al tercer día, siendo un 53.33% de las semillas germinadas, al igual que el control sin inocular con un porcentaje del 53.33%, por otro lado, las semillas que se inocularon con *Rhizobium*, aunque su máximo germinativo también fue al tercer día el porcentaje de germinación solo fue del 33.33%.

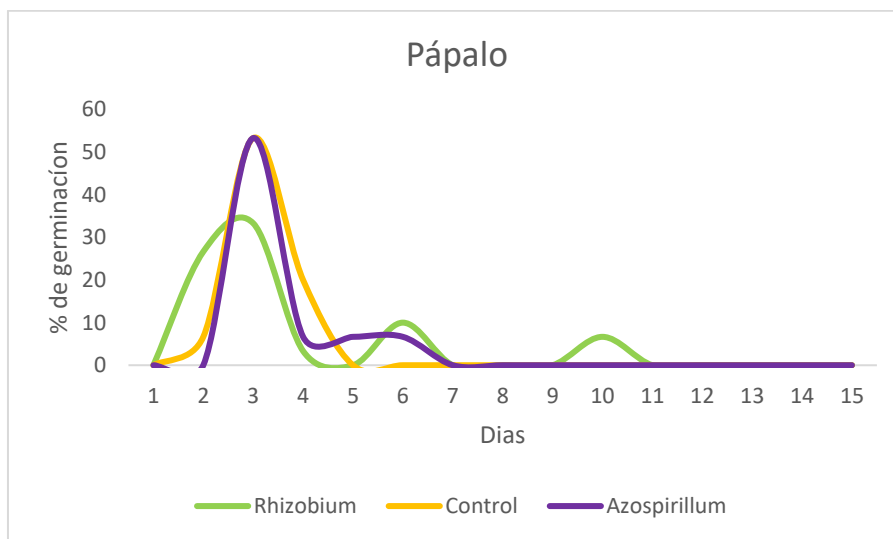


Figura 9. Porcentaje de germinación de semillas de pápalo inoculadas con cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y control sin inocular.

Con respecto a la semilla de acelga (figura 10) como podemos observar, aquellas semillas que fueron inoculadas con *Rhizobium* alcanzaron el máximo germinativo al cuarto día, con un porcentaje del 13.33% al mismo tiempo que las semillas que fueron inoculadas con *Azospirillum* con un porcentaje de germinación del 16.66 %, con respecto al control sin inocular ya que su máximo germinativo fue al quinto día con un 10%.

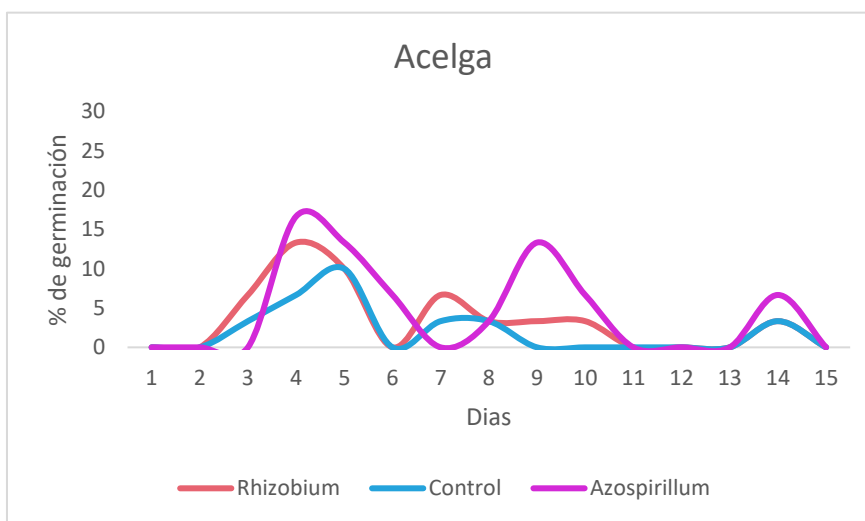


Figura 10. Porcentaje de germinación de semillas de acelga inoculadas con cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y control sin inocular.

Referente a las semillas de cebolla, si bien estas tuvieron los mismos tratamientos y estuvieron bajo las mismas condiciones, a medida que avanzaba el experimento, se observaron cambios notables en las muestras. En lugar de algún indicio de germinación, se comenzó a notar la presencia de un hongo patógeno en las semillas.

Las características morfológicas de las colonias del hongo eran de un micelio velloso de color blanco y debajo de las semillas, el papel filtro que contenía la caja tomo un color purpura, se tomó una muestra de este hongo y se observó bajo el microscopio revelando microconidios delgados, ligeramente curvados o rectos que contenían de tres a cuatro septos con esporas ovals (figura 11). De acuerdo con la característica fue identificado como *Fusarium*.

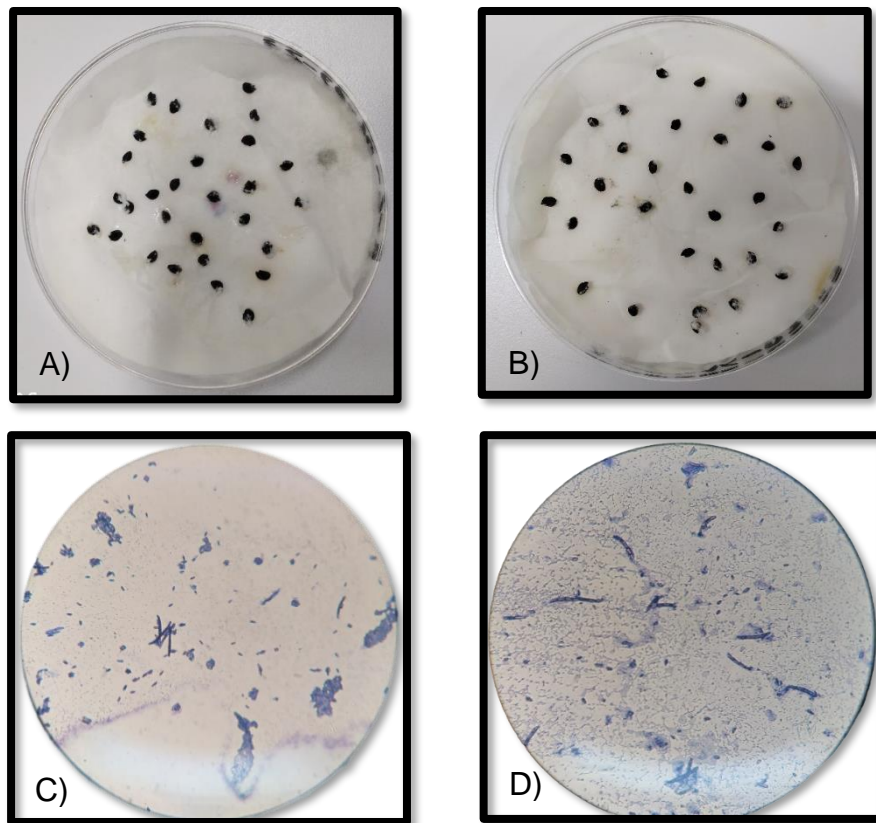


Figura 11. Semillas de cebolla infectadas con *Fusarium* en placa con tratamiento de *Rhizobium* y *Azospirillum* A) y B); vista microscópica de esporas de *Fusarium* en 40x en semillas de cebolla C) y D).

7.3. Efecto de *Rhizobium* y *Azospirillum* sobre el crecimiento de plantas de pápalo, cebolla y acelga.

El análisis realizado a cada una de las variables mostró diferencias significativas entre los tratamientos (tabla 5).

Tabla 5. Medias de altura, peso de raíz, masa total en húmedo, peso de hojas en húmedo, numero de hojas e índice de efectividad de inoculación de plantas de pápalo, cebolla y acelga inoculadas con cepas de *Rhizobium* y *Azospirillum*.

