



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Evaluación del rendimiento y calidad de *Solanum lycopersicum* L. con dosis reducida de macronutrientes en respuesta a la inoculación de *Pseudomonas* spp. como promotoras del crecimiento vegetal

Tesis que presenta:
Patricia Torres Solórzano

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis:
D.C. Alfonso Luna Cruz

Co-director de tesis:
D.C Homero Reyes De La Cruz

Sinodales:
D.C. Josué Altamirano Hernández

D.C. Jesús Campos García

D.C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez

Morelia, Michoacán
Septiembre, 2022





El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Manejo de Plagas del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. C. Alfonso Luna Cruz y co-asesoría del D. C. Homero Reyes de la Cruz, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número 764770.



Agradecimientos

Al Dr. Alfonso: le admiro su dedicación y compromiso con la ciencia, gracias por la oportunidad de incluirme en su equipo de trabajo y compartir sus proyectos conmigo. Valoro y agradezco en gran medida su esfuerzo para que esto fuera posible. Le agradezco también sus consejos de vida para impulsarme siempre a crecer profesionalmente.

Al Dr. Josué: por su acompañamiento en todo el proyecto y por estar siempre disponible para responder mis dudas en el laboratorio. Le agradezco por compartir su admirable conocimiento y experiencia con nosotros.

A mis sinodales: el D. C. Homero Reyes de la Cruz, el D. C. Jesús Campos García, el D.C. Josué Altamirano Hernández y la D. C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez, por sus valiosas observaciones y aportaciones a mi trabajo, porque su vasta trayectoria y contribuciones a la ciencia motivan a continuar y trascender.

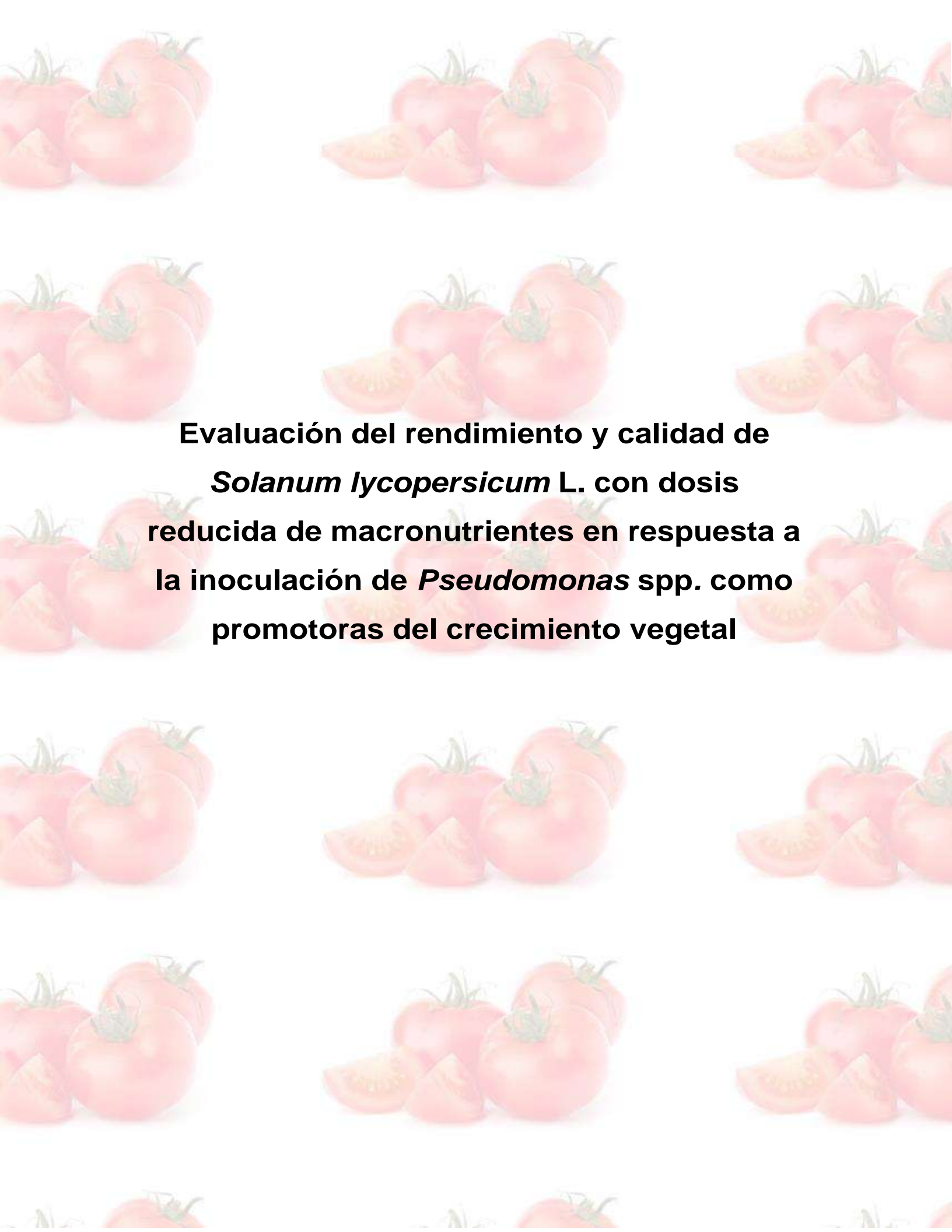
A mis padres: Elena e Ignacio, por ser mi pilar, mi fuerza y mi motivación para cumplir mis metas. Reconozco y valoro el esfuerzo que hacen cada día por vernos crecer y darnos todo lo que está en sus manos. Son mi mayor ejemplo de fortaleza y dedicación. Mis logros son sus logros.

A mis hermanos: César, Nana, Chio y Mando, por estar siempre pendiente de mí y apoyarme de cualquier forma que les fuera posible. Y a Pepe, por ser siempre mi fuerza emocional, por recargarme de energía y alegrar nuestras vidas. Siempre serás mi Ángel sobre la Tierra.

A Sebas: Por ser mi soporte emocional. Gracias por siempre impulsarme a crecer profesional y personalmente. Valoro enormemente tu dedicación hacia mí para verme cumpliendo sueños.

A la Sra. Mony, el Sr. Sebastián y Marlene: por su apoyo en todo este proceso, por compartir conmigo los buenos momentos y motivarme en los difíciles. Son un gran respaldo para mi persona y mucho de esto es gracias a ustedes. Les agradezco por compartirme sus conocimientos adquiridos y por incluirme en su proyecto familiar.

Al Sr. S: por ser mi compañerito de maestría y nunca dejarme sola en las noches de desvelo, tu silenciosa compañía me ayudó a mantener mi salud emocional en el momento más difícil.



**Evaluación del rendimiento y calidad de
Solanum lycopersicum L. con dosis
reducida de macronutrientes en respuesta a
la inoculación de *Pseudomonas* spp. como
promotoras del crecimiento vegetal**

Índice

Resumen.....	10
Abstract.....	11
1. Introducción.....	12
2. Antecedentes.....	14
2.1 Importancia del cultivo de jitomate.....	14
2.2 Cultivo de jitomate en agricultura protegida.....	15
2.2.1 Cultivo de jitomate en invernadero.....	16
2.3 Comercialización de fertilizantes inorgánicos.....	19
2.4 Impacto ecológico de la agricultura convencional.....	21
2.5 Agricultura sostenible.....	21
2.6. Uso de microorganismos como estrategia para la agricultura sostenible.....	22
2.7 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	23
2.7.1 Fijación biológica de nitrógeno.....	23
2.7.2 Solubilización de fosfato.....	25
2.7.3 Solubilización de calcio.....	27
2.7.4 Producción de ácido indol-3-acético.....	28
2.8 Uso de PGPR en cultivos hortícolas.....	29
2.9 Importancia del género <i>Pseudomonas</i> spp. en la agricultura.....	30
2.10 Uso y comercialización de inoculantes.....	31
3. Justificación.....	33
4. Hipótesis.....	33
5. Objetivos.....	34
6. Materiales y métodos.....	35
6.1 Localización.....	35
6.2 Aislamiento, caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento..	36
6.2.1 Aislamiento de rizobacterias.....	36
6.2.2 Conservación de aislados.....	36
6.2.3 Identificación de características asociadas a la promoción del crecimiento vegetal.....	36
6.2.4 Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno.....	37
6.2.5 Evaluación de la producción de auxinas.....	38
6.2.6 Determinación de la actividad solubilizadora de fósforo y calcio.....	38
6.2.7 Pruebas de compatibilidad de bacterias para diseño de consorcio.....	39

6.2.8 Efecto de <i>Pseudomonas</i> spp. en la germinación y vigor de semillas de jitomate	40
6.2.9 Evaluación de <i>Pseudomonas</i> spp. en el desarrollo de la raíz de plántulas de jitomate en la etapa inicial de crecimiento.....	41
6.3 Evaluación del potencial de las bacterias sobre el rendimiento y calidad de fruto de jitomate en condiciones de invernadero	41
6.3.1 Diseño experimental	41
6.3.2 Manejo de cultivo en invernadero	42
6.3.3 Medición de variables respuesta en planta.	43
6.3.4 Parámetros de calidad sensorial y fisicoquímica de los frutos.....	44
6.3.5 Rendimiento por planta	46
6.4 Análisis estadístico	46
7. Resultados y Discusión.....	47
7.1 Evaluación de rasgos asociados a la promoción del crecimiento de <i>Pseudomonas</i> spp.	47
7.1.1 Actividad de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre la nutrición vegetal.....	47
7.1.2 Biosíntesis de ácido indol-3-acético por <i>Pseudomonas</i> spp.....	53
7.2 Evaluación de antagonismo entre cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	54
7.3 Efecto de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre la germinación de semillas de jitomate e índice de vigor	55
7.4 Inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre el sistema radicular de jitomate durante la etapa inicial de desarrollo.....	58
7.5 Monitoreo de parámetros vegetales en jitomate con dosis reducida de N, P y Ca, en respuesta a la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp.....	61
7.6 Análisis de supervivencia de <i>Pseudomonas</i> spp. en la rizósfera de jitomate en invernadero	64
7.7 Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre el sistema radicular del jitomate	67
7.8 Análisis de calidad de fruto de jitomate fertilizado con 50% de N, P y Ca tras la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp.....	69
7.9 Respuesta de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. en el rendimiento del cultivo de jitomate de invernadero con dosis reducida al 50% de N, P y Ca.....	75
8. Conclusiones	82
9. Referencias bibliográficas.....	83
10. Anexos.....	108

Índice de Figuras

Figura 1. Etapas fenológicas del jitomate.....	17
Figura 2. Uso, producción e importación de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en México de 1980 a 2019.....	20
Figura 3. Esquema de la enzima nitrogenasa y el proceso de fijación biológica de nitrógeno.	25
Figura 4. Equilibrio entre los iones de calcio en la solución del agua o del suelo ejercido por bacterias	27
Figura 5. Vías de biosíntesis de ácido indol-3-acético por bacterias rizosféricas.	29
Figura 6. Mapa satelital de localización de sitios donde se realizó la investigación.....	35
Figura 7. Esquema de inoculación de bacterias C1-013, C1-014, C1-015, C5-030 y ACJ-014 para evaluación de antagonismo.....	40
Figura 8. Medición de variables en planta.....	43
Figura 9. Zona de medición de unidades SPAD en hoja de jitomate.....	43
Figura 10. Grado de madurez de jitomate con base en la coloración del fruto. la superficie es color rojo	44
Figura 11. Fijación biológica de nitrógeno <i>in vitro</i> por <i>Pseudomonas</i> spp	49
Figura 12. Solubilización de fosfato <i>in vitro</i> por <i>Pseudomonas</i> spp.....	51
Figura 13. Solubilización de calcio <i>in vitro</i> por <i>Pseudomonas</i> spp	52
Figura 14. Evaluación de antagonismo entre cepas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	55
Figura 15. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de jitomate inoculadas con <i>Pseudomonas</i> spp.	56
Figura 16. Índice de vigor de semillas de jitomate inoculadas con <i>Pseudomonas</i> spp.....	58
Figura 17. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre el sistema radicular de jitomate a los 21 dds	60
Figura 18. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre las variables vegetativas de jitomate.	64
Figura 19. Evaluación cualitativa de la capacidad de supervivencia de <i>Pseudomonas</i> spp en la rizósfera de jitomate en invernadero al término del ciclo de cultivo.....	66
Figura 20. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre la raíz de jitomate al final del ciclo de cultivo	68
Figura 21. Grado de maduración de jitomates para cosecha	71

Figura 22. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre el rendimiento de jitomate fertilizado con el 50% de N, F y Ca	77
Figura 23. Frutos de jitomate cosechados a partir de plantas con y sin inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp.	78

Índice de cuadros

Cuadro 1. Tratamientos en invernadero	41
Cuadro 2. Producción de AIA por <i>Pseudomonas</i> spp.	54
Cuadro 3. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate por inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp.	57
Cuadro 4. Características asociadas a la promoción del crecimiento de bacterias aisladas de rizósfera de jitomate.....	67
Cuadro 5. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. en la firmeza de frutos.....	71
Cuadro 6. Parámetros de calidad de frutos de jitomate inoculados con <i>Pseudomonas</i> spp.	75
Cuadro 7. Efecto de la inoculación de <i>Pseudomonas</i> spp. sobre el porcentaje de frutos comercializables y peso individual de jitomate en régimen reducido de N, P y Ca.	79

Resumen

El cultivo de jitomate en invernadero se encuentra en aumento constante. No obstante, la forma de producción es un sistema de alta exigencia nutricional donde se aplican, principalmente, fertilizantes de origen sintético. Esta fuente presenta dificultades para la absorción de los principales nutrimentos en la planta y genera acumulación de excedentes en suelo o cuerpos de agua. Además, la agricultura global enfrenta un máximo histórico en el precio de los fertilizantes, por lo que es oportuno buscar alternativas eficientes. En este contexto, el uso de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, representa una ventaja en la agricultura al permitir la disminución parcial de insumos inorgánicos. En este trabajo se evaluó el efecto fitoestimulante de cinco cepas de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. Cepas C13, C14 y C15; *P. fluorescens* C30 y *P. putida* ACJ14), con el objetivo de contribuir en la reducción del 50% en la concentración de nitrógeno, fósforo y calcio aplicado por sistema hidropónico en el cultivo de jitomate variedad El Cid F₁ en invernadero. En pruebas previas *in vitro*, las cinco cepas exhibieron capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, solubilizar calcio y producir ácido indol-3-acético. En general, los resultados de los ensayos en invernadero y de inoculación de las cepas bacterianas antes mencionadas, permitieron determinar el potencial de las *Pseudomonas* spp. para mejorar los parámetros de crecimiento vegetativo y mejorar los valores de firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable y concentración de licopeno. En particular, las cepas *P. putida* ACJ14 y *Pseudomonas* sp. C14, destacaron por aumentar el rendimiento de fruto entre el 54 y 73%, respectivamente. Además, incrementaron la acumulación de licopeno en el fruto de jitomate, *P. putida* ACJ14 con un valor de 132.9 mg/g y *Pseudomonas* sp. C14 con 130.22 mg/g de fruto. Adicionalmente, se comprobó su habilidad para persistir en la rizósfera de jitomate hasta por 30 días después de su inoculación en el sistema de raíces. Por lo tanto, los resultados sugieren el uso de *Pseudomonas* sp. cepas C13, C14, C15, *P. fluorescens* C30 y *P. putida* ACJ14 como una alternativa sostenible, permitiendo la reducción del 50% de nitrógeno, fósforo y calcio en la fertilización de jitomate en invernadero.

