

## Producción de plántulas de hortalizas con *Azospirillum* sp. y aspersión foliar de miel de abeja\*

### Production of vegetable seedlings with *Azospirillum* sp. and foliar spray with bee honey

Wendy Cruz Romero<sup>1</sup>, Juan Manuel Barrios Díaz<sup>1§</sup>, Maria de las Nieves Rodríguez Mendoza<sup>2</sup>, David Espinoza Victoria<sup>2</sup> y Juan Luis Tirado Torres<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-Facultad de Ingeniería Agrohidráulica. Av. Universidad S/N. San Juan Acateno, Teziutlán, Pue. C.P. 73965. Tel. y Fax (231)3122933. (cruzrw@hotmail.com; barriosdia@hotmail.com). <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México- Texcoco km 36.5. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. (marinie@colpos.mx; despinos@colpos.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: juan.barrios@correo.buap.mx.

#### Resumen

Con el objetivo de proponer biotecnologías para la producción sustentable de almácigos de hortalizas, fueron evaluadas como alternativas de nutrición de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica), cebolla (*Allium cepa* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la inoculación con cepas 7A y AMRp10 de *Azospirillum* y la aspersión foliar de miel de abeja 2% (AFMA), determinando su efecto en la altura, área foliar, diámetro de tallo, peso seco, unidades SPAD y diámetro de bulbo (cebolla). El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero empleando un diseño completamente al azar y utilizando como unidades experimentales almácigos comerciales con una mezcla de peat moss y perlita como sustrato. Los resultados indican que la aspersión foliar de miel de abeja 2% incrementó significativamente la altura (13%), área foliar (38%) y peso seco (30%) de las plántulas de brócoli, en las plántulas de lechuga la altura y área foliar fueron mayores que con A.AMRp10 en 18 y 98%, respectivamente, además, en las plántulas de tomate la altura aumentó 23 %, también con respecto a A.AMRp10. Por otra parte, con la inoculación de A.7A, en las plántulas de brócoli se incrementaron 7% las unidades SPAD respecto al tratamiento AFMA y 11% el diámetro de tallo

#### Abstract

With the goal of proposing biotechnology for the sustainable production of vegetable seedbeds, broccoli (*Brassica oleracea*. Italica Group), onion (*Allium cepa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings were evaluated as nutrition alternatives, inoculated with 7A and AMRp10 strains of *Azospirillum* and foliar spray with 2% bee honey (AFMA) to determine the effect on height, leaf area, stem diameter, dry weight, SPAD units and bulb diameter (onion). The experiment was done in greenhouse conditions using a completely random design and the experimental units used were commercial seedbeds with a mixture of peat moss and perlite as a substrate. The results indicate that the foliar spray with 2% bee honey significantly increased the height (13%), foliar leaves (38%) and dry weight (30%) of broccoli seedlings. In lettuce seedlings, the height and the leaf area were greater with A. AMRp10 in 18 and 98%, respectively. Furthermore, height increased 23% in tomato seedlings with A. AMRp10. On the other hand, with the inoculation of A. 7A, SPAD units increased 7% in the broccoli seedlings when compared to the AFMA treatment and the stem diameter increased 11% compared with A. AMRp10. The leaf area of the tomato seedlings also increased 52% with

\* Recibido: julio de 2015  
Aceptado: enero de 2016

en comparación con *A. AMRp10*, pero también el área foliar de las plántulas de tomate fue 52% mayor con respecto a *A. AMRp10*. En esta investigación, la inoculación con la cepa 7A de *Azospirillum* y la aspersión foliar de miel de abeja, demostraron que tienen efectos promotores del crecimiento vegetal, por lo tanto constituyen una alternativa promisoriosa y viable para la producción de plántulas de hortalizas.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, almácigo, biofertilizante, inoculante microbiano, miel de abeja.

## Introducción

Actualmente es importante continuar investigando sobre estrategias y técnicas sustentables para la producción de almácigos de hortalizas que permitan incrementar su calidad, vigor y adaptabilidad, es decir, plántulas con raíces bien desarrolladas y de rápida adaptación a las condiciones de estrés causadas por el trasplante, pero al mismo tiempo lograr reducir el uso excesivo de agroquímicos.

Una biotecnología en continuo desarrollo involucra el uso de microorganismos identificados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) o PGPR por sus siglas en inglés (Vessey, 2003), entre las cuales el género *Azospirillum* es de los más estudiados (Hernández *et al.*, 2001) y se clasifican como microorganismos diazotróficos, asociados de forma endofítica o rizosférica a cereales y pastos de diferentes regiones del mundo. Se tienen descritas cinco especies (De-Bashan *et al.*, 2007) y se han utilizado diferentes cepas como biofertilizantes comerciales en varios países, incluido México, debido a su capacidad para estimular el crecimiento de las plantas y aumentar el rendimiento de los cultivos en variados ambientes y condiciones edáficas (Di Barbaro *et al.*, 2005), lo cual es reportado en numerosos estudios sobre su ecología, fisiología y genética (Tilak *et al.*, 2005), por lo tanto, constituyen una alternativa nutricional para los cultivos, favoreciendo el equilibrio de los agroecosistemas (Reganold *et al.*, 1990) al restaurar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Newman y Reynolds, 2005), contribuyendo a la producción sostenible de alimentos (Abiven y Recous, 2007).

Por otra parte, también se ha investigado en diferentes cultivos el efecto de la miel de abeja sobre algunas variables del crecimiento y desarrollo, así por ejemplo, en tomate, se ha reportado un aumento del vigor de las plantas, reflejado

regards to the *A. AMRp10*. In this research, the inoculation of the 7A strain of *Azospirillum* and foliar spray with bee honey showed to have developing effects on plant growth; therefore they constitute a promising and feasible alternative for the production of vegetable seedlings.

**Keywords:** *Azospirillum*, bee honey, bio-fertilizer, microbial inoculant, seedbed.

## Introduction

Presently, it is important to continue researching sustainable strategies and techniques for the production of vegetable seedbeds that help to improve their quality, strength and adaptability. Seedlings need to have well-developed roots and be easily adaptable to the stress conditions caused by transplantation, and at the same time the excessive use of agrochemicals needs to be reduced.

A continuously developed biotechnology involves the use of microorganisms identified as plant growth-promoting rhizobacteria (Vessey, 2003), among which the *Azospirillum* genus is one of the most studied (Hernández *et al.*, 2001); they are classified as diazotrophic microorganisms and are associated endophytically or rhizosphericly with grains and grasses from different regions of the world. Five species have been described (De-Bashan *et al.*, 2007) and different strains have been used as commercial bio-fertilizers in several countries, including Mexico, due to their ability to stimulate plant growth and increase the yield of the cultures in different environments and edaphic conditions (Di Barbaro *et al.*, 2005). Several studies have reported their ecology, physiology and genetic features (Tilak *et al.*, 2005). Thus, these species constitute a nutritional alternative for cultures, stimulating the balance of the agro-ecosystems (Reganold *et al.*, 1990) by restoring the physical, chemical and biological properties of the ground (Newman and Reynolds, 2005) and they contribute to the sustainable production of food (Abiven and Recous, 2007).

