



Acta Botanica  
Mexicana

# Crecimiento, vitalidad y nutrición de plántulas de *Fraxinus uhdei* (Oleaceae) con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

## Growth, vitality and nutrition of *Fraxinus uhdei* seedlings with plant growth-promoting rhizobacteria

Juan Carlos Cuevas-Cruz<sup>1</sup> , Tomás Martínez-Trinidad<sup>1,4</sup> , Jesús Pérez-Moreno<sup>2</sup> , Moisés Graciano Carcaño-Montiel<sup>3</sup> ,

Miguel Ángel López-López<sup>1</sup> , Armando Gómez-Guerrero<sup>1</sup>

### Resumen:

**Antecedentes y Objetivos:** La disponibilidad de inoculantes a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) tiene gran demanda, principalmente en cultivos anuales; sin embargo, es necesario determinar sus beneficios en especies arbóreas. Los objetivos de este trabajo fueron: (1) analizar el crecimiento, vitalidad y nutrición de plántulas de *Fraxinus uhdei* (fresno) inoculadas con RPCV y (2) determinar si la promoción del crecimiento es atribuible al nitrógeno adicional derivado de la atmósfera.

**Métodos:** Plántulas de *F. uhdei* producidas con suministro de 5 mM de nitrógeno (N) fueron inoculadas con una cepa de *Azospirillum brasilense* fijadora de N<sub>2</sub> (FN), una cepa solubilizadora de fosfatos (SF) y la combinación de estas (FNSF). Mediante la abundancia natural de <sup>15</sup>N en tejido vegetal, se infirieron diferencias en N derivado de la atmósfera (%Nd<sub>fa</sub>).

**Resultados clave:** La combinación *A. brasilense* fijadora de N<sub>2</sub> y solubilizadora de fosfatos (FNSF) mejoró la tasa de crecimiento en altura total y diámetro del tallo en 9.3 y 9%, respectivamente. El área foliar aumentó 30% y el contenido de N, P y K fueron alrededor de 20, 50 y 60% mayores al control, respectivamente. El suministro de N no tuvo efecto significativo en el crecimiento ( $p \leq 0.05$ ), pero sí favoreció la vitalidad de las plantas en las primeras etapas de crecimiento. El %Nd<sub>fa</sub> promedio en plantas inoculadas con FN fue 16.4. Sin embargo, estadísticamente la concentración de N en vástago indica que el %Nd<sub>fa</sub> no es el factor determinante que impulsa el crecimiento.

**Conclusiones:** La inoculación con FNSF es impulsora de un mejor crecimiento, vitalidad y nutrición de plántulas de fresno. Además, la inoculación con FN tiene potencial al identificar individuos que registren los mayores %Nd<sub>fa</sub>.

**Palabras clave:** especies arbóreas de uso urbano, inoculación, nitrógeno derivado de la atmósfera, rizobacterias.

### Abstract:

**Background and Aims:** The availability of inoculants based on plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) has been increasing mainly focused on annual crops; however, it is necessary to determine their benefits in tree species. The objectives of this work were: (1) to analyze the growth, vitality and nutrition of *Fraxinus uhdei* (ash tree) seedlings inoculated with PGPR, (2) to determine if the growth promotion was attributable to additional nitrogen derived from the atmosphere.

**Methods:** *Fraxinus uhdei* seedlings produced with 5 mM nitrogen (N) supply were inoculated with an N<sub>2</sub>-fixing (FN) strain of *Azospirillum brasilense*, a phosphate-solubilizing strain (SF), and the combination of these (FNSF). By means of natural <sup>15</sup>N abundance in plant tissue, differences in N derived from the atmosphere (%Nd<sub>fa</sub>) were inferred.

**Key results:** The N<sub>2</sub>-fixing *A. brasilense* and phosphate solubilizing (FNSF) combination improved the growth rate by 9.3 and 9%, respectively. Leaf area increased 30% and N, P and K contents were about 20, 50 and 60% higher than the control, respectively. N supply had no significant effect on growth ( $p \leq 0.05$ ), but it supported plant vitality in early growth stages. The average %Nd<sub>fa</sub> in plants inoculated with FN was 16.4. However, statistically, the N concentration in the shoot indicates that %Nd<sub>fa</sub> is not the determining factor that drives growth.

**Conclusions:** Inoculation with FNSF is a driver of improved growth, vitality and nutrition of ash seedlings. Besides, the inoculation with FN has potential by identifying individuals with the highest %Nd<sub>fa</sub>.

**Key words:** inoculation, nitrogen derived from the atmosphere, rhizobacteria, tree species for urban use.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Ciencias Forestales, Km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, 56264 Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Edafología, Área de Microbiología Agrícola, Km. 36.5 Carr. Fed. Méx.-Tex., 56264 Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

<sup>3</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Instituto de Ciencias, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, México.

<sup>4</sup>Autor para la correspondencia: tomtz@colpos.mx

Recibido: 28 de mayo de 2025.

Revisado: 18 de agosto de 2025.

Aceptado por Moisés Méndez-Toribio: 19 de septiembre de 2025.

Publicado Primero en línea: 3 de noviembre de 2025.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 132 (2025).



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

Citar como: Cuevas-Cruz, J. C., T. Martínez-Trinidad, J. Pérez-Moreno, M. Graciano Carcaño-Montiel, M. Á. López-López y A. Gómez-Guerrero. 2025. Crecimiento, vitalidad y nutrición de plántulas de *Fraxinus uhdei* (Oleaceae) con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Acta Botanica Mexicana 132: e2475. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm132.2025.2475>

e-ISSN: 2448-7589

## Introducción

La inoculación de plantas de uso forestal con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) es una estrategia sostenible que permite reducir el uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados (Sivasakthivelan et al., 2023). Para que RPCV sean consideradas como biofertilizantes, además de su identificación, caracterización morfológica, molecular y bioquímica, sus beneficios se deben validar en ambientes controlados, semi controlados y en pruebas de campo (Adeniji et al., 2024). Existe gran disponibilidad de inoculantes comerciales a base de RPCV; sin embargo, su uso se enfoca principalmente en cultivos anuales (Rafique et al., 2024). Por su parte, los inoculantes recomendados para especies forestales a menudo no están disponibles a nivel comercial, ya que solo se han evaluado en ambientes controlados o en pruebas piloto (Chaiya et al., 2021; Cordeiro et al., 2024).

*Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978 es una RPCV empleada en la inoculación de plantas de coníferas y latifoliadas (Kondo et al., 2024; Smiderle et al., 2024) y se ha observado que el suministro de dosis mínimas de nitrógeno (N) incrementa los efectos positivos de la inoculación (Aguirre-Medina et al., 2014b). Por ejemplo, en la inoculación de *Fraxinus americana* L. con suministro de 16% de N las plantas mejoran su rendimiento de raíces, brotes y hojas en 19, 22 y 19%, respectivamente (Liu et al., 2013). En *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) es alterada positivamente por la inoculación con *A. brasilense* y el suministro de 5 mM de N (Calzavara et al., 2021). Esta condición es deseable, ya que la relación entre la fluorescencia variable y máxima (Fv/Fm) constituye un indicador confiable de la vitalidad de las plantas (Shi, 2024). Consecuentemente, dosis iniciales de N en plántulas inoculadas con cepas de *A. brasilense*, son necesarias en función de la especie y condiciones de crecimiento (Boeni et al., 2024).