Palabras clave: *Pseudomonas*, invernadero, jitomate, fertilizantes, rendimiento.

Abstract

The cultivation of tomato in greenhouse is constantly increasing. However, the way of production is a system of high nutritional requirement where fertilizers of synthetic origin are applied, mainly. This source presents difficulties for the absorption of the main nutrients in the plant and generates accumulation of surpluses in soil or bodies of water. In addition, global agriculture is facing an all-time high in the price of fertilizers, so it is opportune to look for efficient alternatives. In this context, the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria represents an advantage in agriculture by allowing the partial reduction of inorganic inputs. In this work, the phytostimulant effect of five strains of *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. strains C13, C14 and C15; *P. fluorescens* C30 and *P. putida* ACJ14) was evaluated, with the aim of contributing to the 50% reduction in the concentration of nitrogen, phosphorus and calcium applied by hydroponic system in the cultivation of tomato, variety El Cid F1, in a greenhouse. In previous *in vitro* tests, all five strains exhibited the ability to fix nitrogen, solubilize phosphate, solubilize calcium, and produce indole-3-acetic acid. In general, the results of greenhouse and inoculation tests of the above-mentioned bacterial strains, allowed to determine the potential of *Pseudomonas* spp. to improve the parameters of vegetative growth and improve the values of firmness, total soluble solids, titratable acidity and lycopene concentration. In particular, the strains *P. putida* ACJ14 and *Pseudomonas* sp. C14, stood out for increasing the fruit yield between 54 and 73%, respectively. In addition, they increased the accumulation of lycopene in tomato fruit, *P. putida* ACJ14 with a value of 132.9 mg/g of fruit and *Pseudomonas* sp. C14 with 130.22 mg/g of fruit. Additionally, its ability to persist in the tomato rhizosphere for up to 30 days after inoculation into the root system was verified. Therefore, the results suggest the use of *Pseudomonas* sp. strains C13, C14, C15, *P. fluorescens* C30 and *P. putida* ACJ14 as a sustainable alternative, allowing a 50% reduction of nitrogen, phosphorus and calcium in greenhouse tomato fertilization.

Keywords: *Pseudomonas*, greenhouse, tomato, fertilizers, yield.

1. Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza con mayor producción a nivel mundial (Parra-Gómez et al., 2016). Ocupa un lugar importante en el consumo per cápita debido a su potencial alimenticio, al presentar un alto contenido de proteínas, minerales, fibra y una fuente importante de compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Chaudhary et al., 2018; Perveen et al., 2015). La agricultura mexicana cultiva diversas variedades de jitomate y aporta 2.4% a la producción mundial de la hortaliza, colocándose como el noveno productor y el principal exportador al mercado internacional, donde Sinaloa, Baja California Sur, Sonora y Michoacán aportan mayor valor a la producción (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021). En los últimos años, se reportó un aumento en la producción de jitomate en agricultura protegida principalmente en invernadero, debido a su potencial productivo e incrementos en el rendimiento sobre otros sistemas agrícolas (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA], 2019). Sin embargo, en esta modalidad de agricultura, las condiciones nutricionales se proporcionan a través de la aplicación de soluciones nutritivas con los elementos químicos de forma equilibrada, si uno solo de los nutrientes es escaso, el crecimiento de la planta es limitado, afectando el rendimiento (López-Marín, 2017). En la práctica actual, la concentración aplicada de insumos agrícolas excede los requerimientos nutricionales para evitar deficiencias, propiciando la pérdida significativa de fertilizantes inorgánicos antes de ser absorbidos por las plantas (Burchi et al., 2018). El uso irracional de estos productos se refleja en un incremento significativo (entre el 10 y 25 %) de los costos de producción (Salgado & Núñez, 2012), aunado a problemas de contaminación de agua, suelo y de un desequilibrio en las funciones de los microorganismos rizosféricos involucrados en el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, lo cual puede poner en riesgo una productividad sostenible (Lenka et al., 2016). El deterioro ecológico originado por la agricultura es evidente en México (Luna-Coss et al., 2017). Además, recientemente se registró un aumento excesivo en los costos de fertilizantes, derivado de distintos factores, lo cual hace necesario implementar técnicas de producción agrícola enfocadas en el uso eficiente de los recursos con tendencia hacia una agricultura sostenible (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2022a). En este sentido, las investigaciones se han enfocado en el uso de microorganismos habitantes de la rizósfera con la capacidad de promover el crecimiento vegetal, referidos como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (o PGPR del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) (Subrahmanyam et al., 2020). Las PGPR constituyen del 2 al 5% de las bacterias de rizosféricas (Prasad et al., 2019), pueden colonizar la rizósfera o la superficie de la raíz donde expresan sus

propiedades benéficas, que incluyen aumentos en tasa de germinación de las semillas y la productividad, el crecimiento de raíces y área foliar, el peso de brotes y raíces, el contenido de clorofila y/o la tolerancia a condiciones climáticas adversas como la sequía, mediante diversos mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen la regulación de los niveles de hormonas vegetales que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, o bien, cuando las bacterias incrementan la disponibilidad de ciertos nutrientes del medio ambiente requeridos para su metabolismo y mejora de su proceso de nutrición. Mientras que los mecanismos indirectos, se caracterizan por promover el crecimiento vegetal al inhibir o antagonizar los efectos nocivos de microorganismos fitopatógenos (Molina-Romero et al., 2015; Moreno et al., 2018; Tsegaye et al., 2017).

Además, se ha informado de la capacidad de las PGPR para optimizar la aplicación de fertilizantes inorgánicos en distintos cultivos (Bona et al., 2017). Sin embargo, el desempeño de las bacterias como promotoras del crecimiento vegetal varía en función de distintos factores, como genotipo de planta, condiciones climáticas y del cultivo (tipo de suelo, temperatura, etc.), por lo que ciertas cepas bacterianas exhiben efectos prometedores en condiciones controladas de laboratorio, pero fallan en situaciones reales (Díaz-Rodríguez et al., 2021). Adicionalmente, se ha informado de un alto grado de variabilidad entre cepas de especies en términos de funcionalidad, es decir, una misma especie bacteriana puede o no tener efectos sobre un cultivo (Roquigny et al., 2017). Por ello, su uso agrícola y su presencia en el mercado sigue siendo reducido. Así mismo, la amplia diversidad biológica de las cepas da lugar a la búsqueda constante de microorganismos competentes para cultivos y actividades específicas. Bajo este contexto, en el presente trabajo de investigación se propuso generar información relevante sobre el efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el rendimiento y calidad de fruto de jitomate cultivados bajo una dosis reducida de macronutrientes, lo cual, les pueda atribuir un uso potencial en la optimización de fertilizantes aplicados en sistemas de agricultura protegida.

2. Antecedentes

2.1 Importancia del cultivo de jitomate

El jitomate pertenece a la familia *Solanaceae*, cuyo nombre científico es *Solanum lycopersicum* L., es una planta dicotiledónea de origen sudamericano, domesticada en México y actualmente cosmopolita (Álvarez–Hernández et al., 2009). Es una de las principales hortalizas cultivadas en México y el mundo (Parra-Gómez et al., 2016) y el cultivo con mayor producción a nivel mundial (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria [CEDRSSA], 2020). Presenta alta diversidad genética dando lugar a innumerables variedades que difieren en aspecto, color, forma y tamaño, las cuales son destinadas para procesos industriales o consumo en fresco (Guzmán et al., 2017).

México cultiva diversas variedades y se coloca como el noveno productor y como el principal exportador al mercado internacional, aportando un 2.4% del volumen de producción mundial (SIAP, 2021). Satisface en su totalidad los requerimientos nacionales y exporta alrededor del 51% de la producción, principalmente a los Estados Unidos, Canadá, Japón, Emiratos Árabes Unidos y Singapur (SIAP, 2022a). El jitomate se produce en todo el territorio nacional, sin embargo, para el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2021/2022, Sinaloa lideró la producción con un aporte del 62.2%, seguido de Baja California Sur, Sonora y Michoacán con una contribución del 4.3% (SIAP, 2022b), convirtiendo a su cultivo en una de las actividades socioeconómicas más importantes para la agricultura mexicana debido a la derrama económica por su venta externa para los agricultores y comercializadores.

La importancia del cultivo de jitomate no solo radica en el ámbito económico. El jitomate es considerado un alimento sustancial en la dieta familiar debido a su alto valor nutrimental, lo cual, según Vats et al. (2020), le atribuyen un gran potencial para combatir la desnutrición global, considerada como uno de los principales problemas sociales. Contiene alto porcentaje de humedad (95%), proteína (1.2%), carbohidratos (3%) y lípidos totales (1%) (Perveen et al., 2015), así como de micronutrientes y minerales importantes para enzimas antioxidantes, tales como potasio, sodio, calcio, magnesio, zinc, hierro, manganeso, cobre, selenio y cobalto (Abdullahi et al., 2016), encontrándose con mayor abundancia en la piel del fruto (Elbadrawy & Sello, 2016). Además, García-Closas et al. (2004), reportan al jitomate como la segunda fuente de vitamina C (12 %), provitamina A (14.6 %) y la tercera fuente de vitamina E (6 %). Diversas investigaciones se han enfocado en la composición bioquímica del jitomate porque representa una fuente

importante de compuestos bioactivos que pueden ser la base para el desarrollo de alimentos funcionales (Chaudhary et al., 2018). Los principales compuestos benéficos para la salud son los carotenoides, principalmente licopeno (35% -96%), α - y β -caroteno y luteína (Vats et al., 2020). Se ha asociado al licopeno con la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama y próstata (Assar et al., 2016), como promotor de un adecuado estado de salud del tejido óseo (Costa-Rodrigues et al., 2018) y, junto con la luteína, en la disminución del riesgo de infarto agudo al miocardio (Koh et al., 2011; Zou et al., 2014).

2.2 Cultivo de jitomate en agricultura protegida

Para satisfacer los requerimientos nutricionales de la población estimada para el año 2050, Hunter et al. (2017), mencionan la necesidad de aumentar la producción superior al 70% de los niveles actuales. En ese sentido, el jitomate representa un punto clave debido a su valor nutrimental. Así mismo, el programa de Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 elaborado por SAGARPA, prevé un crecimiento del 32.1% en su demanda por potenciales socios comerciales de México (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017), haciendo necesario un incremento en la producción. Sin embargo, este incremento responde más bien a la obtención de un mayor rendimiento que al incremento de la superficie cultivada, aunado a la implementación de estrategias tecnológicas que permitan un manejo más eficiente de los recursos (Guzmán et al., 2017), por lo cual, la incorporación de nuevas tecnologías agrícolas está cada día en aumento.

La agricultura protegida representa el paso de producción extensiva a producción intensiva (Jaramillo et al., 2007). Hace referencia a un sistema de producción agrícola con las condiciones óptimas para el cultivo, en estructuras como invernaderos, malla sombra, micro túneles y macro túneles (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2016), lo cual permite mantener la oferta de ciertos alimentos durante todo el año con la obtención de altos rendimientos y productos de calidad, además de optimizar el uso de recursos hídricos, fertilizantes y uso de suelo (Vargas-Canales et al., 2018), debido a la reducción de la vulnerabilidad ante efectos climáticos adversos o cambios en las condiciones idóneas haciendo susceptible a la planta ante ataques de plagas y enfermedades, como sucede en cultivos expuestos al aire libre (Pratt & Ortega, 2019).

En México, la superficie total destinada a cultivo en agricultura protegida tiene una tendencia de expansión continua a medida que la superficie de cultivo en campo abierto disminuye (FIRA, 2019). De las 24.6 millones de ha de superficie agrícola nacional (SIAP, 2020), aproximadamente

54,150 ha corresponden a agricultura protegida (Asociación Mexicana de Horticultura Protegida A.C. [AMHPAC], 2020), de las cuales el 70% está destinado al cultivo de jitomate, con un crecimiento anual de 22.7% entre el 2007 y 2017, mientras que la superficie cultivada en campo abierto se redujo a una tasa anual de 5.9% (FIRA, 2019).

El jitomate es la hortaliza con mayor incremento en la productividad debido a los sistemas en los que se produce (CEDRSSA, 2020). La productividad es medida como rendimiento y se representa como la cantidad de producto cosechado al año por unidad de superficie. En sistema de agricultura protegida, el rendimiento de jitomate es entre 5 y 8 kg/planta, superando el que se obtiene en campo abierto, que oscila entre 1.5 y 2 kg/planta (Jaramillo et al., 2007).

En Michoacán, se registraron 5,262 ha de jitomate cultivadas en 2020 (SIAP, 2021) distribuidas en 52 municipios, donde destacan Yurécuaro, Villamar, Tanhuato, Aguililla, Parácuaro, Tacámbaro, Múgica, Venustiano Carranza, Pajacuarán y Jiquilpan (Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario [SEDRUA], 2018). Así mismo, en el 2018 se tenía un registro de aproximadamente 1000 ha de jitomate establecidas en agricultura protegida, de las cuales el 88% corresponden a cultivo en invernadero, mientras el resto corresponde a estructuras como macro túnel, malla sombra y viveros (SIAP, 2018).

2.2.1 Cultivo de jitomate en invernadero

Los invernaderos son las estructuras más utilizadas en la agricultura protegida. Es una construcción agrícola con paredes y techos recubiertos de polietileno o vidrio, que permiten el paso de la radiación solar y donde es posible mantener y controlar condiciones artificiales de microclima, como temperatura y humedad (Jaramillo, 2007). El nivel tecnológico de los invernaderos se clasifica como bajo, medio o alto en función con la cantidad de sistemas auxiliares instalados para el control de factores que influyen directamente en el desarrollo y productividad de los cultivos (Pratt & Ortega, 2019).

La duración del ciclo de cultivo está determinada por variables como condiciones climatológicas, manejo agronómico y características de la planta como la variedad (Jaramillo, 2007). Sin embargo, se constituye de dos fases, la fase vegetativa y la fase reproductiva (Figura 1). La fase vegetativa comienza con la germinación de semillas seguido de la emergencia y el crecimiento inicial, habitualmente en semillero, con una duración de aproximadamente 30 días donde es llevado a cabo el trasplante. Posteriormente, la planta tiene un crecimiento vegetativo de 30 a 50 días hasta la formación del primer racimo floral. La fase reproductiva inicia desde la floración y el cuajado de los frutos, aproximadamente a los 90 días después de la siembra. Por lo general,

la madurez ocurre alrededor de los 120 días iniciándose la cosecha hasta el término del ciclo productivo (López-Marín et al., 2017; Shamshiri, 2014).