On the other hand, the effect of bee honey on some growth and development variables, such as in tomato seedlings, has also been investigated. An increase in the strength of the plants has been reported, reflected in the increase of height, stem diameter, leaf area and stimulation of the formation of the secondary xylem in less time (Villegas-Torres *et al.*,

en el incremento de altura, diámetro de tallo, área foliar y estimulación de la formación del xilema secundario en menor tiempo (Villegas-Torres *et al.*, 2001), en el cultivo de mango redujo la incidencia y severidad de la malformación floral conocida como “escoba de bruja” (Donald *et al.*, 2002) y en plantas ornamentales como *Lilium* (Betancourt-Olvera *et al.*, 2005) y Tulipán (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011) favoreció la altura, diámetro de tallo, vida de anaquel y resistencia al acame, los cuales son parámetros importantes que determinan la calidad de la flor para corte.

Con base en lo anterior, el objetivo de la investigación fue evaluar la aspersión foliar de miel de abeja y la inoculación de *Azospirillum* (7A y AMRp10) en el crecimiento de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) cv. Legacy, cebolla (*Allium cepa* L.) cv. Victoria, lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Salinas y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Río Grande.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en un invernadero con dimensiones de 7.0 m de ancho por 18.0 m de largo tipo túnel de estructura metálica y cubierta de polietileno, ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en Texcoco Estado de México. El material vegetal utilizado fue: brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*), cebolla (*Allium cepa* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Para el crecimiento de las plántulas se utilizaron charolas germinadoras de 200 cavidades y como sustrato una mezcla de peat moss y perlita a una relación en volumen de 3:2. En cada uno de los cultivos establecidos se evaluaron cuatro tratamientos: a) Inoculación con *Azospirillum* 7A (A.7A); b) Inoculación con *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10); c) Aspersión foliar con miel de abeja 2% (AFMA); y d) tratamiento testigo, sin inoculación de una cepa y sin AFMA.

Las cepas bacterianas de *Azospirillum*, 7A (aislada del cultivo de maíz del estado de Puebla) y AMRp10 (aislada del rizoplano de maíz criollo, del Estado de Tlaxcala) fueron proporcionadas por el cepario del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). La suspensión bacteriana utilizada se preparó a partir de una colonia aislada en medio de cultivo líquido NFB sin agar (Day y Dobreiner, 1976), conteniendo  $10^7$  células mL<sup>-1</sup> de inóculo empleado y determinado a partir de la escala de McFarland (McFarland,

2001). In the cultivation of mango, the incidence and severity of floral malformation known as “witch’s broom” (Donald *et al.*, 2002) has been reduced. And, in ornamental plants such as *Lilium* (Betancourt-Olvera *et al.*, 2005) and Tulip (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011) it has favored height, stem diameter, shelf life and resistance to the flattening of leaves, which are important parameters that determine the quality of the flower to be cut.

Based on the foregoing, the objective of the research was to evaluate foliar spray with bee honey and inoculation of *Azospirillum* (7A and AMRp10) in the growth of broccoli (*Brassica oleracea* Italica Group) cv. Legacy, onion (*Allium cepa* L.) cv. Victoria, lettuce (*Lactuca sativa* L.) cv. Salinas and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Río Grande seedlings.

## Materials and methods

The study was done in a greenhouse with dimensions of 7.0 m wide by 18.0 m long, in a tunnel formation with a metallic structure covered in polyethylene, located in the Colegio de Postgraduados, Montecillo Campus, in Texcoco, State of Mexico. The plant materials used were: broccoli (*Brassica oleracea* Italica Group), onion (*Allium cepa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). For the growth of the seedlings, seed trays with 200 cavities were used and a mixture of peat moss and perlite was used as a substrate in a volume ratio of 3:2. In each one of the established cultures, four treatments were evaluated: a) inoculation with *Azospirillum* 7A (A.7A); b) inoculation with *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10); c) foliar spray with 2% bee honey (AFMA); and, d) control treatment, without inoculation and without AFMA.

The bacterial strains of *Azospirillum*, 7A (isolated from the corn culture from the state of Puebla) and AMRp10 (isolated from the rhizoplane of creole corn from the state of Tlaxcala) were provided by the culture collection of the Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). The bacterial suspension used was prepared from an isolated colony in the middle of a liquid NFB culture without agar (Day and Dobreiner, 1976), with  $10^7$  cells mL<sup>-1</sup> of inoculum employed and determined by the McFarland scale (McFarland, 1907). Inoculation was done after the seedlings sprouted, adding 0.1 ml of the bacterial suspension to the base of the stem.

1907). La inoculación se realizó después de emergidas las plántulas, agregando 0.1 mL de la suspensión bacteriana a la base del tallo.

La aspersión foliar con miel de abeja para el tratamiento al que se hace referencia se realizó con una miel comercial (Carlota®), cada siete días a partir de la emergencia de las plántulas, la miel diluida en agua se aplicó a una concentración 2% en relación peso: volumen (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011). Los almácigos fueron regados dos veces por día de la siguiente manera: después de la siembra, el riego fue con agua destilada de pH ajustado a 5.5 con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N e hidróxido de sodio (NaOH) 1N; posterior a la emergencia de las plántulas y durante un período de 15 días, se irrigaron con la solución nutritiva propuesta por Steiner (Steiner, 1980) diluida 50%; finalmente y hasta concluir la etapa de almácigo, el riego se realizó con la solución Steiner a su concentración original.

### Variables evaluadas

A los 30 días después de la siembra (DDS), en las plántulas brócoli, lechuga y jitomate se determinaron: el contenido de clorofila con el medidor portátil SPAD-502® de Minolta, considerando el promedio de tres lecturas por planta, de hojas situadas en la parte superior a una misma altura y posición (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998); la altura de plántula fue medida desde la parte basal hasta el meristemo apical; el área foliar se obtuvo con un integrador marca Li-Cor Modelo Li-3000A® (Ruíz-Espinoza *et al.*, 2007); el diámetro de tallo en las plántulas de brócoli y jitomate se midió con un vernier; el peso seco de plántula se determinó después de haber lavado las muestras vegetales con agua destilada y secadas en una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 72 h (Alcántar-González and Sandoval-Villa, 1999). La evaluación de las plántulas de cebolla se realizó a los 45 DDS, considerando las variables antes mencionadas y además se midió el diámetro de bulbo utilizando un vernier electrónico digital.