Los principales mecanismos que explican los efectos benéficos en la promoción del crecimiento y vitalidad de plantas por *A. brasilense* son la producción de ácido indol-3-acético (IAA), producción de sideróforos para solubilizar fosfatos y la fijación de N<sub>2</sub> (Reis et al., 2015). Es importante señalar que la fijación de N<sub>2</sub> se puede inferir a partir de los valores de abundancia natural de <sup>15</sup>N (Kaba et al., 2019). El

N del suelo es más enriquecido en <sup>15</sup>N que el N<sub>2</sub> atmosférico; por tanto, plantas no fijadoras de N<sub>2</sub> dependerán del N del suelo y como resultado presentarán mayor <sup>15</sup>N que plantas fijadoras de nitrógeno (Pang et al., 2023). Dado que la composición de <sup>15</sup>N de la atmósfera es el estándar, las plantas que fijan N<sub>2</sub> tendrán valores más cercanos a cero. Debido a que el proceso de fijación de N<sub>2</sub> consume mucha energía y es extremadamente sensible a la presencia de oxígeno, este mecanismo en *A. brasilense* no siempre es determinante para las plantas (Glick, 2020).

El efecto benéfico de las RPCV es mayor utilizando sustratos ricos en materia orgánica y nutrimentos, debido a que se crean interacciones sinérgicas entre RPCV y propiedades edáficas (Manandhar et al., 2017). Suelos ricos en nutrimentos mejoran la interacción de plantas con bacterias productoras de hormonas del crecimiento, mientras que condiciones limitadas de fertilidad favorecen a solubilizadores de nutrimentos (Da Costa et al., 2014). En sustrato a base de corteza y suelo forestal, sin aporte adicional de nutrimentos, *A. brasilense* en coinoculación con hongos micorrízicos mejora variables de crecimiento y fisiológicas de *Pinus montezumae* Lamb. (Barragán-Soriano et al., 2022). También en sustrato a base de turba, sin aporte adicional de fertilizantes, la inoculación de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze con una cepa comercial de *A. brasilense* mejora el contenido nutrimental y calidad de planta (Kondo et al., 2024). Con base en lo anterior, también es posible determinar la efectividad de RPCV en especies forestales, al disminuir las interacciones sinérgicas con la materia orgánica y suministro adicional de nutrimentos (Liu et al., 2013).

*Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh., conocido como fresno, es una de las especies predominantes en el arbolado de las áreas urbanas de la zona centro de México (Morales-Gallegos et al., 2023). Durante el periodo colonial fue el árbol seleccionado para arborizar la Alameda Central de la Ciudad de México por su copa densa y porte estético (Benavides-Meza, 2023). Actualmente se recomienda su establecimiento en parques por su capacidad de adaptación (Hernández-Álvarez et al., 2022) y por la resistencia de su madera a la descomposición (Hernández-López et al., 2024). Sin embargo, los árboles de esta especie frecuentemente presentan bajos niveles de vitalidad (Macías-Muro et al., 2023), debido entre otros factores, al estrés causa-



do por suelos urbanos limitados en elementos minerales (Rosier et al., 2021). La producción de planta de fresno, destinada a ambientes urbanos, puede beneficiarse de biofertilizantes a base de RPCV de *A. brasilense*, ya que se ha reportado que, el uso de microorganismos benéficos potencia su capacidad para establecerse en sitios degradados con bajo contenido de nutrimentos (Pérez-Baltazar et al., 2020). En este contexto, los objetivos del presente estudio fueron: (1) analizar el crecimiento, vitalidad y nutrición de plántulas de *Fraxinus uhdei* producidas con 5 mM de N e inoculadas con RPCV de *A. brasilense*, y (2) determinar si la promoción del crecimiento es atribuible a nitrógeno adicional derivado de la atmósfera.

## Materiales y Métodos

### Condiciones experimentales

Los ensayos se establecieron en Montecillo, Texcoco, Estado de México, México (19°29' latitud norte, 98°53' longitud oeste, a una elevación de 2240 m s.n.m.), bajo condiciones de invernadero de estructura metálica con techo de forma curva, cubierta de película plástica color blanco lechoso (calibre 720) y con malla sombra de 50% durante los primeros tres meses del establecimiento. No se tuvo control artificial de temperatura y humedad, su registro se obtuvo con un Datalogger (Elitech®, Cd. Mx., México). Los valores promedio, mínimo y máximo de temperatura fueron 17.6, 2.9 y 31.1 °C, respectivamente. Mientras que los porcentajes de humedad relativa promedio, mínimo y máximo fueron 49.1, 11.2 y 82.5%, respectivamente. El medio de crecimiento empleado para el cultivo de plantas de *F. uhdei* consistió en una mezcla de turba Sunshine Mezcla 3®, perlita y vermiculita en proporción 60:30:10 (vol:vol). La mezcla de sustrato fue esterilizada en tres ocasiones con vapor de agua durante 5 h con base en las especificaciones de Barragán-Soriano et al. (2022). La densidad aparente que presentó el sustrato fue 0.223 g cm<sup>-3</sup>, pH de 6.4, CE 0.737 dS/m, N total 0.473 %, P 225.664, K 1.780, Ca 21.667, Mg 20.007 ppm y Na 1.824 cmol/kg. También se determinó Cu 1.298, Fe 31.141, Mn 28.779 y Zn 5.8 ppm.

### Material biológico

El inóculo bacteriano de *Azospirillum brasilense* fijador de nitrógeno se preparó a partir de la propagación de una colonia

bacteriana en medio NFb estéril, adicionando ácido málico, sales minerales, vitaminas y una fuente de nitrógeno. Se incubó en agitador orbital Environ-Shaker 3597 (Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinois, EUA) a 220 rpm a 32°C por 48 h, hasta obtener una densidad de población equivalente al tubo número 4 del nefelómetro de MacFarland con una concentración bacteriana final de 5×10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC ml<sup>-1</sup>) (Carcaño-Montiel et al., 2006).

Para bacterias solubilizadoras de fosfatos, se utilizó el medio caldo nutritivo o caldo soya tripticaseína, se inoculó con una colonia bacteriana al medio y se incubó en agitación a 180 rpm a 32 °C por 24 h, hasta tener una densidad de población equivalente a 8×10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Este fue proporcionado por el laboratorio de Microbiología de Suelos, del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Puebla, México). Ambas cepas son productoras de ácido indolacético y presentan actividad nitrogenasa (López-Reyes et al., 2017). Los detalles sobre su identificación molecular y caracterización bioquímica fueron descritos por Carcaño-Montiel et al. (2006).

La semilla utilizada se recolectó de árboles adultos de *F. uhdei*, ubicados en "El Ranchito", campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, municipio Texcoco, Estado de México, México. Las semillas fueron desinfectadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y un cuarto enjuague con una solución buffer de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> como agente amortiguador.