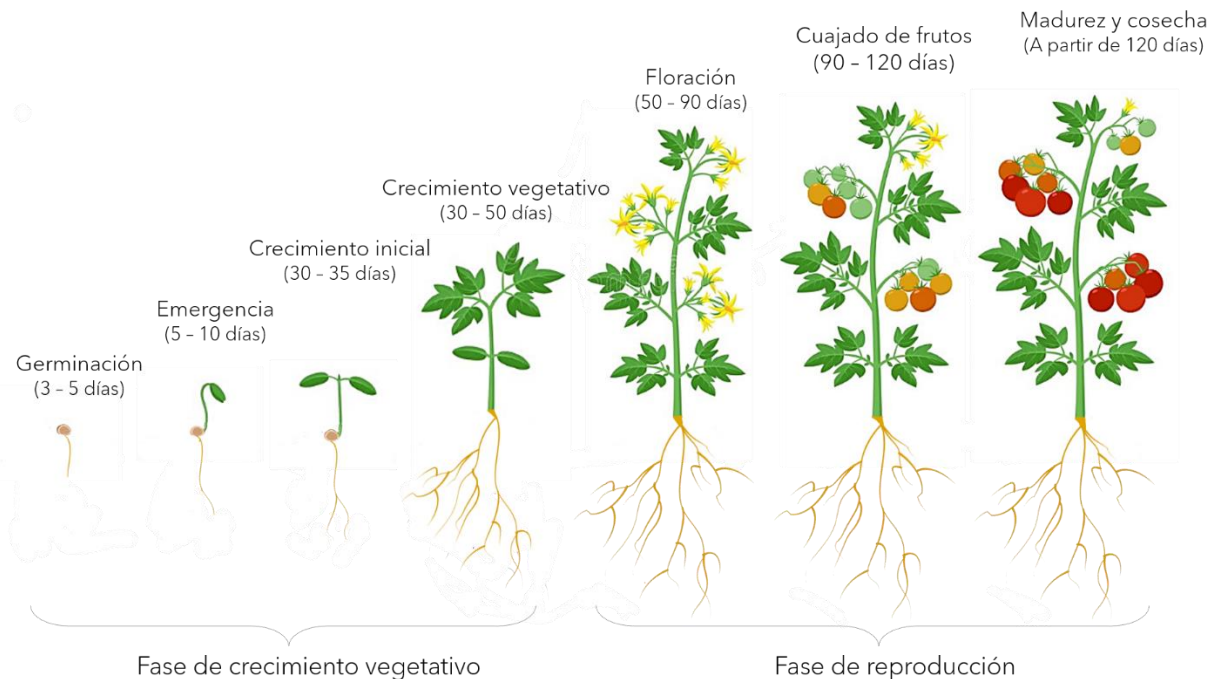


Figura 1. Etapas fenológicas del jitomate. La germinación de la semilla se lleva a cabo después de un periodo de imbibición donde ocurre absorción de agua que activa los procesos metabólicos que promueven la expansión del embrión y el desarrollo de la radícula. Durante la fase de crecimiento vegetativo, las plantas utilizan su energía para la formación de tallos y hojas, por lo que la planta crece rápidamente. La fase reproductiva comienza con la formación de la primera inflorescencia. En las plantas de crecimiento indeterminado, el crecimiento vegetativo continúa con la formación de hojas y generalmente, cada 2-4 hojas, aparece nuevamente un racimo floral. Posteriormente ocurre el cuajado de frutos seguido del crecimiento y maduración, en la cual los frutos cambian gradualmente su pigmentación de verde generado por la clorofila a rojo producto de los carotenoides cuando alcanzan el máximo grado de madurez (Argerich & Troilo, 2010).

El jitomate cultivado en invernadero generalmente es de hábito indeterminado, caracterizándose por un crecimiento continuo que cesa al cortar el tallo apical (Jaramillo et al., 2007) y se utiliza por su mayor potencial productivo (Escobar & Lee, 2009). El número de racimos por encima del cual se realiza el corte depende del objetivo del productor y, a su vez, este depende del destino del producto, ya que, en un mayor número de racimos por planta, se obtiene un mayor incremento

del rendimiento a costa de una disminución en los parámetros de calidad del fruto, y viceversa (Suárez et al., 2017).

Otro factor importante en este sistema de agricultura es el material de soporte. Cuando el cultivo se realiza en suelo, como ocurre en invernaderos de baja tecnología y en algunos de tecnología media (Saravaiya et al., 2014), éste proporciona gran parte de los nutrientes requeridos por las plantas, debido a la presencia de materia orgánica, y por tanto de nutrientes (Peoples et al., 2014). Por su parte, en los invernaderos donde se utilizan sustratos inertes, las condiciones bioquímicas nutricionales se proporcionan a través de la aplicación de soluciones nutritivas con los elementos químicos esenciales para el desarrollo de forma equilibrada (Pratt & Ortega, 2019). Existen 17 nutrimentos necesarios para el adecuado desarrollo de las plantas, considerados así debido a los siguientes criterios: i) la deficiencia del elemento afecta el ciclo de vida normal de la planta; ii) la falta de alguno de ellos produce síntomas de deficiencia y no puede ser reemplazada por otro elemento y iii) el elemento está implicado en funciones metabólicas o estructurales de la misma (Navarro & Navarro, 2013). El oxígeno, el carbono y el hidrógeno son elementos no minerales obtenidos del agua y aire, el resto proviene de la solución del suelo o de actividades antropogénicas. Por otro lado, los elementos minerales se clasifican como macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre) y micronutrientes (boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel) de acuerdo con la cantidad requerida por la planta (Navarro & Navarro, 2003). En plantas de jitomate, el mayor consumo de nutrientes ocurre en la etapa vegetativa, principalmente de nitrógeno por ser constituyente básico de la clorofila y como responsable del desarrollo de tallos y hojas, promoviendo el crecimiento de la planta y el área foliar, por tanto, su consumo disminuye en las etapas posteriores. El fósforo también es importante en el crecimiento de raíces y desarrollo de las plantas, sin embargo, su consumo es particularmente alto en la etapa de floración al ser responsable del número de flores y botones formados, junto con el potasio que promueve el inicio del proceso y estimula la maduración de flores y formación de frutos. De igual forma, el calcio tiene un papel importante para los tomates en todas las etapas fenológicas. Sin embargo, su deficiencia más común se manifiesta en el fruto (Bodale et al., 2021).

Steiner (1961), propuso una Fórmula Nutritiva Universal para garantizar la absorción óptima de nutrientes por la planta, considerando la relación entre aniones y cationes en la siguiente proporción: fosfato (60%), nitrato (5%), sulfato (35 %), calcio (45%), potasio (35%) y magnesio (20%), así como la concentración iónica total y el pH. Generalmente, la conductividad eléctrica adecuada para el cultivo de jitomate es aproximada a 2.0 dS/m, por tanto, la concentración sugerida de aniones es de 12.0, 1.0 y 7.0 me/L para nitrato, fosfato y sulfato, y de 9.0, 7.0 y 4.0

me/L para los cationes calcio, potasio y magnesio, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones deben ajustarse teniendo en cuenta la etapa fenológica de la planta, frecuencia de aplicación y las condiciones ambientales (Escobar & Lee, 2009).

2.3 Comercialización de fertilizantes inorgánicos

La aplicación de fertilizantes es indispensable para compensar la disminución de la productividad del suelo y obtener altos rendimientos en la producción de alimentos. Es así, que, en 1950, se originó la llamada Revolución Verde, un modelo tecnológico de agricultura basado en el alto uso de fertilizantes de síntesis química, como solución a la pérdida de fertilidad de suelos explotados y se adoptó en los campos agrícolas como una propuesta para erradicar la hambruna mundial que se pronosticaba (Martínez-Centeno & Huerta-Sobalvarro, 2018). La revolución verde dio lugar a lo que conocemos como agricultura convencional. Las técnicas agrícolas convencionales, sobre todo en campo abierto y los sistemas de agricultura protegida con suelo natural, implican el uso intensivo de fertilizantes inorgánicos para incrementar la producción por unidad de superficie (Khan et al., 2018). La división estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAOSTAT] (2021), reporta una tendencia creciente del uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en México desde 1980 al 2019 (Fig. 2). Para este año, se estimó la aplicación de 1,331,837.19 toneladas de productos nitrogenados. Hasta 1996, la demanda era cubierta en su totalidad por industrias mexicanas, sin embargo, a partir de ese año se reportó una disminución drástica en su producción (Fig. 2A). De la misma forma, la disminución en la producción de fertilizantes fosfatados superó su uso, generando la necesidad de su adquisición en el mercado internacional (Fig. 2B). En 2021, se reportó la producción de fertilizantes en México como la más baja desde el 2013, mientras su consumo continúa en aumento (SIAP, 2022). Actualmente, México es productor del 35% de la demanda nacional, lo cual genera un aumento en las importaciones de insumos agrícolas para cubrir el resto, principalmente de Rusia, China, Irán y Egipto (CEDRSSA, 2019). La agricultura global enfrenta un máximo histórico en los precios de fertilizantes. Por un lado, la pandemia del COVID-19 originó el cierre de fábricas y la disminución en la producción de fertilizantes, además, provocó aumentos en los costos de transporte internacional a lo que se suma el incremento en el precio de gas natural como energético para su producción (FAO, 2022a). Por otra parte, el conflicto geopolítico entre Rusia y Ucrania, generó en Rusia la interrupción de la comercialización del 14% de urea, el 23% de amoníaco, el 46% de nitrato de amonio, el 11% de fosfatos amoniacales y el 21% de potasa al mercado mundial, según la Asociación Internacional de Fertilizantes (IFA, por sus siglas en inglés "International Fertilizer Association"), lo cual ha impactado de forma considerable el

precio de los insumos. Para octubre de 2021, se reportó un incremento del 79%, 74% y 48% en los precios de Urea, fosfato diamónico y fosfato monoamónico, respectivamente, en el mercado nacional, según datos del Grupo Consultor de Mercados Agrícolas [GCMA], (2021) y para el 2022, el incremento fue de hasta 300% para la urea y 200% para fertilizantes fosfatados, poniendo en riesgo las cosechas futuras a nivel mundial (FAO, 2022b).

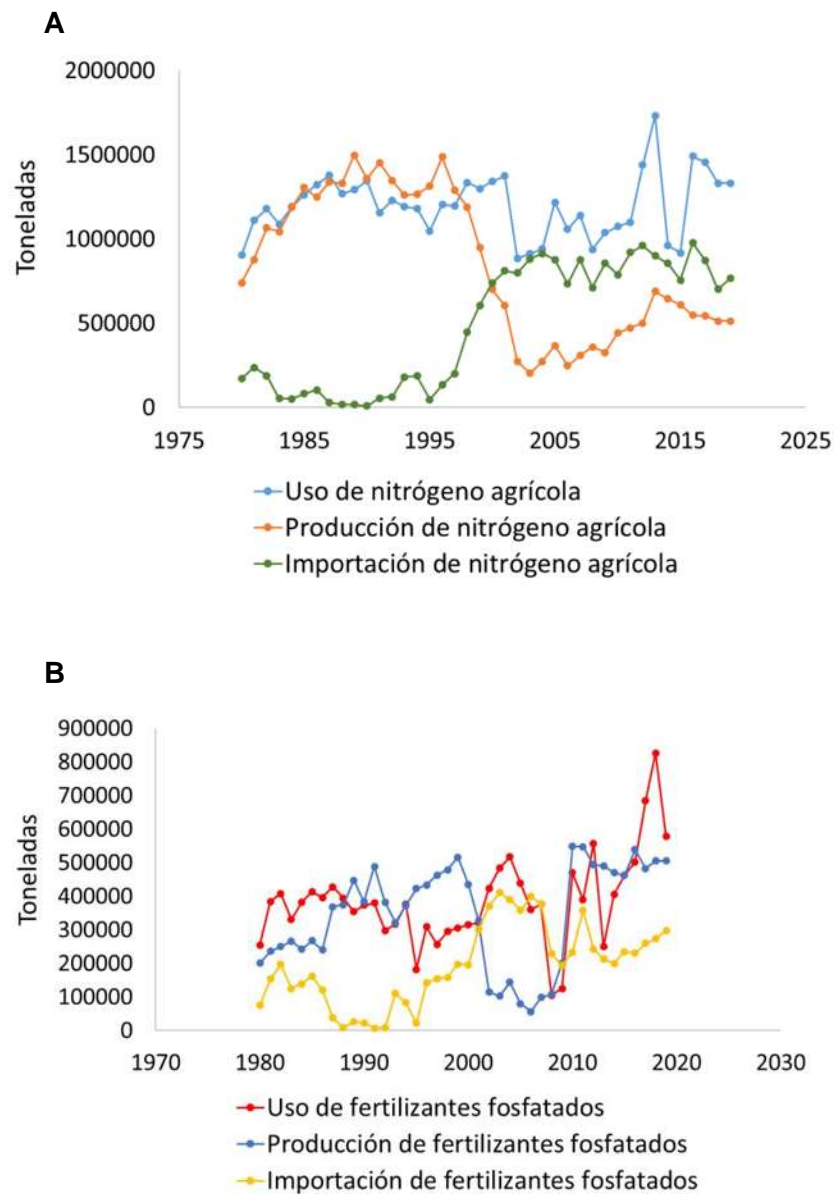


Figura 2. Uso, producción e importación de fertilizantes nitrogenados y fosfatados en México de 1980 a 2019. (A) fertilizantes nitrogenados y (B) fertilizantes fosfatados. Datos de la división estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021.

2.4 Impacto ecológico de la agricultura convencional

Los fertilizantes, principalmente fosfatados y nitrogenados, son esenciales para el sistema alimentario mundial. Sin embargo, el ecosistema global está recibiendo niveles elevados de fertilizantes debido al arrastre por agua o volatilización cuando superan la tasa de absorción de los cultivos (FAO, 2002). En la práctica actual en invernaderos, la concentración aplicada de fertilizantes excede significativamente los requerimientos nutricionales, ya que, al estar las plantas sobre sustratos inertes, la única fuente es la solución nutritiva y es muy común la sobredosificación para evitar deficiencias (Burchi et al., 2018). Pese a la mayor eficiencia de nutrientes de los sistemas de riego hidropónico sobre otras técnicas de riego, la pérdida de fertilizantes sigue siendo considerable. Sanjuan-Delmás et al. (2020), llevaron a cabo un estudio en tomate de invernadero para la evaluación del flujo de nutrientes en sistemas hidropónicos abiertos y determinaron la pérdida por lixiviación del 48% de nitrógeno, 49% de calcio y el 28% de fósforo. También, informaron de la retención en el sustrato del 6%, 5% y 7%, respectivamente, así como la pérdida del 1% de cada nutriente debido a las fugas del sistema. Además del impacto económico generado por la baja eficiencia de nutrientes, la FAO (2018), estima una aplicación aproximada de 115 millones de toneladas anuales de fertilizantes nitrogenados a los suelos agrícolas, de las cuales, alrededor del 20% terminan acumulándose en los suelos, mientras el 35% acaba en los océanos y ponen en riesgo una productividad sostenible al generar problemas graves, no solo a la salud humana, sino también a la base de su propio futuro a través de la degradación del suelo, limitando su potencial agrícola, así como ejerciendo presión sobre los recursos naturales (Basu et al., 2021). La agricultura es una de las principales causas del cambio climático y, al mismo tiempo, se vuelve vulnerable a su impacto (Anderson, 2019). Produce alteraciones en el suelo como erosión, acidificación, acumulación de metales pesados, compactación, pérdida de materia orgánica, salinización, encharcamiento, etc. (Savci, 2012). Además, es considerada una fuente importante de emisiones de gases que contribuyen al efecto invernadero como óxido nitroso, amoníaco, metano y dióxido de carbono, aportando alrededor del 10-12% de total (Lenka et al., 2016), así como el principal productor de aguas residuales que se descargan en los mantos acuíferos (FAO, 2018).