### Análisis estadístico

La unidad experimental estuvo conformada por 50 plántulas, de las cuales 15 plántulas de cada repetición (cuatro en total), fueron consideradas para la medición de las variables de respuesta. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño completamente al azar. Para los análisis de varianza, comparación de medias (LSD,  $p=0.05$ ) y correlación entre las variables se utilizaron los procedimientos ANOVA y CORR del paquete computacional estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 8.0 (SAS, 1999).

The foliar spray with bee honey for the aforementioned treatment used commercial honey (Carlota®). Every seven days from the emergence of the seedlings, diluted honey in water was applied with a 2% concentration in a weight: volume relation (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2011). The seedbeds were sprayed two times a day in the following manner. After the sowing, irrigation was done with pH distilled water adjusted to 5.5 with sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N and sodium hydroxide (NaOH) 1N. Then, after the emergence of the seedlings and during a period of 15 days, they were irrigated with the nutritional solution proposed by Steiner (Steiner, 1980) and diluted 50%. Finally and until concluding the seedbed stage, irrigation was done with the Steiner solution in its original concentration.

### Evaluated variables

30 days after sowing (DAS), the following were determined in the broccoli, lettuce and tomato seedlings: the chlorophyll content of leaves located in the upper part at the same height and position was measured with Minolta's SPAD-502® portable meter, considering the average of three readings per plants, (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 1998); the height of the plant was measured from the basal part until the apical meristem; the leaf area was obtained with a Li-Cor Li-3000A® integrator (Ruíz-Espinoza *et al.*, 2007); the diameter of the stem in the broccoli and tomato seedlings was measured with a Vernier caliper; and, the dry weight of the seedling was determined after having washed the plant samples with distilled water and drying them on a stove with forced air circulation at 70 °C during 72 h (Alcántar-González and Sandoval-Villa, 1999). The evaluation of the onion seedlings was done 45 DAS, considering the aforementioned variables and measuring the diameter of the bulb using a digital electronic Vernier.

### Statistical analysis

The experimental unit was comprised of 50 seedlings, among which 15 seedlings of each repetition (four in total) were considered for the measurement of the responses. The treatments were distributed under a completely random design. For the analysis of variance, measurement comparison (LSD,  $p=0.05$ ) and correlation between variables, the ANOVA and CORR procedures from the statistical computational package SAS (Statistical Analysis System) version 8.0 (SAS, 1999) were used.

## Resultados y discusión

### Crecimiento de las plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*)

En las plántulas de brócoli, la aspersión foliar de miel de abeja (AFMA) tuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre la altura, área foliar y peso seco (Cuadro 1), variables que fueron correlacionadas positivamente (Figura 1a y 1b). La altura se incrementó 13% en comparación con el testigo y 16% con respecto a los tratamientos inoculados con *Azospirillum*. El área foliar aumentó 38% con respecto al Testigo y 54% en referencia a *A.7A* y *A.AMRp10*. En lo que respecta al peso seco de las plántulas, éste se incrementó 30% en referencia al testigo y 37% con respecto a *A.7A* y *A.AMRp10*.

## Results and discussion

### Growth of the broccoli seedlings (*Brassica oleracea* *Italica* Group)

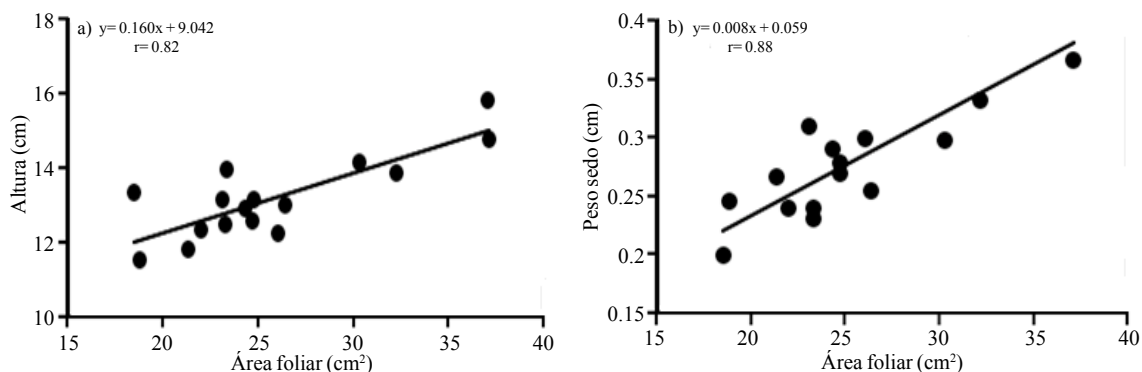
In broccoli seedlings, foliar spray with bee honey (AFMA) had a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on the height, foliar area and dry weight (Table 1), variables that were positively correlated (Figures 1a and 1b). The height of the plant increased by 13% when compared to the control sample and 16% when compared to the treatments inoculated with *Azospirillum*. The foliar area increased 38% compared to the control sample and 54% compared to *A.7A* and *A.AMRp10*. The dry weight of the seedlings increased 30% compared to the control sample and 37% compared to *A.7A* and *A.AMRp10*.

**Cuadro 1. Crecimiento de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) a 30 días después de la siembra, asperjadas con miel de abeja 2% (AFMA) e inoculadas con las cepas de *Azospirillum* 7A (*A.7A*) y *Azospirillum* AMRp10 (*A.AMRp10*).**

**Table 1. Growth of broccoli seedlings (*Brassica oleracea* *Italica* Group) 30 DAS sprayed with 2% bee honey (AFMA) and inoculated with *Azospirillum* 7A (*A.7A*) and *Azospirillum* AMRp10 (*A.AMRp10*) strains.**

Tratamiento	Altura (cm)		Diámetro de tallo (cm)		Unidades (SPAD)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Peso seco (g)	
Testigo	12.97	b*	0.27	ab	49.97	ab	24.73	b	0.27	b
AFMA	14.65	a	0.28	ab	47.34	b	34.2	a	0.35	a
<i>A.7A</i>	12.82	b	0.3	a	50.73	a	21.76	b	0.25	b
<i>A.AMRp10</i>	12.33	b	0.27	b	48.29	ab	22.73	b	0.26	b
CV (%)	5.46		7.03		4.33		10.41		13.68	
DMS	1.11		0.03		3.28		4.14		0.06	

\*Promedios con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0.05$ ). CV= Coeficiente de variación. DMS= Diferencia mínima significativa.