Para evitar elevadas temperaturas que provocan disminución de las poblaciones bacterianas (Allouzi et al., 2022), la siembra se realizó en las primeras horas de la mañana, depositando tres semillas por tubete forestal de 380 cm<sup>3</sup>. A los 36 días posteriores a la siembra, se hizo el aclareo de plántulas donde germinó más de una semilla, dejando solo una por tubete.

El riego se proporcionó cada tercer día con agua de pozo con un pH de 7.0±0.2 y CE de 0.32±0.01 dS m<sup>-1</sup>. La inoculación se efectuó al momento de la siembra, agregando 10 ml del inóculo por tubete con jeringas esterilizadas de 10 ml. Una segunda inoculación se realizó 90 días posteriores a la siembra, añadiendo 15 ml del inóculo por planta con jeringas estériles de 20 ml.



## Ensayo 1: inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y suministro de nitrógeno

El ensayo se estableció del 26 de junio de 2023 al 10 de junio de 2024. A 60 días de haberse realizado la segunda inoculación, la mitad de las plantas de un total de 384 recibió aportes de 5 mM de N a base de urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ). Con base en Calzavara et al. (2021) se adicionaron 8.6 ml de la solución de N por tubete cada 15 días y hasta el final del período experimental. La otra mitad de plantas se cultivó sin suministro de N. No se aportaron otros nutrimentos.

## Variables de crecimiento

Las mediciones se realizaron a 90 y 260 días posteriores a la segunda inoculación. El crecimiento de las plantas de fresco se determinó con base en su altura total (cm), la cual se midió con una cinta métrica graduada en cm, a partir del cuello de la raíz y hasta el ápice de cada planta. El diámetro al cuello de la raíz (mm) se midió con un vernier digital (Keatronic®, Japón). El área foliar ( $\text{cm}^2$ ) para esta variable se midió en la superficie de las hojas con un integrador de área foliar (LI-300, Li-Cor; Lincoln, EUA), la biomasa de raíces, biomasa aérea y biomasa total (g) se determinaron a partir del secado del componente aéreo y de raíces durante tres días a 70 °C en un horno de ventilación forzada (Riossa, HCF-125D, Cd. Mx., México). El peso seco se determinó con balanza analítica (Ohaus® modelo E01140, Parsippany-Troy Hills, New Jersey, EUA).

El área foliar y biomasa se midieron a partir de cuatro plantas por tratamiento, seleccionando al azar una planta por repetición. Mientras que la altura total y el diámetro al cuello de la raíz se obtuvieron en todas las unidades experimentales. Determinando las tasas de crecimiento en altura y diámetro a partir de la medición inicial (90 días) y final (260 días), se estimaron con base en Boeni et al. (2024). La estimación se basó en la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de crecimiento (\%)} = \frac{\text{valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}} \times 100$$

## Fluorescencia de la clorofila y verdor del follaje

La fluorescencia de la clorofila se midió con un fluorímetro portátil Pocket PEA (Hansatech Instruments Ltd, King's Lynn, UK), con un tiempo de detección de 2 s, emisión de luz a una longitud de onda de 650 nm, con una intensidad

de 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Con el uso de clips Pocket PEA, las lecturas se realizaron adaptando a la oscuridad por 20 minutos cinco hojas por planta, favoreciendo así la fotoquímica (Van der Walt et al., 2024).

## Análisis nutrimental

Al término del ensayo, de acuerdo con Barragán-Soriano et al. (2018) cuatro plantas por tratamiento, una por repetición, fueron seleccionadas aleatoriamente para el análisis nutrimental. Los minerales de P, K, Ca y Mg se determinaron con base en los métodos descritos por Alcántar-González y Sandoval-Villa (1999), mediante espectrometría de absorción atómica, el contenido de nitrógeno se obtuvo por el método micro-Kjeldahl (Bremner, 1965).

## Ensayo 2: determinación de la fijación biológica de nitrógeno mediante abundancia natural de $^{15}\text{N}$

Las plantas empleadas en este ensayo fueron inoculadas de la misma forma que las plantas del ensayo uno y se produjeron sin el suministro de N. A los 60 días después de la segunda inoculación, fueron cosechadas y se registraron variables de crecimiento. La longitud de raíz principal (cm) se midió como atributo adicional para este ensayo. Esta fue medida con cinta métrica de 100 cm en todas las unidades experimentales, extrayendo con cuidado cada planta del envase, se eliminó el sustrato con agua corriente y se empleó una rejilla de plástico de 50 cm de longitud, donde la raíz quedó totalmente extendida.

El secado de las muestras se realizó con el mismo equipo y tiempo que el de las plantas del ensayo uno. Posteriormente, el tejido fue molido en mortero y pistilo de porcelana, hasta obtener un polvo fino, y con el uso de una balanza de máxima precisión (Sartorius® Göttingen, Alemania), se prepararon muestras que contenían entre 8 y 9.8 mg de tejido del vástago (tallos y hojas).

Las muestras fueron enviadas a las instalaciones de Stable Isotope Facility, Department of Plant Sciences, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of California (Davis, EUA). Los datos de abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  se obtuvieron mediante el sistema de Espectrometría de Masas de Relación Isotópica, acoplado a un Analizador Elemental EA-IRMS (Sercon Ltd., Cheshire, UK), de acuerdo con las normas internacionales IAEE-600 y USGS (Brand et





al., 2014). Las proporciones de isótopos estables de  $^{15}\text{N}$ , se informaron como partes por mil (‰).

La determinación del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Nd<sub>f</sub>a), se realizó a partir de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  (de las plantas inoculadas y de las plantas sin inocular:

$$\% \text{Nd}_f \text{a} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{Plantas sin inocular}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Plantas inoculadas}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{Plantas sin inocular}} - \text{B}} \times 100 \quad (1)$$

Donde el  $\delta^{15}\text{N}$  de plantas inoculadas y sin inocular son las unidades de isótopos de nitrógeno estables expresadas como  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) y B es la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  atmosférico, que se supone es 0.0 (Pang et al., 2023).

### Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo 1, contó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 4$  (dos fuentes de N y cuatro inóculos). El suministro de 5 mM de N (N+) y sin suministro de N (N-), constituyó los niveles de nitrógeno. Mientras que la inoculación con *Azospirillum brasilense* fijadora de  $\text{N}_2$  (FN), *A. brasilense* solubilizadora de fosfatos (SF), la combinación de estas (FNSF) y plantas sin inocular (Psi) representan las fuentes de inóculo. La combinación de niveles de los factores resultó en ocho tratamientos replicados cuatro veces. La unidad experimental estuvo representada por 12 plantas, produciendo 384 plantas de *F. uhdei*.

A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada tiempo de evaluación. Los datos fueron transformados (T) para cumplir con la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk), aplicando *arcoseno* para los datos de fluorescencia de la clorofila [ $T = \arcsin(y)$ ] y logaritmo natural en los datos de análisis nutrimental [ $T = \ln(y)$ ].