2.5 Agricultura sostenible

En los últimos años, la producción agrícola ha disminuido (Hakim et al., 2021) y ha colocado a la agricultura moderna frente a un gran desafío para garantizar la seguridad alimentaria bajo la

presión del crecimiento poblacional, aunado a un clima global cambiante y a la disponibilidad limitada de tierras para uso agrícola (Busby et al., 2017). Dado que los recursos naturales son limitados, el uso continuo de fertilizantes y agua necesarios para cubrir los requerimientos nutricionales futuros, no son sostenibles (Ray, 2020). Por tanto, existe la necesidad de adoptar prácticas agrícolas enfocadas en el uso eficiente de recursos y el uso mínimo de fertilizantes para mantener la sostenibilidad ambiental y el equilibrio ecológico (Kalyanasundaram et al., 2021). Esta modalidad agrícola hace referencia a la llamada agricultura sostenible, la cual propone un modo de producción que asegure el manejo responsable, la preservación de la biodiversidad, así como la disponibilidad de los recursos a largo plazo, no solo garantizando la seguridad alimentaria, sino también proporcionando alimentos de alta calidad nutricional e inocua (Abubakar & Attanda, 2013). En este respecto, la integración de bacterias que habitan la rizósfera a los sistemas agrícolas representa una estrategia efectiva para mejorar la eficiencia en el uso de nutrientes aplicados en los cultivos en una producción agrícola sostenible (Hakim et al., 2021).

2.6. Uso de microorganismos como estrategia para la agricultura sostenible

Hiltner en 2004, introdujo el término rizósfera para describir la parte del suelo adyacente a las raíces en una distancia de 1-3 mm (Zhang et al., 2015), donde los diversos compuestos liberados por el sistema radicular de las plantas desencadenan una serie de reacciones físicas y químicas relacionadas directamente con la densidad microbiana (Yadav et al., 2015). La cantidad y composición de los exudados radiculares dependen de factores como la especie y el estado fisiológico y / o de desarrollo de la planta, así como de las características fisicoquímicas del suelo (Dessaux et al., 2016), creando un entorno bioquímico característico del huésped y dando lugar al establecimiento de comunidades microbianas específicas (Kumar & Dubey, 2020). Por consiguiente, la composición funcional de las comunidades rizobacterianas cambia con la diversidad de las plantas y, a su vez, la actividad microbiana puede generar cambios en su perfil metabólico de secreción, afectando nuevamente la estructura microbiana (Eisenhauer et al., 2017). Por tanto, el papel de la rizósfera es fundamental y tiene un gran impacto en la productividad de los suelos y en la salud de las plantas (Yadav et al., 2015) al proporcionar un nicho donde tienen lugar interacciones planta-microorganismo importantes para el ecosistema (Hassan et al., 2019). La rizósfera alberga hasta 10^{11} células microbianas por gramo de raíz y alrededor de 30,000 especies en general (Bhattarai et al., 2015) que establecen interacciones tanto positivas o negativas con las plantas (Sharma et al., 2021). Las bacterias son el grupo de mayor densidad, se les encuentra en un rango aproximado de 9×10^7 células por gramo de suelo

(Santoyo et al., 2021). La porción de bacterias del microbioma rizosférico y con un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, son referidas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) (Subrahmanyam et al., 2020).

2.7 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El término PGPR se utilizó por primera vez por Kloepper (1978). El mismo autor argumenta que, para que una bacteria sea considerada PGPR, debe cumplir tres características (i) debe ser capaz de colonizar la superficie de la raíz (ii) debe sobrevivir y multiplicarse en microhábitats en competencia eficaz y (iii) debe estimular el crecimiento vegetal. La presencia de PGPR en la rizósfera mejora el porcentaje de germinación y el vigor de semillas (Rudolph et al., 2015), influyen en el desarrollo de raíces (Verbon & Liberman, 2016), restauran la calidad y fertilidad de suelos contaminados (Kaur, 2021), brindan protección contra microorganismos fitopatógenos y frente a condiciones de estrés ambiental (Kumar et al., 2019), además de ayudar a disminuir la dependencia global de químicos agrícolas que desestabilizan los agroecosistemas (Laslo & Mara, 2019).

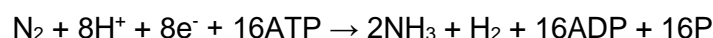
Gran parte de los nutrientes aplicados en la agricultura no son aprovechados por la planta, generando un exceso acumulado en el suelo en formas mínimamente biodisponibles (Jacoby et al., 2017), lo cual demuestra la necesidad de hacer eficiente el uso de fertilizantes. En este proceso, las comunidades bacterianas del suelo juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la fertilidad (Kumar et al., 2017), ya sea participando en las transformaciones de nutrientes en formas biológicamente asimilables o estimulando el desarrollo del sistema radicular, lo cual conduce a una mayor superficie y a un aumento de pelos radiculares, mejorando así la adquisición de nutrientes (Calvo et al., 2016). En este contexto, existe una investigación extensa en torno a los mecanismos que emplean las bacterias para promover el crecimiento, tales como la fijación de nitrógeno, la solubilización de calcio y la solubilización de fosfatos acumulados en suelo.

2.7.1 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es considerado el nutriente más importante para lograr altos rendimientos en la agricultura (Erisman et al., 2013). El aire de la atmósfera está constituido en un 78% de N_2 , sin embargo, esta forma no es asimilable para las especies vegetales, puesto que los organismos

eucariotas tienen la capacidad de asimilar únicamente especies de nitrógeno oxidado o reducido, como nitratos, nitritos, amonio o amoniaco (Burén & Rubio, 2017). La presencia de estas formas en los campos de producción agrícola, proceden de la materia orgánica, nitratos aportados por la lluvia, abonos verdes o de fertilizantes comerciales (Navarro & Navarro, 2003). Sin embargo, los cultivos absorben en promedio el 50% del nitrógeno aplicado mientras que el resto se pierde en procesos de desnitrificación, lixiviación o volatilización, así como su fijación sobre las arcillas (Zhang et al., 2015). El N₂ atmosférico puede ser convertido a formas utilizables para las plantas mediante el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Jacoby et al., 2017), donde es reducido a amonio en una reacción catalizada por un complejo enzimático de nitrogenasa presente en bacterias denominadas diazotróficas (Bhat et al., 2015).

El complejo de nitrogenasa contiene molibdeno unido al cofactor del sitio activo, por lo que puede ser referida como Molibdeno (Mo) nitrogenasa (Burén et al., 2017). Está compuesta por dos subunidades de metaloproteínas: el Componente I o dinitrogenasa y el Componente II o dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa está formada por los productos génicos *nifD* y *nifK*, consiste en un tetrámero formado por dos copias de dos subunidades distintas, que contiene hierro y molibdeno, por lo que también se denomina Fe-Mo proteína. Por su parte, la dinitrogenasa reductasa está codificada por el gen *nifH*, el cual es un homodímero formado por dos subunidades idénticas con un único centro redox del tipo 4Fe-4S, por lo que también es llamado Fe-proteína (Mahmud et al., 2020; Sharma et al., 2021). La Fe-proteína se reduce al recibir los electrones procedentes de los glúcidos, que luego son transferidos a la Fe- Mo proteína, quien interacciona con el N₂ como sustrato reducible generando amoniaco que será rápidamente protonado a amonio y será incorporado, en primer lugar, en los aminoácidos, principalmente glutamato y glutamina, y posteriormente en otras biomoléculas que contienen nitrógeno (Bhat et al., 2015) (Fig. 3). La energía de activación de la fijación de nitrógeno es extremadamente alta, debido a la estabilidad del triple enlace del nitrógeno molecular, por lo cual, requiere de energía suministrada por ATP producido en la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena transportadora de electrones (Nelson & Cox, 2009). El resultado de la reducción neta de nitrógeno molecular a amoníaco se explica generalmente por la siguiente ecuación:



Además, la Fe-proteína es extremadamente sensible a oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos que les permite bajar las concentraciones de éste a fin de mantener la funcionalidad enzimática (Burén & Rubio, 2017; Wang et al., 2017).

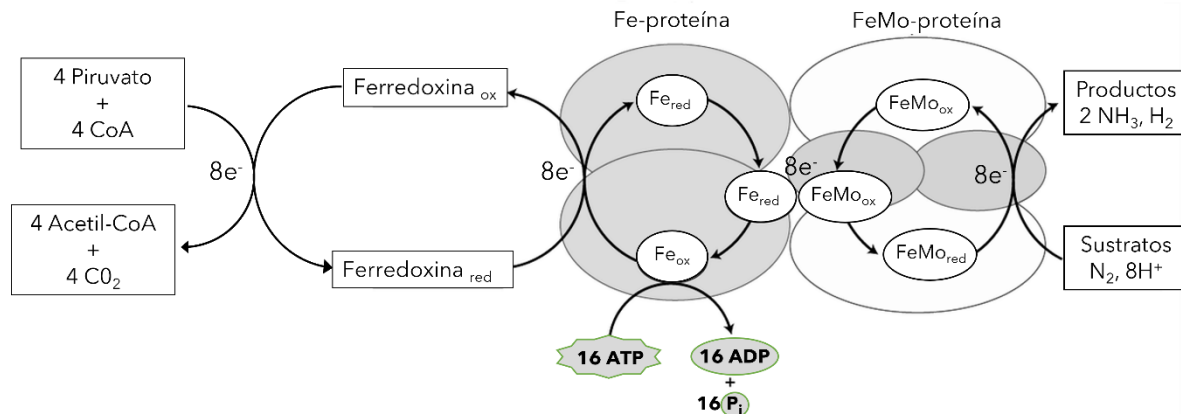


Figura 3. Esquema de la enzima nitrogenasa y el proceso de fijación biológica de nitrógeno. La fijación biológica de nitrógeno ocurre cuando la dinitrogenasa reductasa o Fe-proteína se reduce al recibir electrones procedentes de la oxidación de la ferredoxina, quien, a su vez, recibe electrones del piruvato. Por cada electrón procedente del piruvato, son necesarios 2ATP. La Mo-Fe-proteína del complejo nitrogenasa se reduce por transferencia de electrones procedentes de la Fe-proteína y se combina con los sustratos reducibles, es decir, N₂ y otros sustratos para, finalmente producir dos moléculas de NH₃ que son liberados por la enzima e incorporados a los aminoácidos (Taiz & Zeiger, 2003).

2.7.2 Solubilización de fosfato

El fosfato es el segundo elemento más importante en la nutrición vegetal (Navarro & Navarro, 2003). Es un constituyente importante de ácidos nucleicos, enzimas y fosfolípidos. Además, participa en procesos como la fotosíntesis, biosíntesis macromolecular y la respiración, influyendo en el desarrollo radicular, en el crecimiento y fortalecimiento del tallo, formación de flores y semillas y en la resistencia de las plantas contra enfermedades (Sharma et al., 2013). Un suministro adecuado de fósforo en las primeras fases de desarrollo vegetal, ayuda al establecimiento de primordios de las partes reproductivas (Satyaprakash et al., 2017).

El suelo contiene aproximadamente 0.05% de fósforo distribuido como fósforo soluble, fósforo orgánico y fósforo asociado a partículas minerales (Restrepo-Franco et al., 2015). Únicamente el fósforo soluble es considerado disponible para las plantas, quienes lo absorben como

ortofosfatos, cuyas formas iónicas son dependientes del pH (Kalayu, 2019). Las plantas absorben principalmente el fosfato cuando se encuentra como H_2PO_4^- , este ion es predominante cuando el suelo tiene un pH entre 4.0 y 6.0; a pH entre 6.5 y 7.5, el fósforo está presente como H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , también puede ser absorbido por la planta, pero en menor proporción. Cuando el pH se encuentra entre 8.0 y 10.0, el ion HPO_4^{2-} es dominante, pero es rápidamente fijado en forma de fosfatos de calcio o magnesio, altamente insolubles, mientras que a pH mayor a 10.0 solamente el fosfato de sodio está disponible para la planta. Por otro lado, cuando el pH es inferior a 3.0, el fósforo está presente como H_3PO_4 , una forma extremadamente reactiva propensa a la fijación por óxidos e hidróxidos libres de hierro y aluminio (Arai, & Sparks, 2007; Khan et al., 2009b; Patiño-Torres et al., 2014). Además, las superficies cargadas positivamente de las arcillas por la presencia de minerales como hierro (Fe^{3+}), aluminio (Al^{3+}) y calcio (Ca^{2+}), atraen los iones ortofosfato de la disolución, que se adsorben a grupos funcionales superficiales, intercambiándose con grupos hidronio e hidróxido (Restrepo-Franco et al., 2015). Debido a la reactividad de las formas asimilables, el fósforo disponible representa el 0.1% del contenido de fósforo total en el suelo (Alori et al., 2017), haciendo necesaria la aplicación de fertilizantes químicos para complementar los niveles requeridos (Sharma et al., 2013). Sin embargo, se estima que el 10 – 20% del fósforo exógeno es aprovechado por las plantas, el resto se convierte rápidamente en compuestos insolubles (Zineb et al., 2019) pudiendo ser transformados a formas solubles por acción microbiana (Chuang et al., 2007).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen entre el 1 y el 50% de la comunidad microbiana del suelo (Khan et al., 2009a). Llevan a cabo la solubilización de fosfato adoptando distintas estrategias para su transformación y movilización, principalmente la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y la extrusión de protones (Khan et al., 2009b).

Los grupos carboxilo e hidroxilo de los ácidos orgánicos secretados por las bacterias quelan los cationes Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} unidos al fosfato, convirtiéndolo en formas solubles y compiten con el fosfato por los sitios de adsorción en el suelo (Kalayu, 2019). Por otro lado, en suelos alcalinos, la liberación de ácidos orgánicos conduce a la disminución del pH (Mohamed et al., 2018), dando como resultado la acidificación de las células microbianas y el entorno, por lo que los iones fosfato se liberan mediante la sustitución de H^+ por Ca^{2+} (Alori et al., 2017; Khan et al., 2014) y pueden ser absorbidos por las plantas.