**Figura 1. Correlación a 30 días después de la siembra con el promedio de los tratamientos evaluados entre: a)  $y$ = altura (cm) y  $x$ = área foliar (cm<sup>2</sup>) y b)  $y$ = peso seco (g) y  $x$ = área foliar (cm<sup>2</sup>), de plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*).**

**Figure 1. Correlation 30 DAS with the average of the treatments evaluated between: a)  $y$ = height (cm) and  $x$ = foliar area (cm<sup>2</sup>) and b)  $y$ = dry weight (g) and  $x$ = foliar area (cm<sup>2</sup>), of broccoli seedlings (*Brassica oleracea* *Italica* Group).**

Por otra parte, *A.7A* provocó un incremento de 7% en las unidades SPAD con respecto a la AFMA y también el diámetro de tallo aumentó 11% con respecto a la otra cepa evaluada (*A.AMRp10*). De manera general no hubo un efecto significativo sobre el crecimiento de las plántulas de brócoli, lo cual está acorde a lo reportado por Boddey *et al.* (1986), quienes obtuvieron resultados poco satisfactorios en cultivos evaluados con cepas homólogas de *Azospirillum*. Al respecto, Smith y Goodman (1999) indican que el genotipo de los organismos involucrados juega un papel importante en la conformación de la asociación entre microorganismos y plantas, determinando el resultado biológico de dicha asociación.

### Crecimiento de las plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.)

En las plántulas de cebolla la única variable con respuesta a los tratamientos evaluados fueron las unidades SPAD y el máximo valor se obtuvo con el testigo, que superó en 54% a *A.7A* y *A.AMRp10* (Cuadro 2). Esta respuesta fue debida a la forma tubular de la hoja que dificulta la transmitancia de la luz (Westerveld *et al.*, 2003), además, en esta etapa de desarrollo las hojas son muy angostas y la celda del medidor SPAD que tiene dimensiones de 2 x 3 mm (Schepers *et al.*, 1998), probablemente no la cubrió en su totalidad, provocando medidas muy variables que se reflejaron con el coeficiente de variación más alto de los cultivos evaluados.

**Cuadro 2. Crecimiento de plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.) a 45 días después de la siembra, asperjadas con miel de abeja 2% (AFMA) e inoculadas con las cepas de *Azospirillum 7A* (*A.7A*) y *Azospirillum AMRp10* (*A.AMRp10*).**  
**Table 2. Growth of onion seedlings (*Allium cepa* L.) 45 DAS sprayed with 2% bee honey (AFMA) and inoculated with *Azospirillum 7A* (*A.7A*) and *Azospirillum AMRp10* (*A.AMRp10*) strains.**

Tratamiento	Altura (cm)		Diámetro de tallo (cm)		Diámetro de bulbo (cm)		Unidades (SPAD)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Peso seco (g)	
Testigo	19.88	a*	0.29	a	0.44	a	31.74	a	7.15	a	0.07	a
AFMA	21.92	a	0.3	a	0.44	a	24.79	ab	16.46	a	0.08	a
<i>A.7A</i>	22.63	a	0.31	a	0.46	a	23.08	b	9.28	a	0.11	a
<i>A.AMRp10</i>	20.98	a	0.28	a	0.42	a	18.12	b	7.84	a	0.11	a
CV (%)	11.33		6.93		11.44		20.55		13.95		40.44	
DMS	3.73		0.04		0.07		7.73		2.2		0.05	

\*Promedios con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0.05$ ). CV= Coeficiente de variación. DMS= diferencia mínima significativa.

En este experimento las plántulas de cebolla promediaron 21.35 cm de altura, 0.30 cm de diámetro de tallo, 0.44 cm de diámetro de bulbo, 10.18 cm<sup>2</sup> de área foliar y 0.09 g de peso seco. Pulido *et al.* (2003), en almácigos del cv. Red Creole inoculados con *Azospirillum brasilense*, obtuvieron una altura de plántula de 6 a 18 cm y longitud de raíz de 8 a 10 cm, por otra parte, Veiga de Vincenzo y Tessarioli Neto (2003) reportan la altura de plántulas de cebolla de 18.2 cm

On the other hand, *A.7A* caused a 7% increase in the SPAD units compared to AFMA and the diameter of the stem also increased 11% compared to the other strain evaluated (*A.AMRp10*). In general, there was no significant effect on the growth of the broccoli seedling, which is consistent to what was reported by Boddey *et al.* (1986), who obtained unsatisfactory results in the cultures evaluated with homologous strains of *Azospirillum*. In this regard, Smith and Goodman (1999) indicate that the genotype of the organisms involved plays an important role in the formation of the association between microorganisms and plants, determining the biological result of the association.

### Growth of onion seedlings (*Allium cepa* L.)

In onion seedlings, the only variable that presented a response to the evaluated treatments was the SPAD units and the maximum value was obtained with the control sample, which surpassed *A.7A* and *A.AMRp10* by 54% (Table 2). This response was due to the tubular shape of the leaf which makes the transmittance of light difficult (Westerveld *et al.*, 2003). In addition, in this stage of development the leaves are very thin and the cell of the SPAD meter, with dimensions of 2 x 3 mm (Schepers *et al.*, 1998), probably did not cover it in its entirety showing measurements that were different and that were reflected on the highest coefficient variation of the evaluated cultures.

In this experiment, onion seedlings averaged 21.35 cm in height, 0.30 cm in stem diameter, 0.44 cm in bulb diameter, 10.18 cm<sup>2</sup> in foliar area and 0.09 g in dry weight. Pulido *et al.* (2003) obtained a seedling height of 6 to 18 cm and a root longitude of 8 to 10 cm in seedbeds of cv. Red Creole inoculated with *Azospirillum brasilense*. On the other hand, Veiga de Vincenzo and Tessarioli Neto (2003) report a height in onion seedlings of 18.2 cm at 32 DAS in a controlled

a los 32 DDS en ambiente controlado y con suministro de N, indicando que la altura ideal para el trasplante es de 15 cm y el diámetro de bulbo de 0.37 cm, valores inferiores a los obtenidos en este experimento (21.35 cm y 0.44 cm, respectivamente); estos mismos autores también reportaron 0.13 g/planta de peso seco, valor ligeramente mayor al obtenido en este estudio (0.09 g/planta). Para este cultivo y de manera similar que en las plántulas de brócoli, los tratamientos inoculados con *Azospirillum* no tuvieron un efecto diferenciado sobre las variables del crecimiento.

Al respecto, Alexandre y Zhulin (2001) señalan que el éxito de la colonización de *Azospirillum* en las plantas, depende del proceso conocido como quimiotaxis, el cual consiste en la fuerte atracción entre las BPCV y las raíces de las plantas, a través de sus propios exudados radiculares como el malato, succinato y la fructosa. Díaz-Zorita y Fernández Canigia (2008), señalan que hay varios estudios mostrando los beneficios de la inoculación con *Azospirillum* sobre el crecimiento y producción de diferentes cultivos, pero su uso extensivo está limitado por la supuesta inconsistencia de los resultados obtenidos y la variabilidad de los mismos se han atribuido a la interacción con factores de manejo (fertilización, protección y estructura de cultivo) y de ambiente (tipo de suelo).