El ensayo para determinar la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$ , se estableció con un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos fueron la inoculación con FN, la combinación FNSF y Psi. Cada tratamiento se replicó 10 veces, la unidad experimental estuvo representada por una planta. A partir de la verificación de los supuestos de normalidad (Prueba de Mardia) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett) se realizó un análisis multivariado de varianza (MANOVA). En ambos ensayos, cuando hubo efecto de tratamientos, las medias se compararon utilizando la prueba DSH (diferencia significativa honesta de Tukey) y un

$\alpha=0.05$ . El análisis estadístico se realizó con la versión 4.4.1 del programa Rstudio Team® (R Core Team, 2024).

## Resultados

### Crecimiento

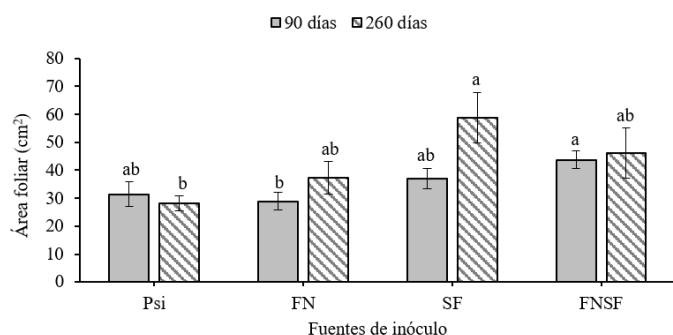
El crecimiento de las plantas de fresno no presentó la interacción significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los factores inoculación y N, ni por el suministro de nitrógeno (N), pero sí para la inoculación con cepas de *A. brasilense* en las variables de altura total, diámetro al cuello de la raíz, área foliar, biomasa de vástago y biomasa total. Las ganancias en la tasa de crecimiento de altura total por la inoculación con cepas de *A. brasilense* fueron de 6.3-9.3% con respecto a Psi; mientras que la tasa de crecimiento en diámetro del tallo mejoró 9% al combinar FNSF (Cuadro 1). El área foliar fue mayor en el tratamiento FNSF, registrando valores de  $43.71 \pm 3.2$  y  $46.14 \pm 8.3$   $\text{cm}^2$  en la primer y segunda evaluación, respectivamente. En contraste, estadísticamente Psi conservaron la misma área foliar con valores de  $31.4 \pm 4.4$  y  $28.1 \pm 2.5$   $\text{cm}^2$  en la primer y segunda evaluación, respectivamente (Fig. 1). Mientras que la acumulación de biomasa solo fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) en la medición de 90 días posteriores a la segunda inoculación.

### Fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) presentó la interacción significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre inoculación y nitrógeno; sin

**Cuadro 1:** Tasa de crecimiento en porcentaje (promedio  $\pm$  error estándar) en altura y diámetro al cuello de la raíz de plantas de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh, después de 260 días de ser inoculadas con cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978. Valores promedio en la misma columna con letra igual no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

| Inoculación                                                    | Altura (%)        | Diámetro al cuello de la raíz (%) |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Plantas sin inocular (Psi)                                     | $14.05 \pm 2.6$ b | $24.20 \pm 1.9$ b                 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> fijadora de $\text{N}_2$ (FN)   | $23.37 \pm 2.2$ a | $22.06 \pm 2.7$ b                 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> solubilizadora de fosfatos (SF) | $20.40 \pm 2.5$ a | $28.69 \pm 2.0$ ab                |
| Combinación de FNSF                                            | $23.26 \pm 2.1$ a | $33.22 \pm 3.0$ a                 |



**Figura 1:** Área foliar (promedio±error estándar) de plantas *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. a los 90 y 260 días posteriores a la segunda inoculación con una y dos cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978. Plantas sin inocular (Psi), *A. brasilense* fijadora de  $N_2$  (FN), *A. brasilense* solubilizadora de fosfatos (SF) y la combinación de cepas (FNSF). Valores con la misma letra en el mismo tiempo de evaluación no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

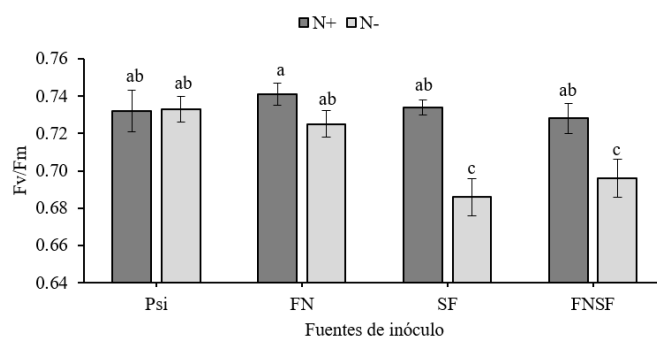
embargo, el efecto de la interacción solo estuvo presente en los 90 días posteriores a la segunda inoculación. La inoculación con FN y suministro de 5 mM de N presentaron la mejor relación Fv/Fm. La interacción mostró que el follaje de las plantas inoculadas presenta una disminución en los valores Fv/Fm, cuando éstas no reciben aportes de N, siendo más notorio en los tratamientos que incluyeron SF, mientras que Psi no ven alterados sus valores con y sin suministro de este nutrimento (Fig. 2).

### Contenido de nutrimentos

El análisis nutrimental no presentó una interacción significativa, pero sí mostró efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) por la inoculación y el suministro de nitrógeno. La inoculación con SF y FNSF favoreció mayor acumulación de N y P con respecto a Psi. En la raíz el N mejoró entre 27.6 y 29.7%, N total 22.7 y 39.9%. El contenido de P en vástago mejoró 53.8 y 71.7%, mientras que K fue 68.2% mayor con SF (Cuadro 2). Ca y Mg no fueron influenciados por la inoculación. El suministro de 5mM de N mejoró en 97.0, 38.6, 33.8 y 30.6% el contenido total de N, P, K y Ca, respectivamente.

### Determinación de fijación biológica de nitrógeno mediante abundancia natural de $^{15}N$

La inoculación con cepas de *A. brasilense* mostró efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el  $\delta^{15}N$  del vástago de plantas de



**Figura 2:** Fluorescencia de la clorofila Fv/Fm (promedio±error estándar) de plantas de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. en la interacción de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978 × suministro de 5 mM de nitrógeno. Noventa días posteriores a la segunda inoculación. N+=suministro de N, N-=Sin suministro de N, Psi=Plantas sin inocular, FN=*A. brasilense* fijadora de  $N_2$ , SF=*A. brasilense* solubilizadora de fosfatos y FNSF=combinación de cepas. Valores con la misma letra no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

fresno, el cual varió de 2.21 a 4.24 ‰. Con base en los valores de  $\delta^{15}N$ , las plantas inoculadas con FN dependieron menos del N del suelo, en comparación con Psi y FNSF (Fig. 3). El promedio de las estimaciones del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Nd<sub>f</sub>a) en el vástago de plantas de fresno inoculadas con FN fue de 16.4%, con valores máximos y mínimos de 41.1 y -16.8%, respectivamente, mientras que en plantas inoculadas con FNSF el promedio fue 1.4%, registrando valores máximos y mínimos de 35.3 y -42.4%, respectivamente. Sin embargo, el %Nd<sub>f</sub>a no fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ). El efecto de la inoculación fue estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) en las variables de crecimiento. Las plantas inoculadas registraron mayores valores con respecto a Psi (Figs. 4A-C); sin embargo, FN y FNSF acumularon la misma biomasa (Fig. 4C) y la prueba estadística de concentración de N no arrojó diferencias significativas. Por tanto, el N adicional fijado por FN no es el factor determinante en el crecimiento.