2.7.3 Solubilización de calcio

El calcio es un nutriente vegetal absorbido por las plantas como catión divalente Ca^{2+} . Juega un papel importante como componente de la pared celular y en el desarrollo de nuevas raíces, pelos radicales y meristemos apicales. Además, estimula el vigor de las plantas, la viabilidad del polen, así como el contenido proteico de granos y semillas (Castellanos, 2011). Se encuentra formando parte de compuestos como sulfato de calcio, fosfatos de calcio y carbonato de calcio, procedentes de rocas, minerales y fertilizantes añadidos por el hombre. Todos estos compuestos van liberando calcio lentamente por efecto de la meteorización y son transformados a formas más solubles. El calcio liberado tiene varios destinos: pérdida por lixiviación, absorbido por los organismos del suelo, adsorbidos por el complejo coloidal o precipitando nuevamente como compuestos cálcicos, razones por las cuales disminuyen las cantidades de calcio disponible (Navarro & Navarro, 2003).

Los iones de hidrógeno y, probablemente también los agentes quelantes en el suelo, pueden dar lugar a la meteorización de los minerales que contienen calcio al intercambiarse en los sitios de unión a los coloides (Mengel et al., 2001). Esto fue comprobado por Rana et al. (2015), quienes observaron que los compuestos ácidos secretados por bacterias, específicamente ácido oxálico y ácido cítrico, pudieron solubilizar el carbonato de calcio en condiciones *in vitro*. Además, mostraron una gran correlación entre la solubilización del mineral con la producción del pigmento piocianina, producido por especies de *Pseudomonas*, al mantener el equilibrio entre los iones de Ca^{2+} solubles y los iones de Ca^{2+} insolubles como se muestra en la Fig. 4.

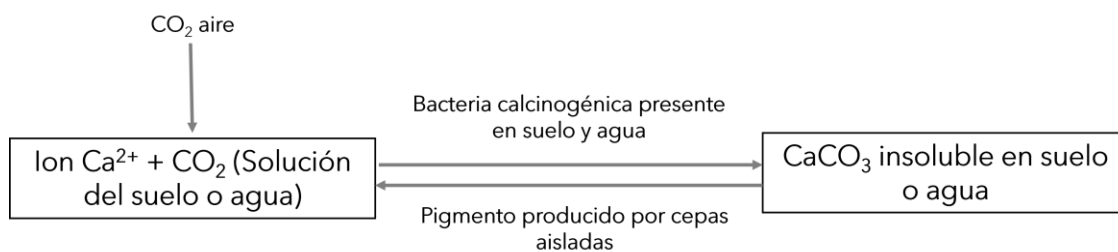


Figura 4. Equilibrio entre los iones de calcio en la solución del agua o del suelo ejercido por bacterias. Las bacterias calcinogénicas presentes en suelo y agua pueden convertir el CO₂ en CaCO₃ insoluble en presencia del ion Ca²⁺. El átomo de nitrógeno que contiene la piocianina, tiene un efecto quelante para los iones Ca²⁺, actuando como agente amortiguador manteniendo la condición de equilibrio en la reacción (Rana et al., 2015).

La concentración de nutrientes en suelo es el factor más importante para cubrir la demanda necesaria para el óptimo crecimiento de las plantas, no obstante, la capacidad de absorción de elementos nutricionales también depende ampliamente del volumen del suelo ocupado por raíces (Marschner, H., 1995). Por lo tanto, uno de los mecanismos más estudiado en este sentido, es la producción de moléculas orgánicas que regulan la expresión de genes implicados en el desarrollo del sistema radicular, denominadas fitohormonas (Bach-Álvarez *et al.*, 2008).

2.7.4 Producción de ácido indol-3-acético

Las auxinas juegan el rol más importante en el desarrollo de las plantas y el ácido indol-3-acético (AIA) es la fitohormona natural más importante en esta clase. Produce diferentes efectos sobre la fisiología vegetal como aumentar la tasa de respiración de la raíz (Molina-Romero *et al.*, 2015), el aumento de la biomasa de los brotes y la modulación de la arquitectura del sistema radical (Ortiz-Castro *et al.*, 2009), ya sea por el aumento del número y / o la longitud de las raíces laterales y pelos radicales (Vacheron *et al.*, 2013), lo cual incrementa su potencial de exploración para la absorción de agua y nutrientes, el cual se ve reflejado en el crecimiento (López-Bucio *et al.*, 2003). Se estima que el 80% de las rizobacterias sintetizan AIA como un producto final del metabolismo a partir del triptófano presente en los exudados de raíz (Olanrewaju *et al.*, 2017), generando distintos productos intermediarios en el proceso, los cuales dieron lugar a la caracterización de cinco vías diferentes de biosíntesis: la indol-3-acetamida, ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetonitrilo, triptamina y rutas de triptófano oxidasa de cadena lateral (Lin *et al.*, 2015) (Fig. 5). Este dato fue comprobado por Zhang *et al.*, (2019), quienes realizaron un estudio a gran escala donde analizaron alrededor de 7280 genomas procarióticos asociados a la raíz e informaron que el 82% eran potencialmente capaces de sintetizar AIA a partir de triptófano, preferencialmente a través de las vías indol-3-piruvato, indol-3-acetamida, y triptamina. *Azospirillum brasilense* es un ejemplo de rizobacteria que estimula el crecimiento vegetal a través de la producción de AIA. Se ha demostrado su capacidad para alterar la raíz en *Arabidopsis thaliana* al aumentar la expresión génica y la señalización de auxinas, dando como resultado el aumento en el número de raíces laterales y pelos radiculares (Spaepen *et al.*, 2013).

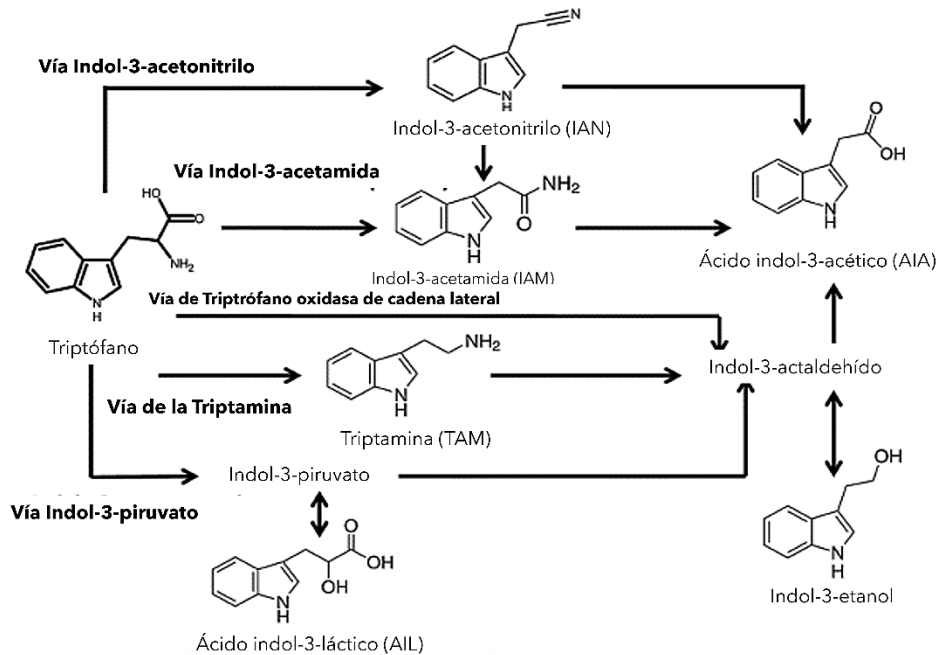


Figura 5. Vías de biosíntesis de ácido indol-3-acético por bacterias rizosféricas.

2.8 Uso de PGPR en cultivos hortícolas

En los últimos años, se ha demostrado el uso de PGPR como una opción ecológica para el beneficio de numerosas especies vegetales. Se han aislado diversas cepas de microorganismos cuya inoculación en plantas influye en la concentración de nutrientes impactando de forma positiva sobre el rendimiento y productividad de los cultivos (Calvo et al., 2016). Esitken et al. (2010), llevaron a cabo la inoculación en fresa con un biofertilizante a base de *Pseudomonas* sp. y dos cepas de *Bacillus* sp. e informaron la estimulación del crecimiento de las plantas, así como un mayor contenido de P y Zn de las hojas. Además, aumentó el número de frutos por planta, logrando un incremento significativo del rendimiento. Por otro lado, en un experimento de invernadero, las plantas de tomate mostraron aumentos significativos en la altura y el peso de los brotes, la longitud y el peso de las raíces y el diámetro del tallo en los 30 días posteriores a la inoculación con una cepa de *Burkholderia* sp., la cual presentó actividad nitrogenasa, actividad desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), capacidad de solubilización de fosfato y producción de ácido indol-3-acético (Gao et al., 2015). Adicionalmente, Sánchez-López et al. (2012), empleando el mismo cultivo, demostraron que la inoculación de *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., incrementó de manera significativa la biomasa y desarrollo de

la planta, así como el rendimiento en la producción de frutos. Por otro lado, se ha informado de los efectos benéficos de *Pantoea cyripedii* y *Pseudomonas plecoglossicida* sobre distintas variables de respuesta de maíz y trigo (Kaur & Reddy, 2015) y se han reportado efectos similares de *Azospirillum lipoferu* y *Azotobacter chroococcum* (Latef et al., 2020). En otro ensayo, Cisneros-Rojas et al. (2017), indicaron una mejora en el desarrollo de plántulas de café tras la inoculación de *Kocuria* sp. y *Bacillus subtilis*, mientras que, *Providencia rettgeri*, *Advenella incenata*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Serratia plymuthica* han incrementado el peso seco, la altura de la planta, la longitud de la raíz, el diámetro promedio de la raíz, el área de la superficie de la raíz, volumen de raíces y contenido de clorofila de plántulas de *Avena sativa*, *Medicago sativa* y *Crocus sativus* (Li et al., 2020). Además de estimular el crecimiento de plantas y generar incrementos sobre el rendimiento de los cultivos (Pérez-Rodríguez et al., 2020), se ha destacado la participación de las PGPR en la optimización de fertilizantes, logrando una reducción de hasta el 50% en su aplicación con la obtención de rendimientos comparables en plantas con un régimen de fertilización completa (Scagliola et al., 2021).

2.9 Importancia del género *Pseudomonas* spp. en la agricultura

El género *Pseudomonas* spp. es uno de los más diversos y con una amplia distribución debido a su alto grado de adaptabilidad en distintos entornos (Poncheewin et al., 2022). Tiene especial ventaja frente a otras bacterias por su capacidad de colonización y persistencia en la rizósfera (Zboralski & Fillion, 2020) donde exhiben gran versatilidad metabólica y funcional, lo cual juega un papel clave en su actividad para promover el crecimiento de plantas y/o el control de microorganismos fitopatógenos (Roquigny et al., 2017). Se ha demostrado su efecto benéfico sobre diversos cultivos. En estudios previos, Fox et al. (2016), demostraron el uso eficiente de *Pseudomonas protegens* caracterizada como fijadora de nitrógeno atmosférico, sobre el contenido de nitrógeno y la acumulación de biomasa en los tejidos vegetativos y reproductivos de maíz y trigo. En otro estudio, Li et al. (2017), determinaron la producción de AIA a partir de triptófano y la actividad nitrogenasa de *Pseudomonas koreensis* y *Pseudomonas entomophila*, además, observaron su capacidad para colonizar todos los órganos de la planta de caña de azúcar, incluidas raíces, tallos y hojas y su actividad de biocontrol contra los patógenos *Ustilago scitaminea* y *Colletia paradoxa*. *Pseudomonas* también se ha considerado como uno de los principales géneros de bacterias productoras de ácidos orgánicos responsables de la solubilización de fosfato. Vyas & Gulati en (2009), reportaron la producción de ácido glucónico, ácido oxálico, ácido 2-cetoglucónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido cítrico y

ácido málico por *P. fluorescens*, *P. poae*, y *P. trivialis* durante la solubilización de fosfato tricálcico y fosfatos de roca. Por su parte, Kour et al. (2020), informaron de la eficiente actividad solubilizadora de fosfato de *Pseudomonas libanensis* y su efecto positivo en la germinación y crecimiento de trigo sometido a estrés por sequía. Una actividad similar se reportó por *Pseudomonas putida*, quien mejoró el índice de vigor en semillas de soja y maíz bajo estrés salino (Costa-Gutierrez et al., 2020). También, se reportó la presencia de proteínas anticongelantes en tres cepas distintas de *Pseudomonas* sp., responsables de la actividad inhibidora de la recristalización del hielo, lo cual, se relacionó con la promoción en la germinación de semillas de tomate y el desarrollo radicular de plantas crecidas a 14°C (Vega-Celedón et al., 2021), destacando su adaptabilidad en ambientes adversos y su capacidad para mitigar el estrés abiótico. Además, las *Pseudomonas* spp. destacan por su papel en la protección de plantas debido a la producción de sideróforos (Kotasthane et al., 2017), antifúngicos (Hernández-León et al., 2015) y su efectividad frente a insectos plaga como *Spodoptera litura* (Bano & Muqarab, 2017). *P. putida* y *P. fluorescens* han sido las especies más estudiadas debido a su versatilidad en la rizósfera (David et al., 2018; Molina et al., 2020). El género *Pseudomonas* spp. presenta amplia diversidad genética, debido a que sólo del 25 al 35% del genoma de todos los miembros del género está conformado por genes centrales, mientras el resto confiere variación metabólica, ecológica y funcional a nivel de especie y entre cepas de una misma especie (Loper et al., 2012). Es decir, distintas cepas pueden diferir en sus características y funciones biológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal (Díaz-Rodríguez et al., 2021), lo cual resalta la importancia de continuar con la búsqueda de microorganismos con la capacidad de adaptación y con las actividades requeridas para fines o cultivos específicos.

Debido a las actividades de importancia ecológica exhibidas por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre distintos cultivos, el uso de inoculantes microbianos representa una solución potencial para reducir el impacto negativo de los agroquímicos sobre la productividad del suelo.

2.10 Uso y comercialización de inoculantes

Los inoculantes microbianos han ganado mayor atención y han escalado en el mercado agrícola (Santos et al., 2019). El mercado global de inoculantes está creciendo en una tasa del 10% anual (Nosheen, 2021), siendo América del Norte el mayor productor y consumidor con una participación aproximada del 28% en el mercado mundial en 2017 (Mordor Intelligence, 2021). Sin embargo, el uso de la mayoría de inoculantes microbianos se limita a cultivos de cereales y

granos, entre ellos trigo, maíz, cebada y arroz, de los cuales, el 79% pertenecen a Rizobios (fijadores simbióticos de nitrógeno), mientras los microorganismos solubilizadores de fosfato constituyen aproximadamente el 15% y el resto a productos micorrízicos (Owen et al., 2015). Actualmente, el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI, por sus siglas en inglés), encargado de determinar los insumos permitidos para su uso en la producción agrícola y procesamiento de alimentos orgánicos, enumera 241 productos en la categoría de 'inoculantes microbianos' y 245 productos en la categoría 'productos microbianos', como fertilizantes para cultivos y ayuda a la producción y para enmiendas del suelo (OMRI, 2021). En México, la producción actual de biofertilizantes se realiza por pequeñas empresas, instituciones de educación e investigación y por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), apoyada por el gobierno federal y/o por gobiernos estatales (Grageda-Cabrera et al., 2012). Los productos a base de bacterias pertenecen principalmente al género *Bacillus* spp. y *Azospirillum* spp., según el Listado de Materias publicado en *Agroquímicos de México* por la revista Terralia, en 2017. En 2020, el mercado enfocado a la agricultura sostenible representó únicamente el 3% aproximado del mercado de agricultura convencional.