### **Crecimiento de las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)**

La altura y el área foliar de las plántulas de lechuga fueron afectadas positiva y significativamente ( $p \leq 0.05$ ) por AFMA y con respecto a *A.7A* y *A.AMRp10*, superándolos en 18 y 78%, respectivamente (Cuadro 3). Chutichudet y Chutichudet (2009) para el cv. Grand Rapids reportan la altura de plántulas a los 32 DDS de 7.97 a 10.84 cm, valores similares al promedio registrado en este estudio (8.83 cm) por su parte Kleiber *et al.* (2013), reportaron que el efecto de organismos benéficos en las plántulas del cv. Clotilde se reflejó en 28.55 cm<sup>2</sup> de área foliar a los 40 DDS, valor inferior a lo obtenido con el tratamiento AFMA de nuestro experimento (39.55 cm<sup>2</sup>). Según Betancourt-Olvera *et al.* (2005), la miel actúa como promotor del crecimiento vegetal por que contiene una elevada cantidad de carbohidratos, presencia de hormonas, vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas y otros constituyentes orgánicos.

environment and with a supply of N, indicating that the ideal height for transplantation is 15 cm and 0.37 cm for the bulb diameter, all lower values than the ones obtained in this experiment (21.35 cm and 0.44 cm, respectively). These same authors also reported 0.13 g/dry weight plant, a slightly higher value than the one obtained in this study (0.09 g/plant). For this culture and in a similar manner to the broccoli seedlings, the treatments inoculated with *Azospirillum* did not have a differentiated effect on the growth variables.

In this regard, Alexandre and Zhulin (2001) state that the success of the colonization of *Azospirillum* in the plants depends on the process known as chemotaxis, which consists of the strong attraction between the BPCV and plant roots, through their own root exudates such as malate, succinate and fructose. Díaz-Zorita and Fernández-Canigia (2008) indicate that there have been several studies that show the benefits of inoculation with *Azospirillum* on the growth and production of different cultures, but its extensive use is limited by the alleged inconsistency of the results obtained and the variability has been attributed to the interaction with handling (fertilization, protection and structure of the culture) and environmental factors (type of soil).

### **Growth of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.)**

The height and the foliar area of lettuce seedlings were positively and negatively affected ( $p \leq 0.05$ ) by AFMA and the strains *A.7A* and *A.AMRp10*, surpassing them by 18 and 78%, respectively (Table 3). Chutichudet and Chutichudet (2009) reported the height of seedlings at 32 DAS being 7.97 to 10.84 cm for cv. Grand Rapids, values that are similar to the average registered in this study (8.83 cm). On the other hand Kleiber *et al.* (2013) reported that the effect of benign organisms on the cv. Clotilde seedlings was reflected in 28.55 cm<sup>2</sup> of foliar area 40 DAS; this was an inferior value to the one obtained with the AFMA treatment of our experiment (39.55 cm<sup>2</sup>). According to Betancourt-Olvera *et al.* (2005), honey acts as an enhancer for plant growth as it contains a high quantity of carbohydrates, a presence of hormones, vitamins, minerals, amino acids, proteins and other organic constituents.

On the other hand, same as in the broccoli and onion cultures, the treatments inoculated with *Azospirillum* did not have a clear or significant effect on the growth variables evaluated;

**Cuadro 3. Crecimiento de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) a 30 días después de la siembra, asperjadas con miel de abeja 2% (AFMA) e inoculadas con las cepas de *Azospirillum* 7A (A.7A) y *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10).**  
**Table 3. Growth of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L.) 30 DAS sprayed with 2% bee honey (AFMA) and inoculated with *Azospirillum* 7A (A.7A) and *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10) strains.**

Tratamiento	Altura (cm)		Unidades (SPAD)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Peso seco (g)	
Testigo	8.98	ab*	32.47	a	29.85	ab	0.22	a
AFMA	9.51	a	32.05	a	39.55	a	0.15	ab
A.7A	8.74	ab	30.11	a	24.39	b	0.14	ab
A.AMRp10	8.07	b	31.42	a	20.00	b	0.11	b
CV (%)	9.72		6.62		25.85		31.68	
DMS	1.32		3.21		11.33		0.07	

\*Promedios con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0.05$ ). CV= Coeficiente de variación. DMS= diferencia mínima significativa.

Por otra parte, al igual que en los cultivos de brócoli y cebolla, los tratamientos inoculados con *Azospirillum* no tuvieron un efecto claro y significativo sobre las variables del crecimiento evaluadas, de hecho, el peso seco de la plántula obtenida con el Testigo fue significativamente mayor (50%) al obtenido con A.AMRp10. Esta respuesta frecuentemente se asocia a la ineficiencia de las bacterias para colonizar consistentemente la rizósfera de las plantas (Hatzinger y Alexander, 1994), lo cual debe ser una característica de las BPCV y condición indispensable para la selección de los inóculos microbianos utilizados como biofertilizantes (Lugtenberg *et al.*, 2001). La colonización de la rizósfera por las bacterias es un proceso complejo originado por la combinación de diversos mecanismos que afectan aspectos de la nutrición mineral, el metabolismo del carbono y el desarrollo radicular de las plantas (Díaz-Vargas *et al.*, 2001); entre estos mecanismos se encuentra la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal, los cuales inducen un incremento en el número y longitud de los pelos radicales (Bacilio-Jimenez *et al.*, 2001). En las unidades SPAD no se tuvo efecto de los tratamientos y el promedio general fue 34.88, el cual es superior a lo reportado por Santos *et al.* (2010) para almácigos de lechuga a los 41 DDS utilizando diferentes sustratos orgánicos (16.3 a 21.5 unidades SPAD).

### Crecimiento de las plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.)

En las plántulas de tomate la altura y el área foliar fueron afectadas significativamente ( $p \leq 0.05$ ) por los tratamientos (Cuadro 4). La altura se incrementó en 23% con AFMA y en referencia a A.AMRp10. Villegas-Rodríguez *et al.* (2001) reportaron para plántulas de tomate, cultivadas en hidroponía y con aspersión foliar de miel de abeja 2%, incrementos en su altura de más de 100% con relación a plantas irrigadas

in fact, the dry weight of the seedling obtained with the control was significantly greater (50%) than the one obtained with A.AMRp10. This response is frequently associated with the inefficiency of the bacteria to consistently colonize the rhizosphere of the plants (Hatzinger and Alexander, 1994), which could be a characteristic of the PGPR and an important condition for the selection of the microbial inocula used as bio-fertilizer (Lugtenberg *et al.*, 2001). The colonization of the rhizosphere by bacteria is a complex process originated by the combination of several mechanisms that affect certain aspects of mineral nutrition, the metabolism of carbon and the root development of the plants (Díaz-Vargas *et al.*, 2001); among these mechanisms is the production of components that enhance plant growth, prompting an increase in the number and longitude of the root hair (Bacilio-Jimenez *et al.*, 2001). No effect from the treatments was presented in the SPAD units and the general average was 34.88, which is superior to what was reported by Santos *et al.* (2010) for seedbeds of lettuce 41 DAS using different organic substrates (16.3 to 21.5 SPAD units).