### Discusión

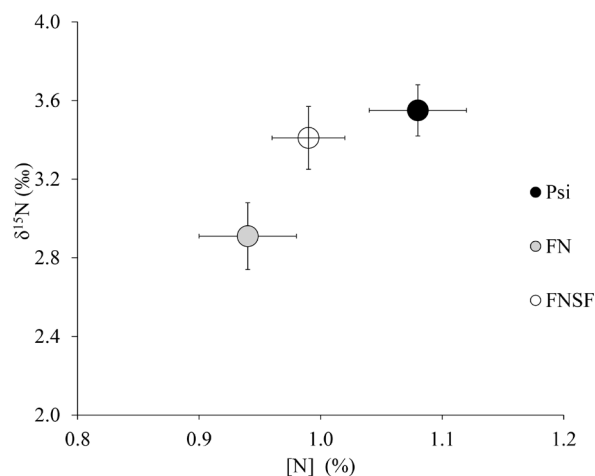
El crecimiento de las plántulas de *F. uhdei* es ligeramente inferior que *Mezilaureus itauba* (Meisn.) Taub. ex Mez, producida con arena, tierra, cascarilla de arroz carbonizada



**Cuadro 2:** Contenido total de macronutrientes (promedio±error estándar) en plantas de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh., producidas con 0 y 5 mM de N e inoculadas con cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978. FN=*A. brasilense* fijadora de N<sub>2</sub>, SF=*A. brasilense* solubilizadora de fosfatos, FNSF=La combinación de cepas. Valores promedio con la misma letra en la misma fila, no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ns: no significativo.

| Nutriente | Plantas<br>sin inocular | Plantas inoculadas |                  |                  |
|-----------|-------------------------|--------------------|------------------|------------------|
|           |                         | FN                 | SF               | FNSF             |
| N (mg)    |                         |                    |                  |                  |
| Vástago   | 5.95±1.19 ns            | 4.94±1.28<br>ns    | 8.09±1.91<br>ns  | 7.07±1.96<br>ns  |
| Raíz      | 4.70±0.69 ab            | 3.45±0.69 b        | 6.10±0.62<br>a   | 6.00±1.32 a      |
| Total     | 10.65±1.53 ab           | 8.39±1.92 b        | 14.19±2.40<br>a  | 13.07±3.25<br>ab |
| P (mg)    |                         |                    |                  |                  |
| Vástago   | 0.39±0.04 b             | 0.39±0.04 b        | 0.67±0.13<br>a   | 0.60±0.28 a      |
| Raíz      | 0.31±0.03ns             | 0.41±0.04<br>ns    | 0.42±0.05<br>ns  | 0.40±0.09<br>ns  |
| Total     | 0.70±0.05 ns            | 0.80±0.08<br>ns    | 1.09±0.17<br>ns  | 1.00±0.36<br>ns  |
| K (mg)    |                         |                    |                  |                  |
| Vástago   | 6.14±0.69 b             | 8.62±0.92<br>ab    | 9.04±1.21<br>ab  | 10.33±2.00<br>a  |
| Raíz      | 10.53±1.40 ns           | 13.15±1.29<br>ns   | 14.05±2.14<br>ns | 14.08±2.81<br>ns |
| Total     | 16.67±1.40 ns           | 21.77±1.97<br>ns   | 23.09±3.24<br>ns | 24.41±4.70<br>ns |

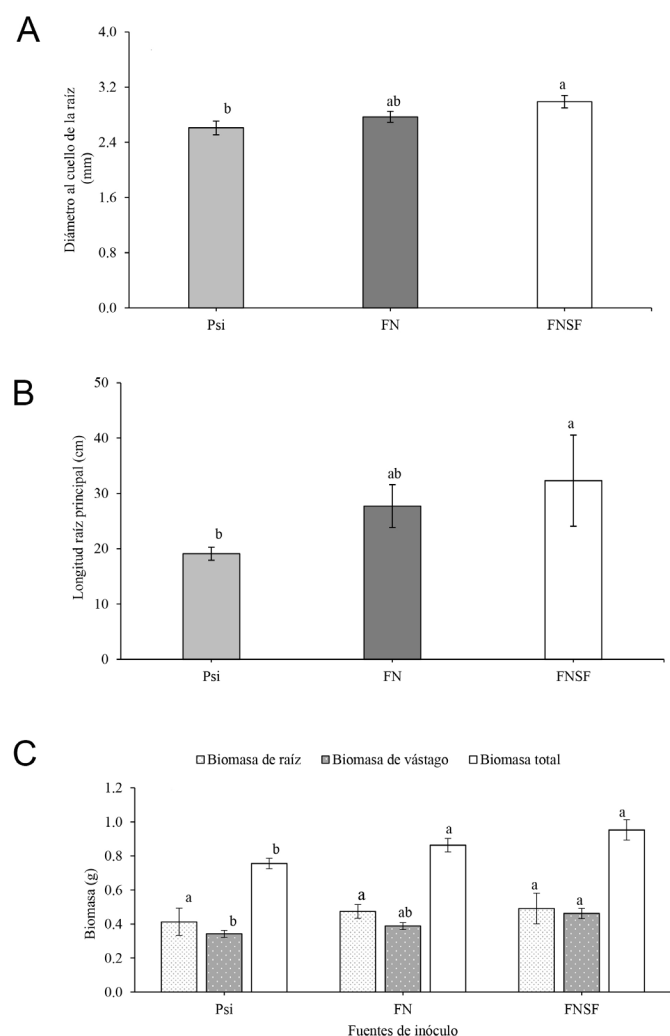
y composta de origen orgánico (1:1:1:1), donde la inoculación con *A. brasilense* generó una ganancia en altura y diámetro al cuello de la raíz de 23.95% y 9.7%, respectivamente (Smiderle et al., 2024). En contraste, con el suministro de fertilizantes, en el cultivar de olivo Arbequina la tasa de crecimiento en altura varió de 0.0 a 81.1%, mientras que el diámetro al cuello de la raíz no fue influenciado por la inoculación (Boeni et al., 2024). El olivo y el fresno pertenecen a la misma familia botánica; sin embargo, presentan hábitos de crecimiento contrastantes. Mientras que *M. itauba* (Lauraceae) se distribuye en zonas cálidas, el fresno lo hace en zonas templadas. Por tanto, esto muestra que los beneficios de una RPCV son influenciados por la interacción con el árbol huésped, factores ambientales y prácticas de manejo (Nair et



**Figura 3:** Concentración de N (% de peso seco) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) del vástago de plantas de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. inoculadas con cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978. Psi=Plantas sin inocular, FN=Plantas inoculadas con *A. brasilense* fijadora de N<sub>2</sub>, FNSF=Plantas inoculadas con FN y *A. brasilense* solubilizadora de fosfatos. Las barras sobre los puntos indican errores estándar.

al., 2021). Este estudio muestra ganancias absolutas, a diferencia de los estudios antes mencionados que presentan ganancias relativas, las cuales pudieran sobredimensionar los efectos benéficos de la inoculación; por tanto, conviene ser medurado con la presentación de resultados positivos (Tosi et al., 2020).