No obstante, la comercialización y aplicación a gran escala ha tenido serias dificultades, principalmente por problemas de promoción y distribución (Grageda-Cabrera et al., 2012). En primer lugar, es difícil comprobar la eficacia de los biofertilizantes comerciales, ya que, aunque afirman incrementos en los rendimientos, en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos de acción responsables de dichos efectos (Owen et al., 2015). Por otro lado, existe una evidente falta de pruebas de campo, ya que la mayoría de las investigaciones se establecen en ensayos de macetas en laboratorio en condiciones alejadas de las prácticas agronómicas reales, generando resultados inconsistentes cuando se escalan, debido a la complejidad del agroecosistema (Emmanuel & Babalola, 2020; Gamalero et al., 2022). Consecuentemente, la transferencia exitosa de inoculantes microbianos del laboratorio al campo sigue siendo un desafío (Saad et al., 2020) y, aun cuando se determinó el potencial de los microorganismos en ensayos *in vitro*, es necesario evaluar su desempeño e identificar sus beneficios sobre la productividad de los cultivos para promover su utilización en la práctica agrícola.

3. Justificación

La búsqueda de técnicas de agricultura con enfoque sustentable es un tema de actualidad y se ha demostrado la capacidad de diversos microorganismos para estimular el crecimiento, desarrollo y productividad de cultivos en distintos sistemas agrícolas. El cultivo de jitomate en invernadero representa una estrategia factible para lograr rendimientos sostenibles en términos de la seguridad alimentaria futura. No obstante, la aplicación exógena de fertilizantes constituye una de las principales causas de deterioro ambiental debido a la pérdida de elementos nutricionales antes de su absorción por las plantas. Aunado al reciente incremento desmedido en los costos de insumos agrícolas, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal supone una alternativa viable para optimizar el uso de fertilizantes inorgánicos, puesto que permiten la reducción parcial en su aplicación manteniendo rendimientos comparables. Sin embargo, pese a la gran cantidad de investigaciones científicas sobre potenciales microorganismos promotores del crecimiento vegetal, su presencia en el mercado agrícola sigue siendo reducido en comparación con los productos de origen sintético debido a distintos factores, donde destaca la obtención de resultados inconsistentes en condiciones controladas de laboratorio y cuando se aplican a un sistema convencional, lo cual constituye una limitante para su uso. Por lo tanto, es fundamental evaluar su impacto en un cultivo de interés comercial, donde los microorganismos están expuestos a factores bióticos y abióticos y a la práctica tradicional de cultivo, lo cual permita sostener su utilidad en la reducción de fertilizantes y puedan ser empleadas en nuevas estrategias de producción agrícola.

4. Hipótesis

La inoculación de *Pseudomonas* spp. permite reducir un 50% la aplicación de nitrógeno, fósforo y calcio en la producción de jitomate en invernadero, sin comprometer el rendimiento y calidad del fruto.

5. Objetivos

General

Evaluar el efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. en el rendimiento y calidad de fruto de jitomate cultivado en invernadero con dosis reducida al 50% de nitrógeno, fósforo y calcio.

Específicos

1.- Determinar la capacidad *in vitro* de *Pseudomonas* spp. para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, solubilizar calcio y producir ácido indol-3-acético.

2.- Analizar el efecto de *Pseudomonas* spp. en distintas etapas fenológicas del cultivo de jitomate bajo un régimen reducido de fertilizantes y su impacto en el rendimiento de fruto.

3.- Comprobar la persistencia de *Pseudomonas* spp. en la rizósfera de jitomate al final del ciclo de cultivo.

6. Materiales y métodos

6.1 Localización

La metodología consistió en dos etapas, la primera etapa se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Vegetal ubicado en las instalaciones del Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán (CIDAM), ubicado en Antigua Carretera a Pátzcuaro km. 8, s/n, C. P. 58341 Morelia, Michoacán, donde se aislaron, caracterizaron y seleccionaron rizobacterias con potencial para promover el crecimiento vegetal provenientes de cultivos de caña de azúcar y agave del estado de Michoacán. En la segunda etapa, se realizó un ensayo *in vivo* con el fin de evaluar las características de las bacterias asociadas con la promoción del crecimiento sobre el rendimiento y calidad del cultivo de jitomate, establecido en un invernadero perteneciente al Centro Bachillerato Tecnológico y Agropecuario N°7 (CBTA 7) con dirección en Lago de Pátzcuaro 23, Zona Sin Asignación de Nombre de Colonia, C. P. 58195 Morelia, Michoacán (Fig.6).

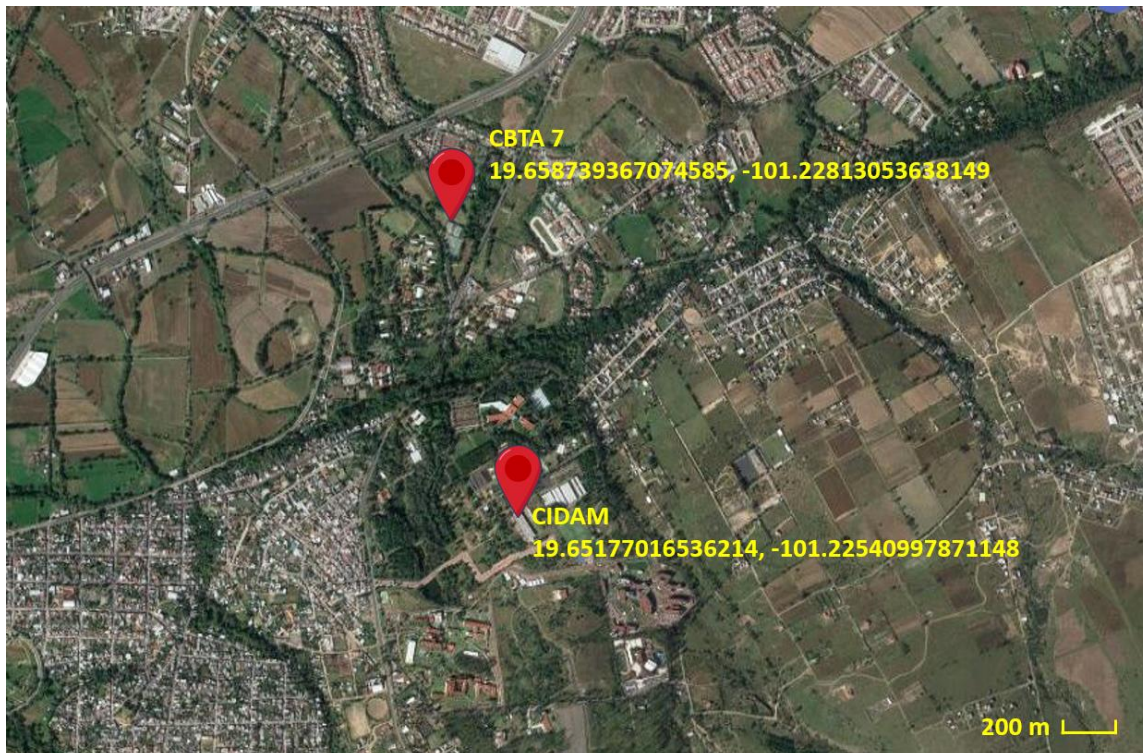


Figura 6. Mapa satelital de localización de sitios donde se realizó la investigación. Centro Nacional de Estudios Espaciales, 2022.

6.2 Aislamiento, caracterización y selección de bacterias promotoras de crecimiento

6.2.1 Aislamiento de rizobacterias

Anterior al proyecto de investigación, las bacterias se aislaron a partir de muestras de suelo rizosférico de diferentes cultivos de interés comercial en el estado de Michoacán. Para el muestreo, se tomaron aproximadamente 500 g de suelo del área de las raíces, se colocaron en bolsas plásticas herméticas y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento. Se pesaron 10 g de la muestra y se colocaron en 90 mL de solución amortiguadora de fosfatos estéril (Gerhardt, 1994) (Anexo 1) con agitación constante a 150 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-6} , se tomaron 30 μL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se sembraron por triplicado en Agar nutritivo (Anexo 2) y Agar Soya Trypticaseína (Anexo 3) mediante la técnica de extensión superficial en placa. Se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h revisando constantemente, se seleccionaron las colonias que presentaron diferencias en su morfología y, finalmente, se sembraron por separado en placas de agar nutritivo para obtener un cultivo puro de los aislados bacterianos.

6.2.2 Conservación de aislados

Las bacterias aisladas se conservaron por congelación como parte de la colección de cepas del laboratorio y para su uso posterior. Para ello, se utilizaron 1.5 mL de caldo nutritivo con glicerol al 20% como agente crioprotector, se colocaron en tubos plásticos de microcentrífuga Eppendorf® de 2.0 mL y se llevaron a esterilización. Posteriormente, se recolectó la biomasa bacteriana de placas con 24 h de crecimiento, se mezclaron suavemente y se llevaron a una temperatura de -70°C . Para la reactivación de los aislados, se siguió el protocolo empleado por Corrales-Ramírez & Sánchez-Leal, (2005), en el cual, los microorganismos son reactivados en medio líquido previo a realizar la siembra en el medio sólido seleccionado para el microorganismo, con el fin de recuperar su integridad celular y su actividad enzimática (Mukamolova et al., 2003).

6.2.3 Identificación de características asociadas a la promoción del crecimiento vegetal.

Los aislados utilizados en la investigación, con claves C1-013, C1-014, C1-015, C5-030 y ACJ-014, se enviaron para su identificación mediante técnicas de biología molecular a Colegio de

Postgraduados, *Campus* Montecillo para la extracción y purificación de ADN y su posterior envío a Macrogen. Estas cepas se seleccionaron con base en sus características de promoción del crecimiento, tales como la fijación de nitrógeno, la producción de ácido indol-3-acético y la solubilización de fosfato y calcio, las cuales se evaluaron mediante las siguientes metodologías:

6.2.4 Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno

La capacidad de las bacterias para fijar el nitrógeno atmosférico se evaluó utilizando el medio semisólido libre de nitrógeno NFb (Dobereiner et al., 1976) modificado por Cassán et al. (2010) (Anexo 4). Para ello se tomó un inóculo bacteriano de una placa de Petri con 24 horas de crecimiento y se sembró por punción en tubos de microcentrífuga Eppendorf® de 1.5 mL que contenían 1 mL del medio NFb. Finalmente se llevaron a incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por siete días.

La cuantificación del nitrógeno se realizó tomando como base la metodología propuesta por Lara-Mantilla (2007): se inocularon por triplicado 200 μL de una suspensión bacteriana previamente ajustada a 0.7 de D.O. (aproximadamente 1×10^9 UFC/mL) en tubos que contenían 3 mL de Caldo Extracto de Suelo al 10% (Anexo 5) y se llevaron a incubación con agitación constante de 100 rpm durante 72 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min y se agregaron 10 mL de KCl 2M. Se llevaron a agitación durante una hora y se dejó en reposo por una hora adicional. Seguido, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. La cuantificación del nitrógeno se llevó a cabo de forma indirecta al determinar la concentración del ion amonio con la técnica colorimétrica de Berthelot (Weatherburn, 1967). Para ello, se adicionaron 0.4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%, 0.4 mL de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 1 mL de solución oxidante (20.0 g citrato de sodio, 1.0 g de hidróxido de sodio y 1.0 mL de hipoclorito de sodio 1,5 N en 100 mL de H₂O) a 10 mL de muestra. Los tubos se agitaron por un minuto y se dejaron en reposo por una hora. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm. Como blancos, se utilizaron muestras de Caldo Extracto de Suelo sin inocular, a las cuales se les determinó la concentración del ion amonio siguiendo la misma metodología. Las concentraciones de nitrógeno fijado como amonio se calcularon en una curva estándar de diluciones sucesivas de una solución de cloruro de amonio (Anexo 6).

6.2.5 Evaluación de la producción de auxinas

La producción de ácido indol-3-acético se evaluó cualitativamente como la producción general de indoles utilizando la metodología empleada por González-Mancilla et al. (2017) como método de referencia. Las bacterias se crecieron en Caldo Soya Trypticaseína suplementado con 200 mg/L de L-triptófano y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96 h. Posteriormente, se centrifugó 1 mL de la suspensión bacteriana a 5000 rpm por 20 minutos, se tomaron 150 μL del cultivo y se agregaron a un pozo de microplaca de 96 pocillos junto con 300 μL de reactivo Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1994) (Anexo 7). Finalmente se incubaron en oscuridad por 30 min. Para la cuantificación específica de AIA, se inocularon 200 μL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.7 de D.O. en 0.5 L de Caldo Soya Trypticaseína suplementado con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triptófano, se incubó durante 96 h (Bharucha et al., 2013). La cuantificación de la hormona se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) de acuerdo con la metodología propuesta por Contreras-Cornejo et al. (2009). Para ello, se centrifugó el cultivo de 96 h a 6000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se separó y se ajustó a $\text{pH } 5 \pm 0.02$ utilizando HCl 1 N. El AIA se extrajo del sobrenadante con el mismo volumen de acetato de etilo, se evaporó a sequedad y se diluyó en 3 mL de acetato de etilo grado HPLC. Posteriormente, se secó bajo corriente de gas nitrógeno y se diluyó en 2 mL de cloruro de acetilo en metanol (1:4), se sonicó por 15 min y se incubó a 75°C por 1 h. La muestra se atemperó a 30°C , se secó bajo corriente de gas nitrógeno y se agregaron 1 mL de diclorometano y 1.5 mL de anhídrido acético. Se incubó a 75°C por 1 h y se llevaron nuevamente a sequedad en corriente de gas nitrógeno. Finalmente, el AIA derivado se redisolvió en 100 μL de acetato de etilo y se inyectó 1 μL en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La cuantificación de AIA se realizó mediante una curva de calibración de AIA estándar derivado bajo las mismas condiciones, usando el área debajo de cada pico (Anexo 8).