### Growth of tomato seedlings (*Solanum Lycopersicum* L.)

In tomato seedlings, the height and the foliar area were significantly affected ( $p \leq 0.05$ ) by the treatments (Table 4). The height increased 23% with AFMA in respect to A.AMRp10. Villegas-Rodríguez *et al.* (2001) reported the following for tomato seedlings cultivated in hydroponics and with foliar spray with 2% bee honey: increases of more than 100% in their height when compared to plants irrigated solely with Steiner solution at 50%. The height of the seedling obtained in our study with AFMA (22.3 cm) is consistent with the statements of Markovic *et al.* (1997) who indicated that in order to ensure the success of the transplantation in the field the seedling should be 20 to 30 cm tall.



únicamente con la solución de Steiner al 50%. La altura de plántula obtenida en nuestro estudio con AFMA (22.23 cm) está acorde a Markovic *et al.* (1997) quienes señalan que para asegurar el éxito del trasplante en campo la plántula debe tener de 20 a 30 cm de altura.

On the other hand, Terry *et al.* (2001) did not observe any significant effect from the inoculation with *Azospirillum brasilense* SP-7 on the height of tomato seedlings, reporting an average of 20 cm. Furthermore, they stated that in the initial stage of the plant growth there was no effective

**Cuadro 4. Crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a 30 días después de la siembra, asperjadas con miel de abeja 2% (AFMA) e inoculadas con las cepas de *Azospirillum* 7A (A.7A) y *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10).**

**Table 4. Tomato seedlings growth (*Solanum lycopersicum* L.) 30 DAS sprayed with 2% bee honey (AFMA) and inoculated with *Azospirillum* 7A (A.7A) and *Azospirillum* AMRp10 (A.AMRp10) strains.**

Tratamiento	Altura (cm)		Diámetro de tallo (cm)		Unidades (SPAD)		Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Peso seco (g)	
Testigo	20.09	ab*	0.31	a	35.35	a	41.58	ab	0.39	a
AFMA	22.23	a	0.31	a	32.76	a	40.35	ab	0.47	a
A.7A	20.37	ab	0.3	a	36.52	a	47.16	a	0.43	a
A.AMRp10	18.11	b	0.29	a	34.89	a	30.93	b	0.37	a
CV (%)	11.02		5.24		7.1		18.95		20.54	
DMS	3.42		0.02		3.81		11.68		0.13	

\*Promedios con la misma letra por columna no son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0.05$ ). CV= Coeficiente de variación. DMS= diferencia mínima significativa.

Por otra parte, Terry *et al.* (2001) no observaron efecto significativo de la inoculación con *Azospirillum brasilense* SP-7 sobre la altura de plántulas de tomate, reportando un promedio 20 cm, además, indican que en la etapa inicial del crecimiento de las plantas no existe un reconocimiento efectivo entre los microorganismos y las plantas inoculadas para expresar alguna señal de respuesta. La altura de los tratamientos inoculadas con las cepas de *Azospirillum* empleadas en este trabajo (19.24 cm en promedio) es superior a la reportada por Hernández y Chailloux (2004) para plántulas inoculadas con *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* y también a la reportada por Sánchez-López *et al.* (2012) en un estudio realizado con el cv. Sofia e inoculadas con BPCV de los géneros *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.

El área foliar se incrementó 52% con A.7A y con respecto a A.AMRp10. Se ha reportado que cuando una cepa de *Azospirillum* induce el crecimiento de las plantas, como en este caso, se debe principalmente a la formación del ácido indol acético (AIA) que se produce por su inoculación (Tien *et al.*, 1979); este metabolito favorece la división celular y diferenciación de tejidos, consecuentemente provoca el incremento de biomasa (Spaepen *et al.*, 2007) y en este estudio el área foliar se correlacionó significativamente con el peso seco ( $r = 0.71$ , Figura 2a). De hecho, Ribaud *et al.* (2006) encontraron mayor contenido de AIA y etileno en tejidos de plantas de tomate inoculadas con *Azospirillum brasilense* FT326 en comparación con las no inoculadas.

identification between the microorganisms and the plants inoculated to be able to express some sign of response. The height of the treatments inoculated with the *Azospirillum* strains used in this work (19.24 cm average) is superior to the one reported by Hernández and Chailloux (2004) for seedlings inoculated with *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* and also to the one reported by Sánchez-López *et al.* (2012) in a study done with the Sofia cv. and inoculated with PGPR of the *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. genera.

The foliar area increased 52% with A.7A when compared to A.AMRp10. It has been reported that when a strain of *Azospirillum* prompts the growth of plants, as in this case, it is mainly due to the formation of indole-acetic acid (IAA) which is produced by its inoculation (Tien *et al.*, 1979); this metabolite enhances cellular division and the differentiation of tissue, consequently increasing the biomass (Spaepen *et al.*, 2007). In this study, the foliar area was significantly correlated to the dry weight ( $r = 0.71$ , Figure 2a). In fact, Ribaud *et al.* (2006) found a higher content of IAA and ethylene in plant tissues of tomato seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* FT326 when compared to those that had not been inoculated.

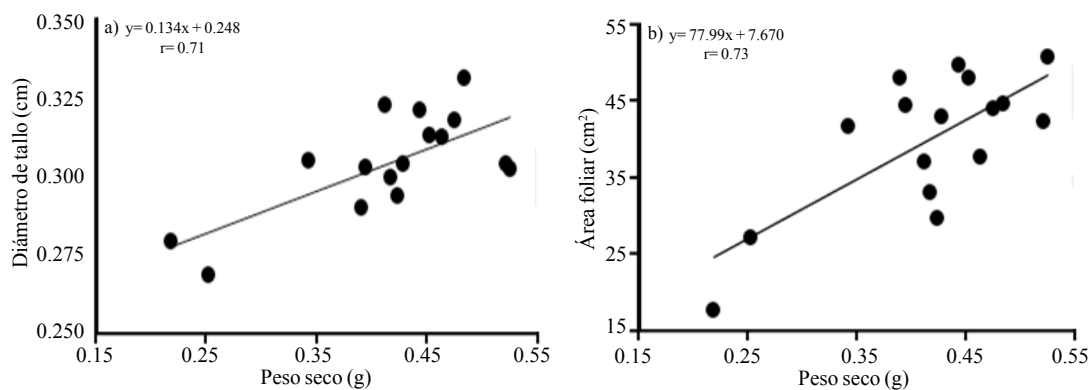
The diameter of the stem, SPAD units and dry weight of the tomato seedlings did not significantly vary among treatments ( $p > 0.05$ ). The average stem diameter was