	Pápalo		IEI (%)	Cebolla		IEI (%)	Acelga		IEI* (%)
Tratamientos					Altura Tallo (cm)				
Azospirillum	27.15±3.24a*		42	20.75±1.50a		20	19.9±2.97 ^a		-
Rhizobium	22.61±4.06ab	$\alpha=0.01$	18	16.83±3.50b	$\alpha=0.04$	-	19.55±2.11 ^a	$\alpha=0.93$	-
Testigo	19.1±9.82b*		-	19.73±2.27ab		-	20.25±4.13 ^a		-
					Peso de Raíz (g)				
Azospirillum	0.416±0.11a		127	0.156±0.17a		-	0.48±0.11b		-
Rhizobium	0.266±0.10b	$\alpha=0.008$	45	0.031±0.03ab	$\alpha=0.07$	-	0.55±0.16ab	$\alpha=0.005$	-
Testigo	0.183±0.11b		-	0.031±0.01b		-	0.9±0.45a		-
					M total en H (g)				
Azospirillum	4.23±1.26a		106	0.51±0.09 a		20	6.18333±0.89b		-
Rhizobium	2.45±1.03b	$\alpha=0.013$	19	0.243±0.09b	$\alpha=0.009$	-	5.86667±1.71b	$\alpha=0.0053$	-
Testigo	2.05±1.23b		-	0.425±0.17a		-	12.3667±5.29a		-
					Peso hojas en H (g)				
Azospirillum	2.55±0.72a		107	0.436±0.07a		22	0.48±0.62b		-
Rhizobium	1.46±0.58b	$\alpha=0.009$	18	0.123±0.06b	$\alpha=0.001$	-	0.55±1.18ab	$\alpha=0.005$	-
Testigo	1.23±0.72b		-	0.355±0.17a		-	0.9±3.44 ^a		-

*Letras diferentes indica diferencia estadística en los tratamientos

*IEI: Índice de efectividad de inoculación

Empezando por la altura que presento diferencias estadísticas pues se observó que en las plantas de pápalo inoculadas con *Azospirillum* ($\alpha=0.01$) tuvieron una mayor altura (27.15 cm), aumentando un 42% en comparación con las que fueron inoculadas con *Rhizobium* (22.61 cm), con un 18% aunque ambos tratamientos superaron al testigo (figura 12).

En cuanto a las plantas de cebolla que se inocularon con *Azospirillum* hubo un aumento de la altura, un 20% con respecto al testigo (20.75 cm), sin embargo, el testigo superó a aquellas plantas que fueron inoculadas con *Rhizobium* (19.73 cm) ($\alpha=0.04$). Respecto a las plantas de acelga no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (figura 13).



Figura 12. Efecto de *Azospirillum* (izq.) y *Rhizobium* (dcha.) en el crecimiento del pápalo.

En el peso de la raíz en húmedo, se muestran diferencias estadísticas ($\alpha=0.008$) entre tratamientos pues las plantas de pápalo inoculadas con *Azospirillum* presentan un promedio más alto en masa de la raíz en húmedo (0.416 g), aumentando un 127% el peso con respecto a las plantas que fueron inoculadas con *Rhizobium* (0.266 g) con 45%, no obstante, ambos tratamientos superan al testigo sin inocular (0.183 g). Acerca de las plantas de acelga el testigo sin inocular obtuvo una mayor masa (0.9 g), por lo que superó a ambos tratamientos ($\alpha=0.005$), por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en plantas de cebolla con respecto a esta variable.

Con relación a la masa total en húmedo, se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha =0.013$) ya que las plantas de pápalo inoculadas con *Azospirillum* aumentaron un 106% su masa total (4.23 g) que el testigo, pero también aquellas que fueron inoculadas con *Rhizobium* (2.45 g) donde un hubo un aumento del 19% rebasando ligeramente al testigo sin inocular (2.05 g). En las plantas de cebolla que fueron inoculadas con *Azospirillum* se encontró un aumento del 20% en la masa total (0.51 g) que el testigo ($\alpha=0.009$), pero el testigo supero (0.425 g) aquellas plantas que estuvieron inoculadas con *Rhizobium* (0.243 g). Sin embargo, en las plantas de acelga el tratamiento que tuvo una cantidad mayor en la masa total fue el testigo ($\alpha= 0.0053$) (12.36 g) superando considerablemente a ambos tratamientos.



Figura 13. Efecto de *Azospirillum* (dcha..) y *Rhizobium* (izq.) en el crecimiento de la acelga.

Por otro lado, en el peso de las hojas en húmedo se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha = 0.009$) en las plantas de pápalo pues las plantas inoculadas con *Azospirillum* pues se obtuvo un aumento del 107% en el peso de las hojas (2.55 g), dejando en segundo lugar a *Rhizobium* con un 18% (1.46 g) y ambos tratamientos sobrepasaron al testigo. En plantas de cebolla ($\alpha = 0.001$) el tratamiento con *Azospirillum* tuvo un incremento del peso de un 22% (0.436 g) en las hojas rebasando al testigo (0.355 g) pero a su vez este rebasó al tratamiento con *Rhizobium* (0.123 g), mientras que en las plantas de acelga ($\alpha = 0.005$) el testigo supero a ambos tratamientos (0.9 g).

Por otra parte en el tamaño de las hojas también se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha = 0.006$) (tabla 6), pues el tratamiento con *Azospirillum* aumento el tamaño de las hojas de pápalo en un 42% (3.9 cm) que el testigo (2.73 cm), aunque también *Rhizobium* superó ligeramente al testigo pues aumento el tamaño en un 6% (2.9 cm), en cuanto a las hojas de cebolla el tratamiento con *Azospirillum* tuvo un incremento solo del 2% (14.45 cm) que el testigo (14.08 cm) y este quedó en segundo lugar, superando a las plantas que se inocularon con *Rhizobium* (10.91 cm) ($\alpha = 0.004$), mientras tanto el testigo obtuvo hojas más grandes (8.55 cm) en las plantas de acelga superando levemente a los tratamientos con las bacterias inoculadas ($\alpha = 0.05$).

En cuanto a la variable del peso de la raíz en seco, se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha=0.0065$) ya que las plantas de pápalo inoculadas con *Azospirillum* incremento un 112% el peso en seco (0.0728 g) con respecto al testigo (0.0343 g), mientras que las que fueron inoculadas con *Rhizobium* incremento solo un 8% (0.0371 g) superando ligeramente al testigo. En cuanto a las plantas de cebolla y de acelga no existió diferencias estadísticas entre los tratamientos con respecto a esta variable.

Sobre la variable del peso en seco de las hojas, se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$) en plantas de pápalo, pues las que fueron inoculadas con *Azospirillum* obtuvieron un incremento del 174% en el peso seco de las hojas (0.406 g), no obstante, aquellas que fueron inoculadas con *Rhizobium* tuvieron un incremento en el peso de un 72% (0.256 g), ambos tratamientos superando al testigo sin inocular (0.148 g). Mientras tanto con las plantas de acelga ($\alpha=0.01$) resultó que aquellas plantas que formaron parte del testigo obtuvieron un mayor peso (0.683 g) que las plantas inoculadas con *Azospirillum* y *Rhizobium* (0.418 g y 0.333 g), por último, no se encontraron diferencias estadísticas en los tratamientos en peso de las hojas de cebolla.

Acerca de la variable masa total en seco, hubo diferencias estadísticas ($p=0.0002$), donde las plantas de pápalo inoculadas con *Azospirillum* obtuvieron un incremento del 156% (0.618 g) que las plantas inoculadas con *Rhizobium* con un incremento del 11% (0.268 g) pero, ambos tratamientos rebasaron al testigo (0.241 g). En el caso de las plantas de acelga ($\alpha=0.02$) el testigo sobrepasó a ambos tratamientos teniendo un mayor peso (0.911 g), referente a las plantas de cebolla no existió diferencias estadísticas entre los tratamientos. Con respecto al número de hojas no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Tabla 6. Medias de tamaño de hojas, peso de raíz en seco, peso de hojas es seco masa total en seco e índice de efectividad de inoculación de plantas de pápalo, cebolla y acelga inoculadas con cepas de *Rhizobium* y *Azospirillum*.