6.2.6 Determinación de la actividad solubilizadora de fósforo y calcio

La actividad solubilizadora de fosfatos por parte de las bacterias se determinó utilizando el medio de crecimiento de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP, por sus siglas en inglés) (Nautiyal, 1999), el cual contiene fosfato tricálcico insoluble como fuente de fósforo (Anexo 9), mientras que para la actividad solubilizadora de calcio se empleó el medio Pikovskaya modificado por Paguay & Vasco (2013), que contiene carbonato de calcio insoluble (Anexo 10). Las bacterias se sembraron por punción sobre el medio sólido y se incubaron a 28°C durante 14

días. La solubilización efectuada por las bacterias se manifestó por la aparición de un halo claro alrededor de la colonia, el cual se describió mediante el índice de solubilización (IS) empleando la siguiente ecuación (Edi-Premono et al., 1996):

$$\text{Índice de solubilización (IS)} = \frac{\text{área de la colonia} + \text{área de halo}}{\text{área de la colonia}}$$

La cuantificación del fósforo solubilizado por las bacterias en forma de ortofosfatos, se llevó a cabo siguiendo la metodología de Rodríguez-Gómez et al. (2013): se inocularon 200 µL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.7 de D.O. en 50 mL del medio de cultivo NBRIP contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agitaron a 150 rpm durante 7 días. Después del periodo de tiempo, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min para separar la biomasa y el sobrenadante se utilizó para determinar la cuantificación mediante el método azul de fosfomolibdeno (Murphy & Riley, 1962), para lo cual, se tomaron 4 mL del sobrenadante y se adicionó 1 mL de la mezcla de reactivos que se describen en el Anexo 11. Los tubos con el analito se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y la cuantificación se determinó midiendo la absorbancia a 882 nm del color azul desarrollado. Los cálculos se realizaron mediante una curva estándar con diluciones sucesivas de una solución de KH_2PO_4 (Anexo 12).

La cuantificación de calcio solubilizado por actividad bacteriana a partir de carbonato de calcio se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica. Para la preparación de las muestras, la suspensión bacteriana se ajustó a 0.7 de D.O. y se inocularon 200 µL en 50 mL de medio líquido Pikovskaya modificado y se incubaron por 7 días. Posteriormente se filtraron al vacío con membrana de 0.4 µm y se efectuaron las diluciones correspondientes para el análisis. Las concentraciones de calcio libre se calcularon mediante una curva estándar con diluciones sucesivas de carbonato de calcio.

6.2.7 Pruebas de compatibilidad de bacterias para diseño de consorcio

Las bacterias C1-013, C1-014, C1-015, C5-030 y ACJ-014 se inocularon formando líneas perpendiculares sobre agar nutritivo, de tal forma que cada una de las cepas estuvo en contacto directo con las cuatro restantes (Fig. 7). El consorcio bacteriano se preparó adicionando a un

matraz estéril el mismo volumen de cada suspensión bacteriana que no presentó antagonismo, en una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL.

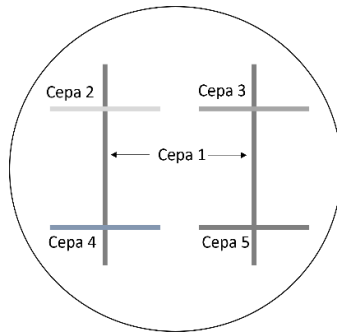


Figura 7. Esquema de inoculación de bacterias C1-013, C1-014, C1-015, C5-030 y ACJ-014 para evaluación de antagonismo.

6.2.8 Efecto de *Pseudomonas* spp. en la germinación y vigor de semillas de jitomate

Las semillas se desinfectaron realizando cinco lavados consecutivos con agua destilada estéril, seguidos por inmersión en hipoclorito de sodio al 5.2% por 15 minutos e inmersión en una solución de etanol al 70% durante 3 minutos. Finalmente, se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril y se dejaron escurrir en condiciones de esterilidad. Las semillas se inocularon colocándolas en un matraz Erlenmeyer conteniendo 100 mL de la suspensión bacteriana ajustada a 0.7 de D.O. (1×10^9 UFC/mL, aproximadamente) y se pusieron en agitación constante a 100 rpm durante 1 hora, mientras que los testigos se pusieron en agitación en caldo nutritivo estéril. En primer lugar, se determinó el porcentaje de germinación, en placa de acuerdo con lo descrito por Días-Vargas et al. (2001). Se colocó una capa de algodón estéril sobre las cajas de Petri y se humedeció con agua destilada estéril. En cada caja se colocaron por triplicado 20 semillas previamente desinfectadas e inoculadas, se sellaron con papel Parafilm® y se dejaron en la oscuridad a temperatura ambiente. A los 10 días se reportó el porcentaje de semillas germinadas, tomando como criterio la emergencia de la radícula. Adicionalmente, se midió la radícula y el hipocótilo de un lote de 30 semillas por bacteria y se calculó el índice de vigor mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de vigor (IV)} = (M_{\text{longitud de radícula}} + M_{\text{longitud de hipocotilo}}) \times PG$$

Donde: M es la media y PG el porcentaje de germinación.

6.2.9 Evaluación de *Pseudomonas* spp. en el desarrollo de la raíz de plántulas de jitomate en la etapa inicial de crecimiento

Se colocaron semillas de jitomate previamente desinfectadas e inoculadas en una bandeja de germinación con peat moss durante 21 días. Posteriormente, se retiraron de la bandeja, se lavó el excedente de sustrato y se midió la longitud principal, se cuantificó el número de raíces laterales y se calculó la densidad de raíces dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria.

6.3 Evaluación del potencial de las bacterias sobre el rendimiento y calidad de fruto de jitomate en condiciones de invernadero

6.3.1 Diseño experimental

El diseño experimental estuvo constituido por ocho tratamientos (Cuadro 1) de siete repeticiones, donde cada planta fue una unidad experimental y se colocaron en un invernadero en un diseño completamente al azar. Como parte de los tratamientos, se empleó la Solución Nutritiva Steiner al 50% de nitrógeno, fósforo y calcio (SNS^{50NPCa}), los demás macro y micronutrientes se aplicaron completos, a excepción del testigo relativo, el cual se trató de forma tradicional y, por tanto, se aplicó la solución al 100% (SNS^{100NPCa}) (Anexo 13).

Cuadro 1. Tratamientos en invernadero

No. de tratamiento	Descripción
1	Testigo Absoluto + SNS ^{50NPCa}
2	Testigo Relativo + SNS ^{100NPCa}
3	Cepa 1 + SNS ^{50NPCa}
4	Cepa 2 + SNS ^{50NPCa}
5	Cepa 3 + SNS ^{50NPCa}
6	Cepa 4 + SNS ^{50NPCa}
7	Cepa 5 + SNS ^{50NPCa}
8	Consorcio de las 5 cepas + SNS ^{50NPCa}

6.3.2 Manejo de cultivo en invernadero

Se desinfectaron e inocularon semillas de híbrido comercial tipo Saladette El Cid F1, adquiridas de la casa comercial Semillas Harris Moran Mexicana S.A. de C.V. Posteriormente se sembraron en bandejas de poliestireno de 200 cavidades en sustrato Peat moss previamente acondicionado. Se colocaron en oscuridad hasta la emergencia de las plántulas y, posteriormente, se colocaron en una zona con luz natural aplicando riego cada 24 horas. Las plantas se trasladaron a bolsas de polietileno de color negro de 40 x 40 cm con sustrato compuesto de tezontle y suelo (1:1) a los 40 días después de la germinación, cuando las plantas presentaron de 4 a 5 hojas verdaderas. Las bolsas se colocaron en doble hilera con una separación de 30 cm aproximadamente. Dado que el suelo no se esterilizó, se aplicó Bankit 25SC (Azoxytrobin) a una dosis de 400 mL/ ha como control fitosanitario preventivo contra hongos fitopatógenos. Desde el trasplante y durante el ciclo del cultivo, los nutrientes se aplicaron a través de la solución nutritiva de Steiner (1961), en la concentración correspondiente a cada tratamiento, aplicando aproximadamente 1 L de solución al día distribuidos en ocho riegos/minuto por un sistema de goteo.

Cada planta se inoculó en tres ocasiones a lo largo del ciclo del cultivo con 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente a cada tratamiento ajustada a 1×10^9 UFC/mL, aproximadamente, distribuyendo el inóculo alrededor de la base del tallo hacia la zona radicular. Las plantas pertenecientes al testigo absoluto se inocularon con 1 mL de medio de cultivo estéril y el testigo relativo no recibió aplicación. La primera inoculación se llevó a cabo a los diez días después del trasplante, cuando las plantas mostraron signos de adaptación en el sustrato (descarte de síntomas de marchitez y formación de primordios foliares y radiculares), es decir, a los 50 dds, que corresponden a la fase de crecimiento inicial y el comienzo del crecimiento vegetativo. La segunda se realizó a los 70 dds, cuando aparecieron los primeros racimos florales y la tercera inoculación se realizó a los 110 dds, en el crecimiento de frutos y antes del inicio de la madurez.

El tutorado se realizó guiando la planta mediante una rafia de polipropileno, podando los brotes axilares para permitir únicamente el crecimiento del tallo principal, dado que la variedad es de crecimiento indeterminado, éste se detuvo al quinto racimo, cortando el brote apical. La polinización se llevó a cabo manualmente, moviendo ligeramente las rafias del tutorado cuando se formaron los primeros racimos florales. El deshoje se realizó cortando las hojas inferiores al racimo formado, para facilitar la iluminación, la ventilación y evitar el exceso de humedad.

6.3.3 Medición de variables respuesta en planta.

A los 40, 70, 90 y 120 días después de la siembra, se midió la altura de planta, el diámetro del tallo y el contenido de nitrógeno en hoja como variables de la parte vegetativa de cada unidad experimental (Fig. 8). La altura se midió con un flexómetro desde la base del tallo hasta el último primordio foliar formado; el diámetro del tallo se midió en la base del tallo utilizando un vernier digital y el contenido de nitrógeno en hoja se midió indirectamente como unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development), utilizando un SPAD-502 y, posteriormente, se calculó el porcentaje de nitrógeno en la hoja mediante la siguiente ecuación (Aguilar et al., 1998):

$$\%N = \frac{SPAD + 4.26}{16.15}$$



Figura 8. Medición de variables en planta. A) Medición de unidades SPAD; B) Medición de altura de la planta con flexómetro y C) Medición de diámetro del tallo con vernier digital.

Para las unidades SPAD, se realizaron tres mediciones en cada unidad experimental: i) en la primera hoja formada, ii) en la hoja intermedia y iii) en la última hoja formada. La medición se llevó a cabo en una zona del limbo cercana a la nervadura principal del foliolo central de cada hoja (Fig. 9).

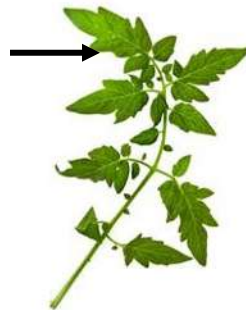


Figura 9. Zona de medición de unidades SPAD en hoja de jitomate.

6.3.4 Parámetros de calidad sensorial y fisicoquímica de los frutos.

Los frutos se cosecharon cuando presentaron el Estadio 6 de madurez, según la guía de madurez de la FAO basado en el color (más del 90% de la superficie color rojo) (FAO, 2003) (Fig. 10). Para los análisis posteriores, se seleccionaron aquellos frutos con calidad comercial según la norma mexicana NMX-FF-031-1997- SCFI Productos Alimenticios No Industrializados Para Consumo Humano - Hortalizas Frescas - Tomate - (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – Especificaciones, la cual indica que su diámetro ecuatorial debe ser mayor a 38 mm y se calculó el porcentaje por planta tomando en cuenta todos los frutos cosechados. Se evaluó la firmeza realizando dos punciones por fruto, en posiciones opuestas situadas en la zona ecuatorial, utilizando un texturómetro digital y los valores se reportaron en Newtons. Se midió el peso individual en una balanza analítica y se reportó en gramos.



Figura 10. Grado de madurez de jitomate con base en la coloración del fruto. Grado 1: el 100% de la superficie del fruto es verde; Grado 2: aparición de otro color en menos de 10% de la superficie; Grado 3: entre el 10 al 30% de la superficie presenta coloración amarillo pálido, rosado o rojo; Grado 4: el 30 – 60% de la superficie presenta color rosado o rojo; Grado 5: el 60 – 90% de la superficie es color rojo y Grado 6: más del 90% de la superficie es color rojo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2003.

En total, se realizaron cinco cosechas en el ciclo de cultivo. De los frutos obtenidos por tratamiento en cada cosecha, se realizó un muestreo aleatorio tomando dos frutos de cada unidad experimental para formar una muestra compuesta de 14 frutos, dando un total de cinco muestras compuestas por tratamiento al final del tiempo de recolección de frutos. Los frutos se

mezclaron con un homogeneizador ULTRA-TURRAX para la obtención de puré. Los grados brix se determinaron como el contenido de sólidos solubles totales (SST) en el jugo de jitomate obtenido del puré previamente filtrado con una gasa y colocando una gota en un refractómetro. La acidez titulable se determinó con la metodología propuesta por Nielsen (2003). Para ello, se tomaron 10 mL del puré, se aforaron a 25 mL y se neutralizaron con NaOH 0.1 N mediante un potenciómetro hasta pH 8.2. La acidez se calculó con la siguiente ecuación, expresada como porcentaje (%) de ácido cítrico.

$$\% \text{ acidez} = \frac{((N_{NaOH} \left(\frac{meq}{mL}\right) (V_{NaOH}(mL)) (meq_{\text{ác. cítrico}}(0.064 \frac{g}{meq})))}{V_{\text{jugo}}(mL)} \times 100$$

La cuantificación de licopeno se realizó con base a la metodología empleada por Gawad et al. (2014). Para ello, se pesaron 0.1 g del puré de tomate y se colocaron en tubos de vidrio cubiertos con aluminio. Después, el licopeno se extrajo agregando 8 mL de una mezcla de solventes hexano: etanol: acetona en proporción 2:1:1. Se agitaron por 10 minutos en un agitador orbital y se agregó 1 mL de agua desionizada seguido de agitación en vórtex para inducir la separación de fases. Se dejó reposar la muestra durante 10 minutos, y se recogió la fracción superior, la cual contiene al licopeno extraído en hexano. Se midió la absorbancia de la solución colorida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 503 nm, utilizando hexano como blanco. Finalmente, la concentración de licopeno se estimó utilizando el coeficiente de extinción molar mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Licopeno} \left(\frac{mg}{kg}\right) = \frac{(A_{503}) (537) (10) (0.55)}{(0.1) (172)}$$

Donde:

A_{503} , es la absorbancia obtenida de la capa superior;

537, es el peso molecular del licopeno;

10, es el volumen (mL) agregado de la mezcla de disolventes HEA

0.55, es el volumen de la capa superior;

0.1, es el peso de la muestra en gramos y

172, es el coeficiente de extinción del licopeno en hexano.

Cada análisis se realizó por triplicado, finalmente, se calculó el promedio de los valores obtenidos en las 5 muestras compuestas.

6.3.5 Rendimiento por planta

Se determinó el peso de los frutos obtenidos por planta mediante una balanza analítica y se calculó el rendimiento como kilogramos por planta al quinto racimo.

6.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías, además, una prueba post hoc de Tukey de comparación de medias para determinar diferencia significativa entre tratamientos, con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Los cálculos se realizarán con el paquete estadístico de SAS, 2012 (Statistical Analysis System).