El diámetro de tallo, unidades SPAD y peso seco de las plántulas de tomate no variaron significativamente entre tratamientos ( $p > 0.05$ ). El diámetro de tallo promedio fue 0.31 cm, lo cual está acorde a rangos reportados por Hernández y Chailloux (2004) y Terry *et al.* (2000) para plántulas de tomate inoculadas con BPCV del género *Azospirillum*, al respecto, Preciado-Rangel *et al.* (2002) indican que el diámetro de tallo es un indicador del vigor de las plántulas, porque refleja directamente la acumulación de fotosintatos, los cuales posteriormente pueden traslocarse a los sitios de demanda. El promedio de unidades SPAD fue 34.88, valor muy inferior al señalado por Rodríguez-Mendoza *et al.* (1998) quienes reportaron 56.11 unidades SPAD a los 45 días después del trasplante, pero fue debido a fertilizaciones realizadas foliarmente y al suelo con fuentes nitrogenadas.

El peso seco promedio de las plántulas fue 0.42 g/planta y hubo una correlación significativa con el diámetro de tallo (Figura 2b). Aun cuando en este estudio el incremento de biomasa no resultó afectado por los tratamientos, se tienen investigaciones donde la inoculación con cepas de *Azospirillum* resultó benéfica a las plántulas de tomate, por ejemplo, Carletti *et al.* (1994) reportan incrementos de 76% en el peso seco del tallo con *A. lipoferum*, también Hadas y Okon (1987) encontraron incrementos significativos en la longitud y peso seco de raíz, peso seco de la parte aérea y área foliar total. Al respecto, Parra y Cuevas (2001) indican que el mecanismo por el cual *Azospirillum* influye en el desarrollo y productividad de las plantas no es claro y entre las explicaciones señalan su capacidad para fijar N atmosférico en el suelo a través del incremento en la actividad de la enzima nitrato reductasa que estimula la asimilación de nitratos por las plantas inoculadas.

0.31 cm, which is in accordance to the ranges reported by Hernández and Chailloux (2004) and Terry *et al.* (2000) for tomato seedlings inoculated with PGPR of the *Azospirillum* genus. In this same regard, Preciado-Rangel *et al.* (2002) state that the diameter of the stem is an indicator of the strength of the seedlings as it directly reflects the accumulation of photosynthates, which can be subsequently transferred to the locations where there is demand. The average SPAD units was 34.88, which is an inferior value to the one indicated by Rodríguez-Mendoza *et al.* (1998) who reported 56.11 SPAD units 45 days after the transplantation, but this was due to fertilizations done to the leaves and soil with nitrogenous sources.

The average dry weight of the seedlings was 0.42 g/plant and there was a significant correlation with the diameter of the stem (Figure 2b). Even when in this study the increase of biomass was not affected by the treatments, there are works where the inoculation with *Azospirillum* strains helped tomato seedlings, such is the case for Carletti *et al.* (1994) who reported increases of up to 76% in the dry weight of the stem with *A. lipoferum*. Hadas and Okon (1978) also found significant increases in the longitude and dry weight of the root, dry weight of the aerial part and the total foliar area. In this same regard, Parra and Cuevas (2001) indicate that the mechanism through which *Azospirillum* influences the development and productivity of the plants is not clear, explaining the ability to fix atmospheric N in the soil through an increase in the nitrate reductase enzyme activity which stimulates the assimilation of nitrate by the non-inoculated plants.



**Figura 2. Correlación a 30 días después de la siembra con el promedio de los tratamientos evaluados entre: a)  $y$  = diámetro de tallo (cm) y  $x$  = peso seco (g) y b)  $y$  = área foliar (cm<sup>2</sup>) y  $x$  = peso seco (g), de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*).**  
**Figure 2. Correlation 30 DAS with the average of the evaluated treatments between: a)  $y$  = diameter of the stem (cm) and  $x$  = dry weight (g) and b)  $y$  = foliar area (cm<sup>2</sup>) and  $x$  = dry weight (g), of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum*).**

## Conclusiones

Aun cuando los incrementos no fueron generalizados en la altura, área foliar, peso seco, unidades SPAD y diámetro de tallo de las plántulas de brócoli (*Brassica oleracea* var. Itálica), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la aspersión foliar de miel de abeja 2% y la inoculación con la cepa 7A de *Azospirillum* son buenas opciones para la producción sustentable de plántulas de hortalizas, aprovechando los mecanismos de acción que tienen como promotores del crecimiento vegetal, por lo tanto es promisorio y factible su empleo.

## Literatura citada

- Abiven, S. and Recous, S. 2007. Mineralisation of crop residues on the soil surface or incorporated in the soil under controlled conditions. *Biol. Fert. Soils*. 40(6):849-852.
- Alcántar-González, G. y Sandoval-Villa, M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo México. 156 p.
- Alexandre, G. and Zhulin, B. I. 2001. More than one way to sense chemicals. *J. Bacteriol.* 183(16):4681-4686.
- Bacilio-Jiménez, M.; Aguilar-Flores, S.; Del Valle, V. M.; Pérez, A.; Zepeda, A. and Zenteno, E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33(2):167-172.
- Betancourt-Olvera, M.; Rodríguez-Mendoza, M. N.; Sandoval-Villa, M. y Gaytán-Acuña, E. A. 2005. Fertilización foliar una herramienta en el desarrollo del cultivo de *Lilium* cv. Stargazer. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 11(2):371-378.
- Boddey, R. M.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. and Dobereiner, J. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. *Plant Soil*. 95(1):109-121.
- Carletti, S. M.; Rodríguez Cáceres, E. y Llorente, B. 1994. Influencia de Rizobacteria promotoras del crecimiento en plantines de pimiento y tomate. *Rev. Investig. Agrop.* 25(1):79-87.
- Chutichudet, B. and Chutichudet, P. 2009. Efficacy of boron spraying on growth and some external qualities of lettuce. *Int. J. Agric. Res.* 4(9):257-269.
- Day, J. M. and Dobereiner, J. 1976. Physiological aspects of nitrogen fixation by a *Spirillum lipoferum* from digitaria decumbens roots. *Soil Biol. Biochem.* 8(1):45-50.
- De-Bashan, L. E.; Olguin, G.; Glick, B. R. y Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (Eds.). Editorial Trillas, México. 170-224 p.
- Díaz-Vargas, P.; Ferrera-Cerrato, R.; Almaraz-Suárez, J. J. y Alcántar-González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra*. 19(4):327-335.