El área foliar fue mayor (15-30% en ganancia absoluta) en el tratamiento de inoculación con SF y con FNSF con respecto Psi (Fig. 1). En *Tabebuia donnell-smithii* Rose la inoculación con *A. brasilense* también favoreció mayor número de hojas (Aguirre-Medina et al., 2014a). Los aumentos en longitud y ancho de hojas, además de otras variables de crecimiento se atribuyen a la producción de fitohormonas (Park et al., 2017). Cabe recalcar que las cepas empleadas en este estudio son productoras de ácido indol acético; este sería uno de los principales elementos que favorece el crecimiento. Con relación a las diferencias significativas en acumulación de biomasa entre plantas inoculadas y plantas testigo, únicamente éstas se manifestaron en los primeros meses posteriores a la inoculación. Tal condición también se observó en las primeras etapas de crecimiento en *A. angustifolia* (Kondo et al., 2024) y en *F. americana* (Liu et al., 2013). Es claro que para completar su crecimiento y metabolismo



**Figura 4:** Valores registrados en plantas sin inocular o inoculadas. A. Diámetro al cuello de la raíz, B. Longitud de raíz principal, C. Biomasa (promedio ± error estándar) de plantas de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh. inoculadas con cepas de *Azospirillum brasilense* Terrand, Krieg & Döbereiner, 1978. Psi=Plantas sin inocular, Plantas con FN=Plantas inoculadas con *A. brasilense* fijadora de  $N_2$ , Plantas con FNSF=Plantas inoculadas con FN y *A. brasilense* solubilizadora de fosfatos.

las plantas requieren el suministro de elementos minerales. Sin embargo, el potencial de RPCV también puede determinarse reduciendo las sinergias con la materia orgánica y el uso de fertilizantes (Heydari et al., 2023).

Los efectos de la interacción en la fluorescencia de la clorofila fueron más notorios en los tratamientos con SF, ya que el suministro de N mejoró en términos absolutos la Fv/Fm 0.04 y 0.03, respectivamente (Fig. 2). Los resultados coinciden con los hallazgos en *C. estrellensis*, donde, sin el aporte de 5 mM de N la relación Fv/Fm disminuye, y con el

suministro de N mejora aproximadamente 0.08 (Calzavara et al., 2021).

En plantas de olivo recibiendo aportes de N, P y K, se reportan aumentos de 0.04 a 0.16 de Fv/Fm (Boeni et al., 2024). El tratamiento Psi, a diferencia de los tratamientos de inoculación, no presentó disminución de Fv/Fm, manteniendo sus niveles con y sin suministro de N (Fig. 2). Esto indicaría que las plantas inoculadas al suministrar fuentes de carbono a las RPCV vía exudados radicales destinan recursos energéticos a fin de mantener su microbioma asociado (Vives-Peris et al., 2020).

Los tratamientos con SF incrementaron los contenidos de N, P y K (Cuadro 2). Es conocido que existe elevada correlación entre N y P, pues en ausencia de P se reduce la absorción de N (Tofa et al., 2022), pudiendo ser esta la razón por la cual FN presentó menor contenido de N que Psi, siendo la combinación FNSF el mejor tratamiento (Cuadro 2). Las Psi presentaron menor tasa de crecimiento y generalmente cuando las tasas de crecimiento son bajas, los nutrimentos pueden tener concentraciones superiores al nivel crítico (López-López y Alvarado-López, 2010).

Los resultados de este estudio muestran relación con los de *A. angustifolia*, donde la inoculación con *A. brasilense* incrementa el contenido de N, así como P y K (Kondo et al., 2024). Al igual que en el estudio de Aguirre-Mediana et al. (2014b) en plantas de *Cedrela odorata* L., el contenido de N y P mejora en porcentajes similares a los reportados en este trabajo. El incremento de estos nutrimentos es una característica que exhibe *A. brasilense* cuando se combina con aplicaciones de nitrógeno (Sivasakthivelan et al., 2023).

Con base en la revisión de la literatura, la cuantificación de N derivado por fijación biológica en *F. uhdei* inoculado con *A. brasilense* no se ha reportado. Plantas con mayor dependencia del N del suelo presentarán valores mayores de  $\delta^{15}N$  (Pang et al., 2023), como fue el caso de Psi. Los valores de  $\delta^{15}N$  en el vástago de plantas de fresno (2.21 a 4.24‰) fueron similares a los observados en hojas de *Gliricidia sepium* Jacq. Kunth ex Walp. ( $\delta^{15}N$  2.2 a 3.9‰) (Kaba et al., 2019), determinados con el mismo método empleado en el presente estudio.

En el vástago de plantas de pimiento inoculadas con *A. brasilense* y *Pantoea dispersa* Gavini et al., 1989 solubilizadora de fosfatos se reportan valores cercanos a 4  $\delta^{15}N$ ‰





(Flores et al., 2010). El %Ndfa estimado en plantas de fresno (16.1%) es inferior en comparación con plántulas de palma de aceite 31.6 %Ndfa (Amir et al., 2003) y en gramíneas 35.2% Ndfa igualmente inoculadas con *A. brasilense* (Aguirre et al., 2020).

La amplia variabilidad del %Ndfa estimado en las plantas analizadas, muestra que las plántulas de fresno exhiben diferentes niveles de fijación de  $N_2$  con base en su capacidad para interactuar con las cepas de *A. brasilense*. La interacción entre la planta huésped y la cepa bacteriana es uno de los factores que influye en la fijación de  $N_2$  (Nair et al., 2021). En la producción de fresno, la semilla se obtuvo de cuatro árboles madre y el contraste entre valores máximos y mínimos del %Ndfa sugiere la necesidad de seleccionar individuos de fresno capaces de aprovechar más eficiente los beneficios de las bacterias fijadoras de  $N_2$ .

Dado que el N adicional fijado por FN no es el factor determinante en el crecimiento, este estaría en función de otros mecanismos presentes en *A. brasilense*, como la producción de proteínas y carbohidratos que mejoran el enraizamiento (Gonzalez et al., 2024). Aunque las cepas de *A. brasilense* no mejoraron la biomasa de raíz, sí favorecieron mayor longitud de raíz principal, con aumentos del 45-69% en los tratamientos de inoculación con respecto a plantas testigo (Fig. 4B). Puesto que las cepas empleadas son productoras de ácido indolacético (Carcaño-Montiel et al., 2006), es probable que este sea el mecanismo que impulsa mayor longitud de raíz.