	Pápalo		IEI (%)	Cebolla		IEI (%)	Acelga		IEI (%)
	Tamaño de hojas (cm)								
Azospirillum	3.9±0.41a		42	14.45±0.97a		2	7.05±0.97ab		-
Rhizobium	2.9±0.31ab	$\alpha = 0.006$	6	10.9167±1.68b	$\alpha = 0.004$	-	6.55±0.90b	$\alpha = 0.05$	-
Testigo	2.73±1.35b		-	14.0833±2.16a		-	8.55±1.89a		-
	Peso raíz en S (g)								
Azospirillum	0.0728±0.02a		112	0.006±0.003a		-	0.085±0.02b		-
Rhizobium	0.0371±0.01b	$\alpha = 0.0065$	8	0.004±0.002a	$\alpha = 0.31$	-	0.078±0.02ab	$\alpha = 0.06$	-
Testigo	0.0343±0.02b		-	0.004±0.002a		-	0.136±0.06a		-
	Peso de hojas S (g)								
Azospirillum	0.406±0.21a		174	0.0460.02±a		-	0.418±0.07b		-
Rhizobium	0.256±0.18ab	$\alpha = 0.05$	72	0.027±0.01a	$\alpha = 0.24$	-	0.333±0.09b	$\alpha = 0.01$	-
Testigo	0.148±0.08 b		-	0.0305±0.01a		-	0.683±0.31a		-
	Masa total en S (g)								
Azospirillum	0.618±a		156	0.040±0.03a		-	0.618±0.12ab		-
Rhizobium	0.268±b	$\alpha = 0.0002$	11	0.034±0.01a	$\alpha = 0.79$	-	0.458±0.14b	$\alpha = 0.02$	-
Testigo	0.241±b		-	0.043±0.02a		-	0.911±0.40a		-
	Núm. De hojas								
Azospirillum	11.5 ±2.16a	$\alpha = 0.27$	32	2.8±0.51a		-	5.83±1.16a		-
Rhizobium	11.0±1.89a		27	2.1±0.75a	$\alpha = 0.1$	-	6.83±1.32a	$\alpha = 0.25$	-
Testigo	8.66±4.54a		-	2.6±0.51a		-	6.66±0.51a		-

*Letras diferentes indica diferencia estadística en los tratamientos

*IEI: Índice de efectividad de inoculación

8. DISCUSIÓN

De acuerdo con lo reportado en esta investigación, las características morfológicas presentes en las cepas aisladas de las plantas de frijol y haba son similares a lo reportado por López-Alcocer *et al.*, (2017), donde aislaron cepas de *Rhizobium* en plantas de frijol, describiendo cepas de color blanco, de forma circular, convexas y lisas, estas características que también coinciden con las descritas por Valenzuela (2018), incluso la observación microscópica con la presencia de bacilos Gram negativos. Por otro lado, Granda-Mora *et al.*, (2013) encontraron las mismas características a nivel colonia describiendo colonias lisas de color blanco y nivel microscópico observando bacilos cortos Gram negativos características referentes al género *Rhizobium*.

Aunque solo se manejaron dos cepas para el medio PGA + VB, Matos *et al.* (2007) citado por Mulford *et al.*, (2012) plantean que la fermentación de la glucosa no es una fuente de carbono preferida por los rizobios por lo que, no es típico para el género *Rhizobium*, por lo que no se tomó en cuenta la cepa que tuvo el cambio de coloración en la placa.

Aguilar *et al.*, (2021) nos menciona que dentro de las leguminosas (familia Fabaceae) las especies más conocidas de hortalizas son *Phaseolus vulgaris* L. (frijol), *Vicia faba* L. (Haba), *Medicago sativa* L. (Alfalfa), *Lens culinaris* Medik (lenteja), entre otros. Esta familia es de importancia en los agroecosistemas pues incrementan la fertilidad de los suelos a través de la fijación simbiótica del nitrógeno a través de la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa según López-Ortiz *et al.*, (2012). Por lo que en los nódulos de las plantas que se recolectaron se encontró a *Rhizobium* una bacteria que se asocia en este tipo de plantas.

Las semillas que se inocularon con *Rhizobium* y *Azospirillum* alcanzaron su máximo germinativo entre el tercer y cuarto día, teniendo un porcentaje de germinación entre el 33% y 53% para las semillas de pápalo y un 10% al 20% en semillas de acelga, resultados similares a los obtenidos por Blanco *et al.*, (2018), que con una cepa de *Rhizobium* registraron al cuarto día de la germinación de semillas de pimientón, teniendo un porcentaje de germinación del 47% con respecto al control, caso contrario para las semillas de lechuga pues no hubo efecto promotor en la germinación con ninguna de las cepas utilizadas en este estudio. Mientras que Reyes *et al.*, (2008) describe que obtuvieron

incrementos en la germinación del pimentón cercanos al 10% con aislados de rizobios con la cepa 25 de *Rhizobium* sp., aunque esta cepa no incremento la germinación del maíz, fue más sensible a la inoculación de la cepa 23 de *Azospirillum* sp. con un incremento del 20%. La calidad de la semilla es una combinación de factores que determinan la capacidad de siembra que incluye atributos físicos, fisiológicos, genéticos y de salud que pueden verse afectados directamente por las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP) o (PGPR, por sus siglas en inglés), son microorganismos valiosos que pueden inducir la segregación de fitohormonas, como auxinas, ácido giberélico, ácido abscísico, y citoquinas que tienen un papel importante en el crecimiento de las plantas. Las giberelinas son fitohormonas que influyen en algunos procesos de desarrollo de plantas como la germinación, ya que actúan desde la ruptura de latencia, el crecimiento de los embriones hasta la emergencia de la plántula Sayyed y Gavicho Uarrota (2022).

Con relación a las semillas de cebolla, no se observó un efecto de las bacterias en la germinación, algunos estudios han reportado que hay una sensibilidad en las semillas ante diferentes sustancias inductoras por las rizobacterias, tal es el caso de Никитина *et al.*, (2004) que dependiendo de las concentraciones de lectina producidas por *Azospirillum* sp. estimulan o inhiben la germinación en semillas de cebolla y trigo. Sin embargo, se presentó la aparición de un hongo en las semillas, de acuerdo con las características que se observaron concuerdan con lo descrito por Rentería-Martínez *et al.*, (2018), quienes describen algunas especies de *Fusarium*, coincidentes con la especie *Fusarium oxypurum*; las semillas que presentaron este hongo tenían un aspecto veloso blanquecino y pintaron de color púrpura el lugar donde se encontraba la semilla. Esto puede deberse a que se encuentra una microflora en la semilla y que puede desarrollarse mejor en semillas con altos contenidos de humedad, además de tener temperaturas favorables que pueden provocar el crecimiento de hongos (Doria, 2010).

Son escasos los estudios sobre los efectos de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas como el pápalo, cebolla y acelga. Sin embargo, cabe mencionar que, si bien no se utilizaron las mismas especies vegetales para ese experimento, se utilizaron los mismos géneros bacterianos. Picazevicz *et al.*, (2017) reportaron

que las plantas de maíz inoculadas con *Azospirillum brasilense* aumentaron la masa seca de la raíz y la masa seca total en un 33%, por otra parte, mencionan que tuvieron una reducción de la altura y de la materia seca aérea del maíz con inoculación de *Rhizobium tropici*, por lo que, en este trabajo se obtuvieron resultados similares pues *Azospirillum* sp. presentó una mayor estimulación en el crecimiento de plantas de pápalo pues hubo un incremento del 40% al 160% en la mayoría de las variables evaluadas, como señalan Goswami *et al.*, (2016), las plantas responden a cualquier fitohormona de la rizosfera que haya sido complementada por la flora microbiana o que haya sido producida por la flora externa. Estas fitohormonas que son producidas por las RPCP que incluyen a *Rhizobium* y *Azospirillum*, pueden afectar procesos que incluyen el alargamiento, la división y la extensión de las células vegetales en raíces simbióticas y no simbióticas. El ácido indol-3-acético (IAA) es una fitohormona importante, ya que regula varias etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo el alargamiento, la división celular, la diferenciación de tejidos y ayudan en la dominancia apical, de igual modo las citoquinas también participan en estas respuestas fisiológicas, además tiene un impacto significativo en el crecimiento de las hojas, la ramificación, la producción de clorofila, la promoción de la germinación de las semillas y el retraso de la senescencia.

Por otro lado, Santillana *et al.*, (2005) obtuvieron un incremento del 64% al 70% en la materia seca total en plantas de tomate con tres cepas de *Rhizobium*, además de un incremento del 159% en la materia seca de la raíz, por lo contrario no encontraron diferencias significativas en la variable de la altura, esto difiere con lo encontrado en esta investigación, ya que en las plantas de pápalo el tratamiento de *Rhizobium* sp. fue inferior al tratamiento con *Azospirillum* sp. teniendo solo un incremento del 10% al 70% en la mayoría de las variables, siendo superior al tratamiento testigo. Con respecto a las plantas de cebolla, solo en las variables de la altura, masa total en húmedo y el peso de la hoja en húmedo, se observó un efecto de *Azospirillum* sp. ya que aumentó la biomasa en un 20%. Por otro lado, el estudio de Cruz Romero *et al.*, (2016), reportan la altura de plantas de cebolla de 21.35 cm y un peso seco de 0.09 g inoculadas con *Azospirillum* sp. valores superiores a los obtenidos en este trabajo (20.75 cm y

0.040 g), además el tratamiento testigo rebaso a las plantas de cebolla que estaban inoculadas con *Rhizobium* sp.

No se detectó un efecto de la inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum* en las plantas de acelga, ya que el testigo supero a ambos tratamientos en todas las variables. Valery & Reyes (2013) mencionan que la diversidad de respuestas que se obtienen con los inoculantes puede depender de varios factores, entre ellos las propiedades de la planta hospedera y los microorganismos inoculados, los cuales establecen competencia entre ellos por los exudados radicales de la planta, y los nutrientes del suelo.