## Conclusions

Even when increases were not generalized in regards to height, foliar area, dry weight, SPAD units and stem diameter of the broccoli (*Brassica oleracea* Italica Group), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings, the spraying of 2% bee honey and the inoculation of the 7A strain of *Azospirillum* are good options for the sustainable production of vegetable seedlings, making use of their action mechanisms which promote plant growth. Their use is therefore promising and feasible.

*End of the English version*



- Díaz-Zorita, M. y Fernández Canigia, M. V. 2008. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. *In: Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Casan, F. D. and García de Salamone, I. (Eds.). Asociación Argentina de Microbiología. Argentina. 155-166 pp.
- Di Barbaro, G.; Pernasetti, S. y Stegmayer, A. 2005. Evaluación del efecto de *Azospirillum brasilense* en la germinación y emergencia del pimiento pimentonero (*Capsicum annum* L. var. Trompa de Elefante). *Revista del CIZAS*. 6(1-2):74-85.
- Donald, J. P. L.; Rodríguez-Mendoza, M. N. and Sánchez-García, P. 2002. Foliar fertilization of mango (cv Hadden) for the control of malformation. *Acta Hort.* 594:667-673.
- Hadas, R. and Okon, Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fert. Soils*. 5(3):241-247.
- Hatzinger, P. B. and Alexander, M. 1994. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. *Plant Soil*. 158(2):211-222.
- Hernández, M. I. y Chailloux, M. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Tropicales*. 25(2):5-12.
- Hernández, Y.; García, O. A. y Ramon, M. 2001. Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 35(2): 85-97.
- Kleiber, T.; Starzyk, J. and Bosiacki, M. 2013. Effect of nutrient solution, effective microorganisms (EM-A), and assimilation illumination of plants on the induction of the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic cultivation. *Acta Agrobotánica*. 66(1):27-38.
- Lugtenberg, B. J. J.; Dekkers, L. and Bloemberg G. V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39(1):461-490.
- Markovic, V.; Djurovka, M. and Ilin, Z. 1997. The effect of seedling quality on tomato yield, plant and fruit characteristics. *Acta Hort.* 462:163-169.
- McFarland, J. 1907. Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Medical Assoc.* 14:1176-1178.

- Newman, L. A. and Reynolds, C. M. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*. 23(1):6-9.
- Parra, Y. y Cuevas, F. 2001. Revisión bibliográfica. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*. 23(3):31-41.
- Preciado-Rangel, P.; Baca-Castillo, G. A.; Tirado-Torres, J. L.; Kohashi-Shibata, J.; Tijerina-Chavez, L. y Martínez-Garza, A. 2002. Nitrógeno y potasio en la producción de plántulas de melón. *Terra*. 20(3):267-276.
- Pulido, L. E.; Medina, N. y Cabrera, A. 2003. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrizicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.). I. Crecimiento vegetativo. *Cultivos Tropicales*. 24(1):15-24.
- Reganold, J. P.; Papendick, R. I. and Parr, J. F. 1990. Sustainable agriculture. *Scientific American*. 262:112-120.
- Ribaudó, C. M.; Krumholz, E. M.; Cassán, F. D.; Bottini, R.; Cantore, M. L. and Curá, J. A. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Reg.* 24(2):175-185.
- Rodríguez-Mendoza, M. N.; Alcántar-González, G.; Aguilar-Santelises, A.; Etchevers-Barra, J. D. y Santizó-Rincón, J. A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra*. 16(2):135-141.
- Rodríguez-Mendoza, M. N.; Osorio-Rosales, B.; Trejo-Téllez, L. I.; Arévalo-Galarza, M. L. y Castillo-González, A. M. 2011. Producción organomineral de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.) para flor de corte. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 17(3):117-127.
- Ruiz-Espinoza, F. H.; Murillo-Amador, B.; García-Hernández, J. L.; Troyo-Diéguez, E.; Palacios-Espinoza, A.; Beltrán-Morales, A.; Fenech-Larios, L.; Zamora-Salgado, S.; Marrero-Labrador, P.; Nieto-Garibay, A. y Cruz-de la Paz, O. 2007. Mediciones lineales en la hoja para la estimación no destructiva del área foliar en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 13(1):29-34.
- Sánchez-López, D. B.; Gómez-Vargas, R. M.; Garrido-Rubiano, M. F. y Bonilla-Buitrago, R. R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(7):1401-1415.
- Santos, C. M.; Gonçalves, E. R.; Endres, L.; Gomes, T. C. A.; Jadoski, C. J.; Nascimento, L. A. and Santos, E. D. 2010. Photosynthetic measurements in lettuce submitted to different agroindustrial residue composting. *Pesquisa Aplicada and Agrotecnologia*. 3(3):103-112.
- Schepers, S. J.; Blackmer, T. M. and Francis, D. D. 1998. Chlorophyll meter method for estimating nitrogen content in plant tissue. *In: Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. Kalra, Y. P. (Ed). CRC Press. 129-135 pp.
- Smith, K. P. and Goodman, R. M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 37(1):473-491.
- Spaepen, S.; Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Microbiology Reviews*. 31(4):425-448.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 1999. SAS user's guide. Statistics. Version 8. SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Steiner, A. A. 1980. The selective capacity of plants for ions and its importance for the composition and treatment of the nutrient solution. *Acta Hort.* 98:87-97.
- Terry, E.; Pino, M. A. and Medina, N. 2000. Application times of an *Azospirillum* bioproduct in tomato growth, development and yield. *Cultivos Tropicales*. 21(4):5-8.
- Terry, E.; Núñez, M.; Pino, M. A. y Medina, N. 2001. Efectividad de la combinación de biofertilizantes análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*. 22(2):59-65.
- Tien, T. M.; Gaskins, M. H. and Hubbell, D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37(5):1016-1024.
- Tilak, K. V. B. R.; Ranganayaki, N.; Pal, K. K.; De, R.; Saxena, A. K.; Shekhar Nautiyal, C.; Mittal, Shilpi; Tripathi, A. K. and Johri, B. N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Sci.* 89(1):136-150.
- Veiga de Vincenzo, M. C. and Tessarioli Neto, J. 2003. Onion seedling production in styrofoam trays under controlled environment, as summer-planted onions. *Scientia Agricola*. 60(1):65-69.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255(2):571-586.
- Villegas-Torres, O. G.; Rodríguez-Mendoza, M. N.; Trejo-Téllez, L. I. y Alcántar-González, G. 2001. Potencial de la miel de abeja en la nutrición de plántulas de tomate. *Terra*. 19(1):97-102.
- Westerveld, S. M.; McKeown, A. W.; McDonald M. R. and Scott-Dupree, C. D. 2003. Chlorophyll and nitrate meters as nitrogen monitoring tools for selected vegetables in Southern Ontario. *Acta Hort.* 627:259-266.