## Conclusiones

La inoculación combinada de *Azospirillum brasilense* fijadora de  $N_2$  y *A. brasilense* solubilizadora de fosfatos, estimula mejor crecimiento, vitalidad y contenido nutrimental de plantas de *Fraxinus uhdei*. El suministro de 5 mM de N, favoreció la vitalidad de las plantas únicamente en los primeros meses de crecimiento. La fijación de  $N_2$  fue una de las fuentes de abastecimiento de N en plantas de fresno inoculadas con FN; aunque no fue el factor principal que mejoró su crecimiento. La inoculación con FN muestra que existe el potencial de uso biotecnológico en la producción de plantas de fresno haciendo uso reducido de fertilizantes nitrogenados, ya que fenotipos de fresno registraron alrededor de 40% de fijación de nitrógeno atmosférico.

## Contribución de autores

Conceptualización del estudio: JCC, TM-T, JP; Recursos: MGC, AG, ML; Curación de datos: JCC; Investigación: JCC, TM; Metodología: ML, AG; Redacción - borrador original: JCC; Revisión y edición: TM-T, JCC, AG, ML.

## Financiamiento

El primer autor recibió apoyo económico de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) para sus estudios de posgrado. El proyecto de investigación recibió apoyo parcial de la LGAC "Mejoramiento Estructural y Funcional de Ecosistemas Forestales" del Colegio de Postgraduados.

## Agradecimientos

Al personal del laboratorio de Microbiología de Suelos, del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## Literatura citada

- Adeniji, A., A. E. Fadiji, S. Li y R. Guo. 2024. From lab bench to farmers' fields: co-creating microbial inoculants with farmers input. *Rhizosphere* 31: 100920. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100920>
- Aguirre, P. F., S. J. Giacomini, C. J. Olivo, V. F. Bratz, M. P. Quatrin y G. L. Schaefer. 2020. Biological nitrogen fixation and urea-N recovery in 'Coastcross-1' pasture treated with *Azospirillum brasilense*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 55: e01242. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01242>
- Aguirre-Medina, J. F., F. Culebro-Cifuentes, J. Cadena-Iñiguez y J. F. Aguirre-Cadena. 2014a. Crecimiento de *Tabebuia donnell-smithii* Rose inoculada con hongos micorrízicos y *Azospirillum brasilense*. *Agrociencia* 48(3): 331-345.
- Aguirre-Medina, J. F., F. O. Mina-Briones, J. Cadena-Iñiguez, J. D. Dardón-Zunun y D. A. Hernández-Sedas. 2014b. Crecimiento de *Cedrela odorata* L. biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20(3): 177-183. DOI: <https://doi.org/10.5154/rchscfa.2014.01.001>
- Alcántar-González, G. y M. Sandoval-Villa. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal: guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial



- número 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 156 pp.
- Allouzi, M. M. A., S. M. A. Allouzi, Z. X. Keng, C. V. Supramaniam, A. Singh y S. Chong. 2022. Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. *Heliyon* 8(12): e12609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12609>
- Amir, H. G., Z. H. Shamsuddin, M. S. Halimi, M. F. Ramlan y M. Marziah. 2003. N<sub>2</sub> fixation, nutrient accumulation and plant growth promotion by rhizobacteria in association with oil palm seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(14): 1269-1272. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.1269.1272>
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel, J. Delgadillo-Martínez, V. M. Cetina-Alcalá y G. Mata. 2022. Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Acta Botanica Mexicana* 129: e2024. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2024>
- Barragán-Soriano, J. L., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaraz-Suárez, M. G. Carcaño-Montiel y K. I. Medrano-Ortiz. 2018. La inoculación con un hongo ectomicorrízico comestible y bacterias incrementa el crecimiento y mejora la calidad fisiológica de *Pinus montezumae*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 24(1): 3-16. DOI: <https://doi.org/10.5154/rchscfa.2017.01.010>
- Benavides Meza, H. M. 2023. La cubierta arbórea de la Alameda Central de la Ciudad de México: 1ª parte. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 14(75): 4-34. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v14i75.1294>
- Boeni, M., G. P. K. Steffen, J. Maldaner, L. A. Tabaldi, I. F. Conterato, C. W. Saldanha y F. C. B. Vieira. 2024. Growth-promoting microorganisms as a sustainable alternative to optimize the productive potential of olive plants. *Scientia Horticulturae* 332: 113167. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113167>
- Brand, W. A., T. B. Coplen, J. Vogl, M. Rosner y T. Prohaska. 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 86(3): 425-467. DOI: <https://doi.org/10.1515/pac-2013-1023>
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In: Dinauer, R. C. (ed.). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA. Pp. 1149-1178.
- Calzavara, A. K., M. F. Hertel, T. V. Debiasi, A. N. Tiepo, A. L. M. de Oliveira, H. C. Oliveira, R. Stolf-Moreira y J. A. Pimenta. 2021. Does inoculation with associative bacteria improve tolerance to nitrogen deficiency in seedlings of Neotropical tree species? *Environmental and Experimental Botany* 189: 104529. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104529>
- Chaiya, L., P. Gavinlertvatana, N. Teaumroong, W. Pathom-Aree, A. Chaiyasen, R. Sungthong y S. Lumyong. 2021. Enhancing teak (*Tectona grandis*) seedling growth by rhizosphere microbes: A sustainable way to optimize agroforestry. *Microorganisms* 9(9): 1990. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091990>
- Carcaño-Montiel, M. G., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J. D. Molina-Galán y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24(4): 493-502.
- Cordero, I., J. J. Pueyo y A. Rincón. 2024. Bio-fertilisation with native plant growth promoting rhizobacteria increases the tolerance of the neotropical legume tree *Caesalpinia spinosa* to water deficit. *Forest Ecology and Management* 558: 121786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.121786>
- Da Costa, P. B. D., C. E. Granada, A. Ambrosini, F. Moreira, R. de Souza, J. F. M. dos Passos, L. Arruda y L. M. P. Passaglia. 2014. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *Plos One* 9(12): e116020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116020>
- Flores, P., J. Fenoll, P. Hellin y P. Aparicio-Tejo. 2010. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedlings. *Applied Soil Ecology* 46(3): 335-340. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.009>
- Glick, B. R. 2020. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Springer, New York, USA. 383 pp. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9>
- Gonzalez, A. J., M. E. Yarte, B. E. Llorente y E. E. Larraburu. 2024. Biochemical changes by *Azospirillum brasilense* enhance