Según Pereg *et al.*, (2015) las especies de *Azospirillum* tienen un impacto positivo en 113 especies de plantas, de las cuales 14 son gramíneas y el resto de ellas se encuentran 34 familias botánicas, incluyendo a la familia Asteraceae a la que pertenece el pápalo. La afinidad de *Azospirillum* a diferentes plantas puede deberse a que la conforman diferentes especies y cepas, también puede presentar otros mecanismos, sin una fijación segura a la planta, la lluvia o el riego pueden mover las bacterias del rizoplasma y dejar que mueran en el suelo al carecer de nutrientes, también mencionan que la relación entre *Azospirillum* y la planta es un mutualista una posible especificidad del huésped que involucra las células adheridas de *Azospirillum* y el huésped en cualquier nivel, ya sea generó, especie o cepas.

Otra de las razones por las que *Rhizobium* no fue tan efectivo en el crecimiento de las plantas, puede deberse a la concentración del inoculo, pues se utilizó una concentración de 3.27×10^6 UFC, es posible que a menor concentración de bacterias menos posibilidades existan de infectar a la planta hospedera. De acuerdo con Chipana *et al.* (2017) las concentraciones de *Rhizobium etli* en la inoculación de frijol, debe ser de 2.5×10^9 cel/ml, generando una efectividad del 84.02 % en la generación de nódulos, al igual que un mayor rendimiento de la planta. Por otra parte Lambers *et al.*, (2008) mencionan que la especificidad entre huésped-rizobio está determinada por el tipo de flavonoide que libera el huésped y la sensibilidad del rizobio para un tipo determinado de flavonoide, aunque esta es una opción, también la especificidad huésped- *Rhizobium*, se deba a la interacción de las lectinas del pelo de la raíz con carbohidratos específicos de la superficie bacteriana, por otra parte entre el 1 y 5% de todos los pelos

radiculares se infecta y sólo el 20% de estas infecciones provoca nódulos, esto se debe a la producción de quitinasas, en una fase temprana de la infección, el huésped produce una quitinasa que descompone los factores Nod de la especie de *Rhizobium*, de esta manera impide la entrada de bacterias que no puedan constituir una simbiosis, por lo tanto este es otro factor que atribuye a esta especificidad. Debido a que en cada una de las variables evaluadas el testigo supero al tratamiento con *Rhizobium* en las plantas de cebolla y acelga en las no hubo un efecto en el desarrollo, por ende no se logró establecer una simbiosis entre *Rhizobium* y estas plantas.

9. CONCLUSIONES

En base a los hallazgos obtenidos en este estudio de investigación, se presentan las siguientes conclusiones:

- Se identificó que el microorganismo aislado de los nódulos de la *Vicia faba* corresponde al género *Rhizobium* sp.
- *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. aceleraron la germinación reduciendo los días, mientras que *Azospirillum* sp. aumento el porcentaje de germinación en semillas de pápalo y acelga.
- *Azospirillum* sp. tuvo mayor efectividad en la mayoría de las variables evaluadas en plantas de pápalo, mientras que en la cebolla solo en la altura, masa total en húmedo y peso de hojas en húmedo.
- La acelga es una hortaliza que no es compatible con las bacterias *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. por ende no se observó un efecto en el crecimiento de las plantas.
- Seguir realizando estudios con bacterias fijadoras de nitrógeno con plantas que sean de consumo humano, ya que estas bacterias son una herramienta fundamental para lograr una producción de calidad en los alimentos y reducir los costos de producción, además de la conservación del medio ambiente al reducir el uso de fertilizantes nitrogenados.

10. BIBLIOGRAFÍA CITADA.

- Agricultura y Desarrollo Rural, S. (2020, 18 julio). *Acelga, una hortaliza muy nutritiva*. gob.mx. Recuperado 8 de septiembre de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/accelga-una-hortaliza-muy-nutritiva>
- Agricultura y Desarrollo Rural, S. (2021, 13 noviembre). *Crece 21 por ciento producciones de pápalo, el tradicional acompañante de los tacos*. gob.mx. Recuperado 29 de abril de 2024, de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-21-por-ciento-produccion-de-papalo-el-tradicional-acompanante-de-los-tacos?idiom=es>
- Agricultura y Desarrollo Rural, S. (2023, 10 mayo). *Certifica Agricultura inocuidad en producción y empaques de cebolla en Chihuahua*. gob.mx. Recuperado 29 de abril de 2024, de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/certifica-agricultura-inocuidad-en-produccion-y-empaques-de-cebolla-en-chihuahua?idiom=es#:~:text=Ciudad%20de%20M%C3%A9xico%2C%20a%2010%20de%20mayo%20de%202023.&text=La%20cebolla%20es%20la%20tercera,mill%C3%B3n%20451%20mil%20toneladas%20anuales>
- Aguilar, M. G., León, G. A. P., & Mejía, F. D. B. (2021). Familia Fabaceae. *ResearchGate*.
https://www.researchgate.net/publication/348788324_Familia_Fabaceae
- Atlas, M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental* (4.ª ed.). PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2.ª ed.). McGRAW-Hill.
- Bahuguna, V., Bhatt, G., Maikhuri, R., & Chandra, D. (2021). Nitrogen Fixation Through Genetic Engineering: A Future Systemic Approach of Nitrogen Fixation. En *Springer eBooks* (pp. 109-122).
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia*, 38(2), 21-29.
- Biseeling, T., & Geurts, R. (2020). Specificity in legume nodule symbiosis. *Science*, 620-621.

- Blanco, L., Castro, Y., Olivo, A., Skwierinski, R., & Barrios, F. M. (2018). Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas. *Bioagro*, 30(3), 207-218.
- Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J. M., Farías-Rodríguez, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo. Serie: Horticultura*, 173-178.
- Caroca, R., Zapata, N., & Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Chilean Journal Of Agricultural & Animal Science*, 32(2), 94-101.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. (CEDRSSA) (2020). Análisis de la producción y consumo de hortalizas. Recuperado 15 de mayo de 2024, de http://intra.cedrssa.gob.mx/files/b/13/88Ana%CC%81lisis_produccio%C3%81n_consumo_hortalizas.pdf
- Chipana, V., Clavijo, C., Medina, P. F., & Castillo, D. (2017). Inoculación de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) con diferentes concentraciones de *Rhizobium etli* y su influencia sobre el rendimiento del cultivo. *Ecología Aplicada*, 16(2); 91.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (1988). *Simbiosis Leguminosa-Rizobio* (1.ª ed.). Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/Digital/SB203.S541_Simbiosis_leguminosa-rizobio_Manual_de_m%C3%A9todos_de_evaluaci%C3%B3n,_selecci%C3%B3n_y_manejo.pdf
- Conde-Hernández, L. A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chemistry*, 455-460.
- Cruz, C., Vishwakarma, K., Kumar Choudhary, D., & Varma, A. (2021). Ecophysiology of Nitrogen in Symbiotic Relationships of Plants and Microorganisms. En *Soil Nitrogen Ecology* 1(62). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-71206-8>

- Cruz Romero, W., Barrios Díaz, J. M., Rodríguez Mendoza, M. de las N., Espinosa Victoria, D., & Tirado Torres, J. L. (2016). Producción de plántulas de hortalizas con *Azospirillum* sp. y aspersión foliar de miel de abeja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 59-70.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31, 74-85. Recuperado 25 de marzo de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0258-59362010000100011&script=sci_arttext
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 223-240.
- Duchen, D. G., & Torres, J. M. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación E Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 87-101.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2011). *Manual técnico: Producción Artesanal de Semillas de Hortalizas para la Huerta Familiar*. MasGrafik. <https://www.fao.org/3/i2029s/i2029s.pdf>
- Gamba, M., Raguindin, P. F., Asllanaj, E., Merlo, F., Glisic, M., Minder, B., Bussler, W., Metzger, B., Kern, H., & Muka, T. (2020). Bioactive Compounds and nutritional composition of Swiss chard (*Beta vulgaris* L. Var. *Cicla* and *Flavescens*): A systematic review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 61(20); 3465-3480.
- Gordon Halfacre, R., & Barden, A. (1979). *Horticultura*. A.G.T Editor, S.A.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1).
- Granda Mora, K. I., Nápoles García, M. C., Robles Carrión, Á. R., Alvarado Capó, Y., & Torres Gutiérrez, R. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivos. *Centro Agrícola*, 49-56.
- Granda Mora, K. I., Chamba, H. P., Sozoranga, C. C., & Gutiérrez, R. T. (2013). Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/279940874_Variabilidad_de_ai

slados_diazotrofos_simbioticos_en_diferentes_condiciones_agroecologicas_del_sur_del_Ecuador

- Hanan Alipi, A. M., & Mondragón Pichardo, J. (2009, julio). *Porophyllum macrocephalum* DC. *porophyllum ruderales subsp. Macrocephalum* (DC.) r. *R. johnsoni* pápaloquelite. Malezas de México. Recuperado 8 de septiembre de 2023, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/porophyllum-macrocephalum/fichas/ficha.htm>
- Hernández-Chontal, M. A., Vázquez-Luna, D., Linares-Gabriel, A., De Dios-León, G. E., Guerrero-Peña, A., & Rodríguez-Orozco, N. (2020). Efecto de la inoculación de *Azospirillum* spp. sobre el contenido nutrimental de moringa (*Moringa oleifera* lam.). *Terra Latinoamericana*, 29-38.
- Никитина, В. Е., Богомолова, Н. В., Пономарева, Е. Г., & Соколов, О. И. (2004). Effect of Azospirilla Lectins on Germination Capacity of Seeds. *Biology Bulletin*, 31(4); 354-357.
- INEGI. (2010). Compendio de información geográfica municipal Chalchicomula de Sesma. En *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Recuperado 9 de septiembre de 2023, de https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21045.pdf
- Jürgen Evert, K., Ballard, E. B., Elsworth, D. J., Oquiñena, I., Schmerber, J.-M., & Stipe, R. E. (2010). *Encyclopedic Dictionary of Landscape and Urban Planning: 3764 nitrogen fixations*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-76435-9_8520
- Lambers, H., Chapin, F. S., & Pons, T. L. (2008). Symbiotic associations. En *Plant Physiological Ecology*. Springer, Nueva York, Nueva York, 403-443.
- Lara, D. C., Boettler, R. A. B., & Ovando, L. M. M. (2011). *Diagnóstico del pápaloquelite en México: Porophyllum ruderales (Jacq.) Cass. var. macrocephalum (DC.) Cronq.*
- Lim, T. K. (2014). Allium Cepa. En *Springer eBooks*, 124-203.
- Lima, F., Boldt, A. B. W., Kava, V. M., Galli-Terasawa, L. V., & Adamoski, D. (2022). Epigenetics' Role in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Nodulation: a Review. *Plant Molecular Biology Reporter*, 40(3), 471-481

- López-Alcocer, J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., & López-Alcocer, E. (2020). Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* Spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre. *Terra Latinoamericana*, 841-852.
- López-Alcocer, J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológicas y bioquímicas de cepas de *rhizobium* colectadas en frijol comun silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81.
- López-Ortiz, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Almaraz, J. J., Martínez-Romero, E., & Mendoza-López, M. R. (2012). Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *rhizobium tropici-leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 28(4); 333-342.
- Maheshwari, D., Rajendra Dobhal, & Dheeman, S. (2022). Ecology of Nitrogen-Fixing Bacteria for Sustainable Development of Non-legume Crops. En *Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes*, Springer Singapur, 1(36).
- Marquina, M. E., Ramírez, Y., & Castro, Y. (2018). Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del *pimentón Capsicum annum* L. var. cacique gigante. *Bioagro*, 3-16.
- Martínez, L. L., Peniche, R. Á. M., Hernández-Iturriaga, M., Medrano, S. M. A., & Aguilar, J. R. P. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 63-69.
- Mera Ovando, L. M., Lara Castro, D., & Bye Boettler, R. (2011). *Especies vegetales poco valoradas: Una alternativa para la seguridad alimentaria*.
- Muñoz-Huerta, R., Guevara-Gonzalez, R., Contreras-Medina, L., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. (2013). A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances. *Sensors*, 13(8), 10823-10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Mulford, J. L. H., Cubillos-Hinojosa, J. G., & Milian, P. E. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el

<https://www.researchgate.net/publication/298069900>

- Palomino, J. M. G., López-Gálvez, J., & De Agroplasticultura, R. I. (2004). *Fertiriego: tecnologías y programación en agroplasticultura: resultado de, curso de formación sobre plasticultura y tecnología de riego, Bogotá, Colombia 2002, taller de fertirrigación, Colegio de Posgraduados Universidad Chapingo, México, 2004.*
- Pereg, L., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2015). Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. *Plant And Soil (Print)*, 399(1-2); 389-414.
- Picazevicz, A. A. C., Kusdra, J. F., & De Lima Moreno, A. (2017). Maize growth in response to Azospirillum brasilense, Rhizobium tropici, molybdenum and nitrogen. *Revista Brasileira de Engenharia Agricola E Ambiental*, 21(9); 623-627.
- Quemada, M., Delgado, A., Mateos, L., & Villalobos, J. (2017). Nitrogen Fertilization I: The Nitrogen Balance. En *Principles of Agronomy for Sustainable Agriculture*, Springer, Cham 1; 341-368.
- Quishpe, M. F. P., González-Parra, M. M., García, M. E. M., & Arias, D. R. (2021). Evaluación agronómica de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelos andinos en plántulas de lechuga y tomate. *Investigación Agraria*, 47-52.
- Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A., & Guzmán-Ortíz, J. M. (2018). Descripción y comparación entre morfotipos de Fusarium brachygibbosum, F. falciforme y F. oxysporum patogénicos en sandía cultivada en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1).
- Reyes, I., Alvarez, L. M., El-Ayoubi, H., & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1); 37-48.
- Rodríguez, S. A., Murillo, O. G., & Sánchez, J. L. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 87-97.
- Saha, B., Saha, S., Das, A., Kumar Bhattacharyya, P., Basak, N., Kumar Sinha, A., & Poddar, P. (2017). Biological Nitrogen Fixation for Sustainable

- Agriculture. En *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, Springer, Singapore, 1. (2); 81-128.
- Santillana, N., Arellano, C., & Zuñiga, D. (2005). Capacidad del Rhizobium de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4; 47-51.
- Sayyed, R., & Gavicho Uarrota, V. (2022). Effect of Volatile Organic Compounds (VOCs) and secondary metabolites produced by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on seed quality. En *Secondary metabolites and volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion*, Springer Cham, 1.
- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pecas y alimentación. (2016). *Manual técnico para la producción de hortalizas, huevo de gallina y carne de conejo en unidades de producción familiar*.
- SIAP. (2022, mayo). *Pápalo*. Pápalo. Recuperado 8 de septiembre de 2023, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/726305/Papalo.pdf>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology and development*. Sinauer Associates Incorporated.
- Teshika, J. D., Zakariyyah, A. M., Zaynab, T. B., Zengin, G., Rengasamy, K. R., Pandian, S. K., & Fawzi, M. M. (2018). Traditional and Modern Uses of onion bulb (*Allium CEPAL.*): A systematic review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 59(1); 39-70.
- USDA Plants Database. (s. f.-a). Beta Vulgaris L. Ssp. Cicla (L.) W.D.J. Koch. Recuperado 8 de septiembre de 2023, de <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=BEVUC>
- USDA Plants Database. (s. f.-b). Allium Cepa L. Garden Onion. Recuperado 8 de septiembre de 2023, de <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=ALCE>
- Valenzuela, J. o. S. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *Ciencia Ergo Sum*, 25; 4-11.
- Valery, A., & Reyes, I. (2013). Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2); 81-88.

- Venegas-González, J., Méndez-Inocencio, C., Martínez-Mendoza, E. K., Torres, L. G., & Rodríguez-Torres, M. D. (2019). Producción orgánica de Beta vulgaris subespecie cicla con inoculantes microbianos. *Biotecnia*, 121-126.
- Wewalwela, J. J., Seneviratne, M., & Shields Menard, S. A. (2021). Role of Nitrogen-Fixing Microorganisms for Plant and Soil Health. En *Microbiological Activity for Soil and Plant Health Management* (1.^a ed.). Springer, Singapore.

11. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de los datos recolectados de las pruebas en invernadero con respecto a las variables de las plantas en el primer corte.