- jojoba rooting under salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 156(2): 56. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02665-6>
- Hernández-Álvarez, E., A. G. Rodríguez, C. M. G. Paredes, C. G. R. Ramírez y M. A. H. Tovar. 2022. Diagnóstico ecológico y fitosanitario de un parque urbano del área metropolitana de Guadalajara, México. *e-CUCBA* 9(18): 114-122. DOI: <https://doi.org/10.32870/ecucba.vi18.247>
- Hernández-López, P., T. Martínez-Trinidad, L. Mohedano-Caballero, P. Hernández-De la Rosa, M. D. J. González-Guillén y J. Fonseca-González. 2024. Indicadores de descomposición interna del tronco de fresno (*Fraxinus uhdei*) en el Parque Nacional Molino de Flores Netzahualcóyotl, México. *Bosque* 45(2): 245-256. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-92002024000200245>
- Heydari, M., S. Hajinia, N. Jafarian, M. Karamian, Z. Mosa, S. Asgharzadeh, N. Rezaei, L. Guidi, O. Valkó y B. Prévosto. 2023. Synergistic use of biochar and the plant growth-promoting rhizobacteria in mitigating drought stress on oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedlings. *Forest Ecology and Management* 531: 120793. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.120793>
- Kaba, J. S., S. Zerbe, M. Agnolucci, F. Scandellari, A. A. Abunyewa, M. Giovannetti y M. Tagliavini. 2019. Atmospheric nitrogen fixation by gliricidia trees (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp.) intercropped with cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant and Soil* 435: 323-336. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3897-x>
- Kondo, Y. R., S. P. da Cruz, C. Chanway y G. Kaschuk. 2024. Inoculation with *Azospirillum brasilense* or *Bacillus* spp. improves root growth and nutritional quality of araucaria (*Araucaria angustifolia*) seedlings. *Forest Ecology and Management* 568: 122092. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2024.122092>
- Liu, F., S. Xing, H. Ma, Z. Du y B. Ma. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 4617-4625. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4255-1>
- López-López, M. Á. y J. Alvarado-López. 2010. Interpretación de nomogramas de análisis de vectores para diagnóstico nutricional de especies forestales. *Madera y Bosques* 16(1): 99-108. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2010.1611182>
- López-Reyes, L., M. G. Carcaño-Montiel, T. López Lilia, G. Medina-de la Rosa y R. A. Tapia-Hernández. 2017. Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. *mexicana*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50(13-14): 727-743. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1372247>
- Macías-Muro, A., T. Martínez-Trinidad, J. R. Valdez-Lazalde y H. Vaquera-Huerta. 2023. Concentración de ozono y vitalidad de árboles en la zona metropolitana de Guadalajara. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 10(3): e3824. DOI: <https://doi.org/10.19136/era.a10n3.3824>
- Manandhar, S., R. Tuladhar, K. Prajapati, A. Singh y A. Varma. 2017. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Piriformospora indica* on *Oryza sativa* in presence of vermicompost. In: Varma, A., R. Prasad y N. Tuteja (eds.). *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration*. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 327-339. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_18)
- Morales-Gallegos, L. M., T. Martínez-Trinidad, P. Hernández-de la Rosa, A. Gómez-Guerrero, D. Alvarado-Rosales y L. D. L. Saavedra-Romero. 2023. Diversidad, estructura y salud del arbolado en áreas verdes de la ciudad de Texcoco, México. *Bosque* 44(2): 401-414. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-92002023000200401>
- Nair, P. K. R., B. M. Kumar y V. D. Nair. 2021. Biological nitrogen fixation and nitrogen fixing trees. In: Ramachandran Nair, P. K., B. Mohan Kumar y V. D. Nair (eds.). *An introduction to agroforestry*. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 413-443. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-75358-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-75358-0_17)
- Pang, Z., X. Mao, S. Zhou, S. Yu, G. Liu, C. Lu, J. Wan, L. Hu y P. Xu. 2023. Microbiota-mediated nitrogen fixation and microhabitat homeostasis in aerial root-mucilage. *Microbiome* 11(1): 85. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01525-x>
- Park, Y. G., B. G. Mun, S. M. Kang, A. Hussain, R. Shahzad, C. W. Seo, A. Y. Kim, S. U. Lee, K. Y. Oh, D. Y. Lee, I. J. Lee y B. W. Yun. 2017. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE* 12(3): e0173203. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>
- Pérez-Baltazar, I., A. L. Báez-Pérez, V. Osuna-Vallejo, C. Armendáriz-Arnez y R. Lindig-Cisneros. 2020. Crecimiento de *Fraxinus uhdei* inoculado con dos cepas ectomicorrízicas



- en dos sustratos, uno contaminado con Mercurio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 36(2): 455-464. DOI: <https://doi.org/10.20937/rica.53543>
- Rafique, N., S. Khalil, M. Cardinale, A. Rasheed, Z. H. A. O. Fengliang y Z. Abideen. 2024. A comprehensive evaluation of the potential of plant growth-promoting rhizobacteria for applications in agriculture in stressed environments. *Pedosphere* 35(1): 229-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2024.02.005>
- R Core Team. 2024. R: A language and environment for statistical computing (Version 4.4.1). R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Reis, V.M., V.L.D. Baldani y J.I. Baldani. 2015. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: Cassán, F., Y. Okon y C. Creus (eds.). *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 3-26. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_1)
- Rosier, C. L., S. W. Polson, V. D'Amico III, J. Kan y T. L. E. Trammell. 2021. Urbanization pressures alter tree rhizosphere microbiomes. *Scientific Reports* 11(1): 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88839-8>
- Shi, H. 2024. Exploring vegetation chlorophyll fluorescence with leaf dorsiventrality. *Remote Sensing of Environment* 313: 114342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2024.114342>
- Sivasakthivelan, P., P. Saranraj, R. Z. Sayyed, K. Arivukkarasu, M. Kokila, M. Manigandan y S. Seifi. 2023. Inoculant production and formulation of *Azospirillum* species. In: Mawar, R., R. Z. Sayyed, S. K. Sharma y K. S. Sattiraju (eds.). *Plant growth promoting microorganisms of arid region*. Springer, Singapore. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-19-4124-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-19-4124-5_19)
- Smiderle, O. J., A. G. Souza, H. E. Lima-Primo y P. R. O. Fagundes. 2024. Efficiency of organomineral fertilizer and doses of *Azospirillum brasilense* on the morphophysiological quality of *Mezilaurus itauba* seedlings. *Brazilian Journal of Biology* 84: 279851. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.279851>
- Tofa, A. I., A. Y. Kamara, B. A. Babaji, K. T. Aliyu, T. D. Ademulegun y J. F. Bebeley. 2022. Maize yield as affected by the interaction of fertilizer nitrogen and phosphorus in the Guinea savanna of Nigeria. *Heliyon* 8(11): e11587. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11587>
- Tosi, M., E. K. Mitter, J. Gaiero y K. Dunfield. 2020. It takes three to tango: the importance of microbes, host plant, and soil management to elucidate manipulation strategies for the plant microbiome. *Canadian Journal of Microbiology* 66(7): 413-433. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0085>
- Van der Walt, M., J. M. Berner y C. A. Breed. 2024. The vitality of native grassland plants in current urban climatic conditions in Gauteng, South Africa. *Ecological Indicators* 158: 111332. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111332>
- Vives-Peris, V., C. De Ollas, A. Gómez-Cadenas y R. M. Pérez-Clemente. 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports* 39(1): 3-17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>