N cosecha	Tratamiento	Altura (cm)	Total en H(g)	Peso de raíz H	Peso hojas en H	Núm. De hojas	Peso del bulbo	Tamaño de hojas cm	Peso raíz en S	Peso de hojas S	Masa total en S
1R-P	16	0.8	0.1	0.5	8	2.2, 1.1, 2.3, 2.5, 2.5, 2.7, 2.6	0.018	0.067	0.167	0.1	
1R-P	13.5	0.5	0.1	0.1	8	2.5, 2.5, 1.7, 1.7, 2.4, 2.4, 1.8, 1.8	0.02	0.021	0.041	0.06	
1R-P	4.5	0.2	0.01	0.01	3	0.6, 0.7, 0.7	0.001	0.001	0.001	0.004	
1R-P	18	1.1	0.2	0.7	10	1.8, 1.8, 1.2, 1.2, 3.3, 3.3, 2.1, 1.5, 1.5	0.021	0.09	0.134	0.14	
1R-P	12.7	0.3	0.01	0.2	8	2.1, 1.9, 1.5, 1.5, 2.3, 2.3, 0.6	0.013	0.029	0.045	0.06	
1R-P	8	0.1	0.001	0.02	3	1.4, 0.9, 1.3	0.003	0.008	0.015	0.015	
1R-C	15	0.1	0.001	0.01	2	3.3, 1.2	0.002	0.008	0.009	0.009	
1R-C	13	0.048	0.005	0.03	2	8, 10	0.001	0.009	0.01	0.01	
1R-C	8	0.035	0.006	0.031	2	7.5, 13	0.001	0.004	0.006	0.006	
1R-C	10	0.044	0.01	0.036	1	11	0.002	0.008	0.006	0.007	
1R-C	14	0.172	0.24	0.156	2	14.8, 8.5	0.004	0.015	0.017	0.017	
1R-C	0	0	0	0	0		0	0	0	0	
1R-A	10	1.8	0.1	1.3	4	5.2, 5.2, 4.9, 5.5	0.025	0.106	0.136	0.136	
1R-A	11.8	1.5	0.1	1.1	7	5.3, 5.1, 4.3, 5.2, 2.4, 3.5, 1	0.02	0.086	0.114	0.114	
1R-A	10.8	1.4	0.1	1	6	4.7, 5.2, 4.7, 4.3, 5.3, 8	0.025	0.078	0.1	0.1	
1R-A	11	2.8	0.3	2	8	6.5, 6.5, 5.9, 3.6, 3.9, 2.8, 3.3, 3.3	0.038	0.15	0.186	0.186	
1R-A	16.5	2	0.1	1.4	5	4.8, 4.8, 5.4, 3.4, 3.3	0.016	0.103	0.142	0.142	
1R-A	10.5	2.1	0.1	1.7	5	5.1, 3.4, 5.2, 5.5, 8	0.017	0.121	0.145	0.145	
1T-P	13.5	0.6	0.01	0.3	3	2.2, 1.8, 3	0.009	0.051	0.075	0.075	
1T-P	9.1	0.3	0.01	0.1	6	2.3, 1.7, 1.9, 1.8, 1.7, 1.8	0.003	0.022	0.032	0.032	
1T-P	12	0.4	0.01	0.2	10	2.2, 2.2, 1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 0.7, 0.7, 1.6, 1.6	0	0.021	0.091	0.091	
1T-P	13	0.2	0.01	0.1	8	2.9, 2.9, 1.6, 1.6, 1.8, 1.7, 1.7	0.025	0.094	0.122	0.122	
1T-P	12.5	0.2	0.01	0.1	4	2.4, 2.4, 2.2, 0.9	0.013	0.032	0.046	0.046	
1T-P	13.5	0.3	0.01	0.1	5	2.4, 1.9, 2.1, 1.6, 1.4	0.019	0.033	0.043	0.043	
1T-C	13	0.071	0.02	0.56	2	12, 11	0.002	0.013	0.025	0.025	
1T-C	14	0.093	0.2	0.84	2	13, 5	0.002	0.008	0.009	0.009	
1T-C	17.5	0.075	0.1	0.57	1	14, 5	0.001	0.004	0.006	0.006	
1T-C	13	0.56	0.013	0.43	2	11.5, 10	0.002	0.004	0.005	0.005	
1T-C	13	0.078	0.12	0.61	2	11, 4	0.002	0.005	0.006	0.006	
1T-C	12	0.04	0.006	0.027	1	10	0.001	0.005	0.006	0.006	
1T-A	10.5	3	0.2	2.1	7	2.8, 3.1, 2.6, 3.9, 4.3, 6.9, 7.7	0.024	0.16	0.21	0.21	
1T-A	14	3.1	0.2	2.3	6	2.4, 4.8, 7.2, 7.8, 4.8, 2	0.028	0.16	0.21	0.21	
1T-A	11.3	2	0.2	1.5	5	2.2, 5.8, 4.6, 5.3, 6.1	0.032	0.11	0.14	0.14	
1T-A	13.5	1.8	0.2	1.2	7	2.9, 3.3, 6.5, 5.3, 3.9, 6.7	0.02	0.1	0.13	0.13	
1T-A	11.5	1.2	0.1	0.9	6	4.4, 4.9, 2.2, 2.1, 2.6, 1.1	0.016	0.055	0.074	0.074	
1T-A	12	1.4	0.1	0.9	5	6.1, 6.1, 5.9, 3.4, 2	0.014	0.079	0.1	0.1	
1A-P	12.5	0.6	0.2	0.3	5	2.8, 0.8, 1.8, 2.5, 2.6	0.027	0.052	0.073	0.073	
1A-P	19	1.3	0.2	0.7	5	3.2, 1.2, 2.8, 2.7, 2.4	0.033	0.025	0.08	0.08	
1A-P	12.5	0.5	0.09	0.3	4	2.3, 2, 1.4, 0.8	0.019	0.38	0.055	0.055	
1A-P	11.5	1.1	0.2	0.6	5	1.4, 2.7, 3.4, 2.9, 2	0.031	0.09	0.13	0.13	
1A-P	11.5	0.4	0.09	0.2	4	2.9, 1.0, 8, 2	0.009	0.041	0.057	0.057	
1A-P	15.5	0.8	0.09	0.5	5	2.47, 2.8, 2.4, 1.2, 2.8	0.012	0.071	0.104	0.104	
1A-C	18	0.192	0.019	0.177	2	16.5, 9.3	0.009	0.035	0.036	0.036	
1A-C	16	0.178	0.039	0.162	2	15, 16	0.005	0.048	0.051	0.051	
1A-C	14	0.152	0.038	0.126	2	12, 8.5	0.007	0.03	0.032	0.032	
1A-C	15.5	0.148	0.022	0.129	1	14, 7	0.004	0.035	0.036	0.036	
1A-C	17	0.17	0.021	0.137	2	15.5, 7.5	0.005	0.025	0.03	0.03	
1A-C	15	0.088	0.025	0.084	2	14, 4.9	0.007	0.019	0.031	0.031	
1A-A	13	2.8	0.4	2.2	7	6.9, 7.9, 4.6, 4.4, 3.2	0.042	0.16	0.21	0.21	
1A-A	10	1.3	0.2	1	6	4.4, 4.4, 3.9, 4.1, 3.4, 2.3	0.023	0.086	0.1	0.1	
1A-A	13.5	2	0.1	1.3	6	4.7, 5.5, 4.6, 1.6, 3.4, 2.6	0.015	0.12	0.17	0.17	
1A-A	14.5	3.1	0.2	2.3	5	9.9, 7.7, 6.3, 7.5, 7.0, 5.1, 7.5, 4.3, 2.6, 0.2	0.026	0.18	0.24	0.24	
1A-A	12	2.3	0.1	1.8	5	3.4, 4.3, 6.5, 7.3, 3	0.017	0.12	0.15	0.15	
1A-A	14	2	0.1	1.5	5	3.8, 3.8, 5.6, 5.9, 3.5	0.013	0.12	0.15	0.15	

Anexo 2. Tabla de los datos recolectados de las pruebas en invernadero con respecto a las variables de las plantas en el segundo corte.

N cosecha	Tratamiento	Altura (cm)	Total en H	Peso de raíz H	Peso hojas en H	Num. De hojas	Peso del bulbo	Tamaño de hojas cm	Peso del bulbo en seco	Peso raíz en S	Peso de hojas S	Masa total en S
2R-P		23	3	0.3	1.9	10		4.7, 4.7, 4.4, 4.3, 2.3, 5.2, 7.7, 1.1, 2.7		0.043	0.24	0.4
2R-P		17.1	1	0.1	0.7	8		3.5, 3.5, 3.3, 3.2, 1.2, 1.2, 5.2, 5		0.013	0.62	0.1
2R-P		23.9	3.3	0.4	2	13		3.5, 3.5, 5.3, 3.3, 3.6, 3.2, 1.5, 0.9, 2.5		0.057	0.22	0.34
2R-P		26.3	2.5	0.3	1.3	11		4.5, 4.9, 3.5, 3.1, 2.9, 3.3, 3.3, 2.5, 2.2		0.033	0.14	0.25
2R-P		27	3.5	0.3	2	13		4.9, 5.7, 3.2, 3.2, 9.4, 2.5, 1.5, 1.5, 1.1, 0.8		0.048	0.22	0.37
2R-P		18.4	1.4	0.2	0.9	11		3.9, 4.3, 3.3, 3.6, 3.6, 1.9, 1.1, 1.3, 0.9		0.029	0.1	0.15
2R-C		19	0.3	0.1	0.1	3		0.026, 17.4, 5.5, 1.2		0.004	0.006	0.055
2R-C		20	0.25	0.025	0.2	2		0.013, 17.6, 10.5		0.003	0.009	0.049
2R-C		11.5	0.13	0.013	0.11	2		0.052, 10.5, 10.5		0.005	0.004	0.022
2R-C		16.5	0.3	0.03	0.21	1		0.019, 10		0.005	0.002	0.036
2R-C		14	0.12	0.009	0.095	2		0.023, 10.7, 9.5		0.002	0.003	0.012
2R-C		20	0.36	0.012	0.028	3		0.04, 17.5, 1.5, 8.9		0.002	0.024	0.031
2R-A		18.8	5.6	0.7	4.2	6		6.10, 2.4, 6.3, 6.2, 10.7		0.095	0.31	0.42
2R-A		18.5	6.1	0.7	4.5	6		11.1, 5.8, 3.6, 5.4, 1.5, 5		0.095	0.35	0.47
2R-A		18.8	5.9	0.6	4.3	6		9.7, 8.7, 8.9, 5.5, 4.5, 4.2		0.093	0.36	0.48
2R-A		22.7	6.9	0.4	4.5	8		11.7, 10.10, 4.6, 5.2, 4.9, 2.2, 3.8		0.048	0.39	0.58
2R-A		17	2.8	0.3	2	6		3.9, 2.5, 8.5, 6.5, 6.5, 3.8		0.043	0.15	0.20
2R-A		21.5	7.9	0.6	5.6	9		12.5, 12.2, 8.5, 6.4, 4.3, 7.2, 3.3, 1.9		0.099	0.44	0.60
2T-P		19.5	1.9	0.1	1.2	9		2.9, 2.9, 4.5, 4.5, 2.3, 2.3, 3.3, 3.1, 6		0.031	0.15	0.23
2T-P		24.5	3.4	0.3	2.1	12		4.5, 4.5, 3.8, 3.8, 3.5, 5.2, 5.2, 5.2, 3.7, 3		0.062	0.24	0.41
2T-P		25.5	2.8	0.2	1.6	11		4.3, 4.3, 4.6, 4.6, 2.3, 2.3, 2.7, 2.7, 2.2, 2.2		0.039	0.21	0.34
2T-P		26	2.8	0.3	1.6	12		4.5, 4.5, 3.2, 3.2, 4.5, 2.6, 2.6, 2.4, 2.4, 2.2, 2.2		0.044	0.18	0.31
2T-P		19.1	1.4	0.2	0.9	8		4.2, 4.2, 3.9, 3.9, 2.3, 2.3, 2.2, 2.2, 1.5, 1.5		0.03	0.11	0.16
2T-P		0	0	0	0	0		0		0	0	0
2T-C		19.5	0.21	0.012	0.16	2		0.024, 16.5, 6.4		0.002	0.001	0.022
2T-C		19.5	0.49	0.028	0.4	3		0.035, 14, 15.4, 17.1		0.003	0.003	0.04
2T-C		15.7	0.23	0.023	0.18	3		0.031, 12.5, 7.5, 13.6		0.002	0.004	0.021
2T-C		21	0.41	0.035	0.31	3		0.04, 17, 17.5, 11.5		0.004	0.005	0.033
2T-C		22.5	0.67	0.051	0.63	3		0.03, 4.5, 20, 21.5		0.004	0.007	0.05
2T-C		20.2	0.54	0.037	0.45	2		0.033, 19, 15, 13.5		0.004	0.005	0.057
2T-A		14	5.1	0.3	3.6	7		10.9, 6.5, 6.2, 3.2, 2.4, 2.4		0.042	0.25	0.33
2T-A		21	14.7	1.3	11.5	7		15.2, 14.9, 11.5, 6.2, 5.5		0.21	1	1.27
2T-A		24.5	14.8	1.4	9.5	7		14.7, 13.2, 12, 10.5, 6.5, 6.6		0.17	0.79	1.08
2T-A		22	17.8	1.2	11.1	7		12.5, 13, 12, 10, 6.2, 6.2, 3.1		0.2	0.95	1.22
2T-A		16.5	6.3	0.6	4.2	6		10.8, 9.1, 5.7, 5.8, 4.5		0.11	0.33	0.48
2T-A		23.5	15.5	0.6	9.3	6		14.5, 15.7, 12.4, 7.7, 5.8, 8.4		0.086	0.78	1.09
2A-P		29	5.4	0.6	3.3	13		5.5, 5.5, 5.4, 4.3, 3.5, 5.5, 2.2, 2.2, 2.5		0.11	0.79	0.67
2A-P		29.4	5.3	0.5	3.2	14		6.6, 4.4, 4.5, 4.5, 5.3, 1.1, 2.5, 2.5		0.081	0.46	0.6
2A-P		30.4	5.1	0.4	2.9	12		5.5, 5.1, 5.1, 3.6, 3.6, 4.6, 4.6, 3.3, 2.2, 2.5, 2.5		0.073	0.41	0.41
2A-P		26.6	3.6	0.3	2.2	10		5.5, 5.3, 5.3, 5.3, 4.7, 4.7, 5.4, 5.4, 4.3, 1.5		0.054	0.28	0.73
2A-P		26	3.8	0.4	2.3	12		4.5, 4.5, 5.5, 5.4, 4.4, 2.4, 2.4, 2.5, 2.5, 2.2, 2.2		0.072	0.32	0.57
2A-P		21.5	2.2	0.3	1.4	8		4.5, 4.5, 5.3, 3.3, 2.2		0.047	0.18	0.73
2A-C		21.5	0.52	0.076	0.44	2		0.036, 6.16, 19.7		0.004	0.009	0.087
2A-C		21.5	0.56	0.066	0.52	3		0.055, 20.5, 6.5, 17.5		0.009	0.01	0.011
2A-C		21.5	0.54	0.45	0.43	3		0.042, 19.5, 17, 6.5		0.005	0.006	0.063
2A-C		22	0.61	0.28	0.47	3		0.09, 19.5, 15.5, 12.5		0.024	0.004	0.01
2A-C		18	0.32	0.011	0.3	3		0.029, 9.14, 16.5		0.004	0.002	0.033
2A-C		20	0.51	0.055	0.46	3		0.04, 19, 12, 15		0.004	0.007	0.041
2A-A		16	5.1	0.7	3.7	4		9.5, 9.8, 6.4		0.12	0.45	0.67
2A-A		18.9	6.7	0.5	5	6		8.5, 3.4, 8.5, 12.3, 11		0.091	0.44	0.6
2A-A		17.5	5.1	0.4	3.8	5		7.9, 5.9, 5.2, 5		0.072	0.3	0.41
2A-A		21	6.9	0.4	5	6		13.6, 8.5, 7.4, 9.9, 6.8, 10.5		0.063	0.44	0.73
2A-A		22	6.2	0.4	4	7		11, 10.5, 10.3, 7.7, 4.5, 2.4		0.065	0.37	0.57
2A-A		24	7.1	0.5	4.9	7		5.5, 5.5, 3.4, 7.1, 5.8, 8.3		0.091	0.51	0.73

Anexo 3. Tabla de los datos recolectados de las pruebas en invernadero con respecto a las variables de las plantas en el tercer corte.

N.cochecha	Tatamiento	Altura (cm)	M total en H (g)	Peso de raíz H	Peso hojas en H	Num. De hojas	Peso del bulbo	Tamaño de hojas en cm	Peso del bulbo en S	Peso raíz en S	Peso de hojas S	Masa total en S
3R-P		38	8.5	0.9	5	19	5.5,4,3,6,3,6,4,3,2,6,2,3,4,3,3,3,5,8,5,3,2,1,1			0.16	0.61	1.123
3R-P		38.5	8.2	1.3	4.7	19	5.1,5,1,6,6,4,6,4,6,3,2,8,2,1,2,1,1,8,3,3,3,3,3,2,8			0.19	0.57	1.100
3R-P		40	9.4	1.4	5.6	17	6,4,4,2,5,7,5,7,4,6,6,5,4,4,4,3,7,3,2,9,1,7,1,5,1,5			0.26	0.71	1.360
3R-P		39.5	7.9	1.3	4.4	18	4,6,4,6,5,5,2,1,1,1,1,6,2,6,4,5,5,5,5,3,3,3,6,2,5,3,0,5			0.2	0.57	1.085
3R-P		37.7	6.6	1.4	3.8	28	4,5,4,5,4,1,4,1,3,2,3,5,4,4,3,5,3,5,2,2,3,1,6,2,2,5,2,5,2,5,3,3,3,2,2,7,1,4,1,4			0.15	0.43	0.806
3R-P		0	0	0	0	0			0	0	0	0
3R-C		20	0.4	0.054	0.3	3	0,07,16,5,12		0.005	0.005	0.023	0.030
3R-C		22.5	0.7	0.034	0.5	3	0,1,9,11,5,20		0.007	0.007	0.039	0.050
3R-C		24.5	1.1	0.060	0.9	4	0,9,20,6,22,5		0.008	0.004	0.097	0.112
3R-C		18.5	0.8	0.1	0.6	3	0,1,9,16,9,16,9		0.013	0.071	0.091	0.101
3R-C		24.3	1.2	0.45	0.9	4	0,1,13,15,21,5,22		0.009	0.008	0.087	0.101
3R-C		21.5	0.7	0.32	0.6	3	0,17,5,20,14		0.002	0.007	0.045	0.054
3R-A		22.5	1.3	1.1	8.2	9	12,5,10,2,9,5,9,3,5,5,7,5,6			0.25	0.76	1.21
3R-A		23	1.2	1.6	7.7	9	16,13,12,6,9,7,7,4,5,8			0.30	0.67	1.08
3R-A		17	1.5	1.5	10.6	7	9,8,5,9,8,5,5,5,6,5,9			0.27	0.98	1.53
3R-A		18.5	9	1.9	6.3	7	10,9,9,9,5,7,5,4,4			0.358	0.62	0.93
3R-A		19	6.6	0.9	4.6	6	7,5,10,5,6,9,5			0.15	0.4	0.57
3R-A		18	6.1	1.1	4.5	5	8,5,9,4,6,5,8,3			0.21	0.41	0.59
3T-P		30	6	0.6	3.4	14	5,5,5,5,3,5,5,5,5,3,2,2,1,2,3,2			0.15	0.50	0.93
3T-P		36.5	8.9	1.4	5.3	20	4,5,4,4,4,2,4,2,4,7,7,5,5,5,5,1,5,3,3,5,5,5,4,5,4,5,2,3			0.24	0.65	1.23
3T-P		34	7.8	0.9	4.6	18	4,4,4,5,5,5,5,5,4,3,2,6,3,6,1,2,1,7,3			0.19	0.60	1.08
3T-P		35.5	7.8	0.7	4.5	16	5,5,5,5,6,6,4,5,4,5,3,3,2,3,2,3,2,4,1,5,2,5			0.14	0.55	1.07
3T-P		35	7.4	0.9	4.3	13	5,5,5,4,8,4,8,4,5,2,2,2,4,4,8,3,2,7,2,5			0.19	0.54	1.06
3T-P		0	0	0	0	0			0	0	0	0
3T-C		23	1.1	0.050	1	3	0,025,14,19,5,21		0.006	0.008	0.062	0.070
3T-C		26	0.9	0.1	0.7	3	0,039,9,20,24,5		0.007	0.012	0.095	0.1
3T-C		26.4	1.2	0.1	1.1	4	0,1,9,18,20,24,3		0.009	0.014	0.0847	0.1
3T-C		30	1.9	0.039	1.7	4	0,1,6,23,26,24		0.01	0.007	0.026	0.026
3T-C		30	1.7	0.021	1.5	3	0,1,21,25,25		0.007	0.006	0.20	0.22
3T-C		23	1	0.054	0.7	3	0,035,16,21,21		0.007	0.008	0.078	0.092
3T-A		18	1.73	2.5	11.1	6	8,2,12,2,12,5,10,5,6,3,4			0.55	1.17	1.75
3T-A		19.8	10.5	0.9	7.7	6	9,10,10,3,8,5,8,1,4			0.22	0.71	0.98
3T-A		19	0.8	0.8	5.2	5	10,7,9,2,10,2,3,8,3			0.13	0.46	0.63
3T-A		24.9	19.1	3.6	13.4	6	14,6,13,8,11,11,13,7,5			0.71	1.12	1.77
3T-A		21	12.7	1.7	8.2	7	11,11,5,7,10,7,11,5,8,5,5			0.33	0.84	1.28
3T-A		15	8.2	2.2	5.9	6	7,5,9,5,6,7,5,5			0.46	0.51	0.73
3A-P		29.5	6.1	1.2	3.9	17	5,2,5,2,5,4,4,5,5,4,4,3,3,1,2,3,2,7,1,7,2,1			0.20	0.50	0.88
3A-P		33	6.9	1.4	4.3	16	5,1,5,1,5,2,4,5,4,5,4,1,4,1,3,3,3,3,3,1,7,2,1,5			0.23	0.56	1.05
3A-P		34	7.1	0.9	4.4	16	5,3,5,3,4,3,4,3,2,8,2,3,6,5,5,5,5,5,4,4,4,2,2,5,2,5			0.16	0.57	1.01
3A-P		36	7.2	0.7	4.6	17	6,6,5,5,5,4,5,4,5,3,3,3,7,2,2,3,3,4,4,6,2			0.15	0.61	1.08
3A-P		36.1	9	1.3	5.4	19	5,5,5,5,5,6,5,6,5,6,5,6,3,4,2,4,2,6,2,6,3,1,6,2			0.22	0.71	1.30
3A-P		42	10.2	1.9	6.1	20	6,2,6,2,5,5,5,5,3,5,3,5,5,2,5,2,2,2,2,4,4,1,8,1,8,2,3,2,2			0.32	0.83	1.41
3A-C		28	2.2	0.3	1.8	4	0,2,16,6,21,21,5,26,5		0.023	0.031	0.17	0.20
3A-C		25	1.8	0.1	1.4	3	0,2,20,5,23,2,23,5		0.017	0.019	0.20	0.23
3A-C		25	1.5	0.3	1.3	3	0,2,17,9,19,6,23,5		0.012	0.026	0.11	0.13
3A-C		19.5	0.7	0.1	0.6	3	0,1,10,1,4,5,18		0.007	0.021	0.045	0.62
3A-C		20.3	1.1	0.2	0.9	3	0,2,14,5,18,5,19		0.023	0.026	0.081	0.11
3A-C		20	0.9	0.045	0.6	3	0,2,12,16,17		0.016	0.007	0.092	0.18
3A-A		23	1.33	3.6	8.8	6	10,5,10,5,10,7,9,5,7,11,5			0.78	1.09	1.63
3A-A		20	1.12	0.7	7.7	5	11,3,8,2,6,7,4,9,8			0.16	0.79	1.18
3A-A		22	10.3	1.3	6.9	7	10,7,5,11,7,11,4,5,7,5,6,5			0.31	0.75	1.20
3A-A		21	13.9	1.2	6.6	7	11,7,6,9,8,9,5,6,6,5,9,8			0.27	0.84	1.41
3A-A		19	13.7	2.8	10.3	7	11,7,10,9,5,3,7,11,7			0.58	1.12	1.7
3A-A		19	8.2	1.9	5.8	4	9,5,8,3,8,5,12			0.34	0.57	0.81

Anexo 4. Medios de cultivo para la identificación de rizobios.

- **Peptona Glucosa Agar (PGA)**

0.25g de glucosa

0.5g de peptona

0.75g de agar bacteriológico

0.5ml de verde de bromocresol

Los reactivos se diluyeron en 49.5 ml de agua destilada. Se calcularon estas cantidades para preparar 50 ml del medio.

- **Levadura Lactosa Agar (LLA)**

0.5 g de D-lactosa

0.25g de levadura

0.75g de agar bacteriológico

0.25g de K_2HPO_4 (fosfato dipotásico)

0.0005g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado)

0.01g de NaCl (Cloruro de sodio)

0.5 microlitros de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (cloruro férrico sexta hidratado)

0.75 g de CaCl (cloruro de calcio)

Los reactivos se diluyeron en 50ml de agua destilada. Se calcularon estas cantidades para preparar 50 ml del medio.

- **Reactivo de Benedict**

Solución A

Se diluyeron 8.65g citrato de sodio en 30 ml de agua destilada más 5.5g de carbonato de sodio.

Solución B

Se diluyeron 0.875 g de sulfato de cobre en 5 ml de agua destilada.

Estas dos soluciones se guardaron por separado, y se mezclan al momento de usarlas; el volumen de la mezcla se completó a 50 ml con agua destilada.