7. Resultados y Discusión

7.1 Evaluación de rasgos asociados a la promoción del crecimiento de *Pseudomonas* spp.

A partir de la colección de bacterias del laboratorio de Nutrición Vegetal del CIDAM con actividades de importancia agronómica, se seleccionaron cinco aislados pertenecientes a la población microbiana de rizósfera de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) y *Agave* sp, por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato y calcio y producir AIA, cuya actividad se evaluó mediante pruebas cualitativas y cuantitativas. Las rizobacterias se identificaron molecularmente por la empresa Macrigen como especies del género *Pseudomonas* y se identificaron como *Pseudomonas* sp. C13, *Pseudomonas* sp. C14, *Pseudomonas* sp. C15, *Pseudomonas fluorescens* C30 y *Pseudomonas putida* ACJ14.

7.1.1 Actividad de *Pseudomonas* spp. sobre la nutrición vegetal

Las cinco cepas fueron positivas para la fijación de nitrógeno atmosférico (Fig. 11). Las cepas pudieron crecer en el medio semisólido libre de nitrógeno (Fig. 11 A), el cual se colocó en tubos de microcentrífuga a un 75% de su capacidad para generar el ambiente reducido de oxígeno. En un principio, la consistencia semisólida permite a las bacterias el comienzo de su multiplicación y, cuando se limita la concentración de oxígeno disuelto en el medio, se establecen en la superficie donde encuentran el oxígeno en concentración necesaria para llevar a cabo la respiración sin comprometer la estabilidad de la enzima nitrogenasa sensible a oxígeno (Baldani et al., 2014). Se observó el establecimiento de *Pseudomonas* spp., en la superficie del medio, además, generaron un cambio de coloración en el mismo. Este viraje es debido a la presencia del indicador de pH azul de bromotimol, el cual es color amarillo en condiciones ácidas y cambia a azul por el incremento del pH generado por los productos del proceso de fijación, por tanto, este cambio es considerado positivo a la fijación de nitrógeno (Kuan et al., 2016). La cuantificación del nitrógeno fijado en forma del ion amonio se llevó a cabo mediante la reacción de Berthelot, en la cual, el amonio de la muestra reacciona con el hipoclorito en condiciones alcalinas debido a la adición de hidróxido de sodio para formar monocloramina, quien, a su vez, reacciona con el fenol dando lugar al indofenol, en una reacción catalizada por nitroprusiato de sodio (Kimble et al., 2006). El indofenol confiere una coloración azul, la cual es medida espectrofotométricamente y cuya absorbancia es proporcional a la concentración de amonio. En la Figura 9 B se presentan los valores promedio de tres repeticiones obtenidos de la reacción de

Berthelot de las cinco bacterias evaluadas, calculadas a partir de una curva de calibración de cloruro de amonio. Se utilizó *Azospirillum brasilense* como control positivo a la reacción, puesto que se ha descrito como uno de los principales géneros fijadores de nitrógeno (Zaidi et al., 2017). A partir de *A. brasilense* se cuantificaron 12.7 µg/mL de amonio (Fig. 11 B), valor que superaron las cinco cepas de *Pseudomonas* spp. ya que la cepa C13 fijó un total de 15 µg/mL de amonio, *P. fluorescens* 20 µg/mL y *Pseudomonas* sp. C15, junto con *P. putida* ACJ14, lograron una actividad fijadora similar, al presentar una concentración cercana a 30 µg/mL. *Pseudomonas* sp. C14 presentó el valor mayor, con 35 µg/mL, demostrando la presencia del complejo enzimático nitrogenasa en estos microorganismos. Además del género *Azospirillum* como fijador de nitrógeno, se han reportado otros géneros de bacterias rizosféricas con el mecanismo para llevar a cabo el proceso de fijación. Se ha destacado la importancia de especies de *Azotobacter* spp. (Aasfar et al., 2021), principalmente *A. chroococum*, *A. beijerinckii*, *A. vinelandii* y *A. lipoferum* (Sharma, 2021). Así como *Burkholderia* spp. (Bahulikar et al., 2014), *Acetobacter* spp. y *Gluconacetobacter* spp. (Gupta et al., 2015).

La mayoría de especies de *Pseudomonas* spp. carecen de la presencia de los genes codificantes necesarios para el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Yan et al., 2008). Sin embargo, Fox et al. (2016), reportaron a la bacteria *Pseudomonas protegens* como fijadora de nitrógeno, mientras que Wang et al. (2017), informaron la capacidad de *Pseudomonas stutzeri* A1501 para llevar a cabo el proceso de fijación en condiciones microaerófilas y limitantes de nitrógeno. *P. stutzeri* ha sido la especie del género más estudiada en este sentido, Ke et al. (2018), demostraron una mejoría en el crecimiento de maíz y la disponibilidad de nitrógeno con la misma cepa, así como un aumento en la población de diazótrofos en la rizósfera. Li et al. (2017), informaron la presencia de *P. koreensis* y *P. entomophila* en la rizósfera de caña de azúcar capaces de fijar nitrógeno atmosférico al determinar la expresión del gen *nifH*. Anteriormente, se había determinado la capacidad de distintas variedades de caña de azúcar brasileñas para obtener hasta el 70% de su requerimiento de nitrógeno mediante este proceso.

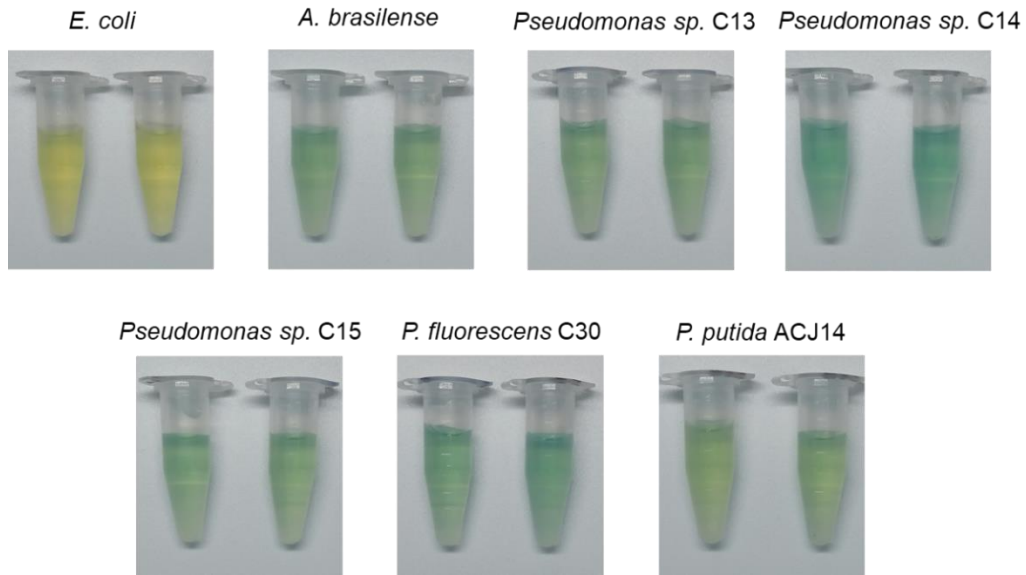
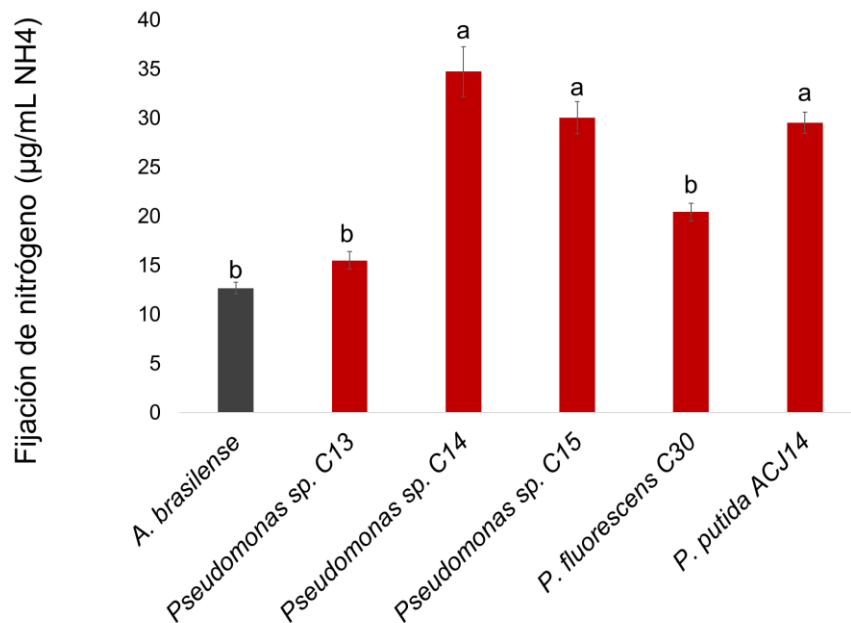
A**B**

Figura 11. Fijación biológica de nitrógeno *in vitro* por *Pseudomonas* spp. (A) Prueba cualitativa en medio semisólido libre de nitrógeno, el cual, en una reacción positiva, cambia de color amarillo a azul. (B) Cuantificación del ion amonio por la reacción de Berthelot. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estos datos concuerdan con nuestros resultados, al determinar la efectividad en el proceso de fijación biológica de nitrógeno por especies del género *Pseudomonas* spp. aisladas de caña de azúcar, por lo tanto, su uso puede representar una fuente segura y sostenible de este elemento, contribuyendo a la disminución de la dependencia de nitrógeno inorgánico, así como la disminución de energía necesaria para su producción (Mahmud et al., 2020), ya que se estima un aporte de hasta el 65% de este elemento a los sistemas de cultivo a través de la fijación biológica de nitrógeno (Kuan et al., 2016).

Por otro lado, las cepas mostraron capacidad para solubilizar fosfato y calcio de una fuente insoluble (Fig. 12 y 13). Cualitativamente, la actividad solubilizadora de fosfato de las *Pseudomonas* evaluadas se observó por la aparición de una zona clara alrededor de la colonia (Fig. 12 A). En este caso, presentaron un índice de solubilización de fosfato entre 1.59 y 5.59 (Fig. 12 B). En 2020, Pande et al., reportaron ocho cepas con un índice de solubilización que osciló de 1,77 a 4,88, identificadas como *Burkholderia cepacea*, una de las principales bacterias caracterizadas como solubilizadoras de fosfato y en un estudio en macetas y en campo, indujeron un aumento significativo en el crecimiento del maíz dulce, así como la productividad del grano, con lo cual, al obtener índices de solubilización similares, respalda nuestro propósito para ser probadas en planta. Se cuantificó una concentración de fosfato solubilizado en forma de ortofosfatos en un rango de 20 a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 12 C). Las bacterias *Pseudomonas* sp. C14 y *P. putida* ACJ14 presentaron los valores menores de solubilización, con un total de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que *Pseudomonas* sp. C13, *Pseudomonas* sp. C15 y *P. fluorescens* C30 presentaron valores cercanos a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con respecto a la solubilización de calcio, las cinco cepas presentaron halos de solubilización (Fig. 13 A) y se determinaron índices entre 1.88 y 4.49, el índice mayor correspondiente a la cepa C13 (Fig. 13 B). El análisis cuantitativo fue consistente a estos resultados, dado que la misma cepa presentó el mayor valor, con 583.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de calcio soluble. Sin embargo, la espectrometría de absorción atómica no detectó calcio soluble por *Pseudomonas* sp. C14 y C15 (Fig. 13 C). Para el caso de calcio no se encuentran reportes en la literatura de la solubilización empleando la fuente de carbonato de calcio, puesto que los ensayos realizados emplean como compuesto insoluble los fosfatos de calcio y no los carbonatos.

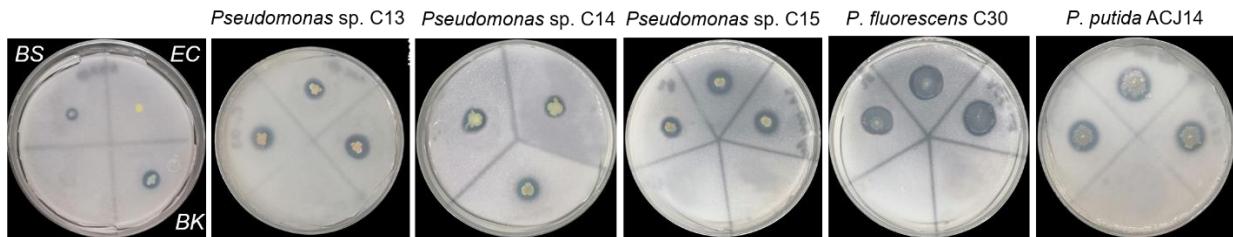
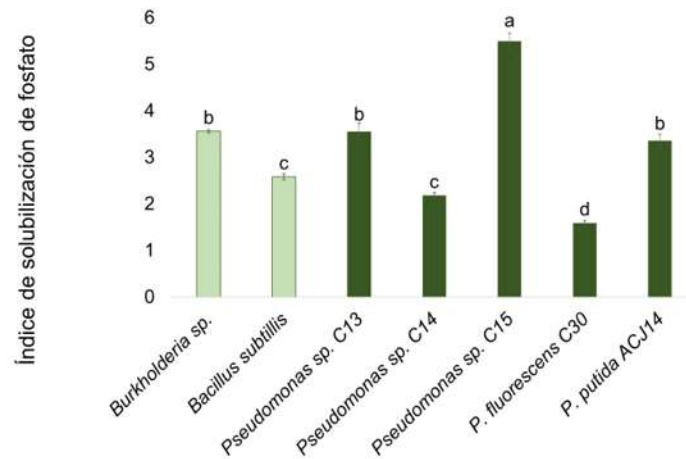
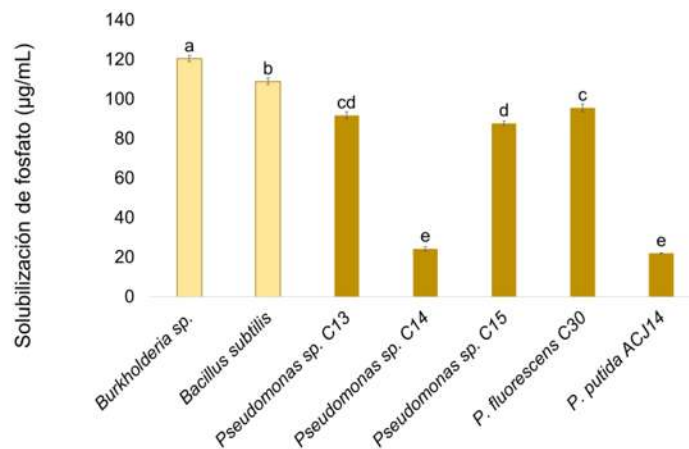
A**B****C**

Figura 12. Solubilización de fosfato *in vitro* por *Pseudomonas* spp. Halos de solubilización de fosfato en medio NBRIP. BS: *Bacillus subtilis*; EC: *E. coli* y BK: *Burkholderia* sp, se utilizaron como cepas control. B) Índices de solubilización de fosfato. C) Cuantificación del fosfato solubilizado como ortofosfatos por el método de azul de fosfomolibdeno. Cada prueba se realizó por triplicado. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

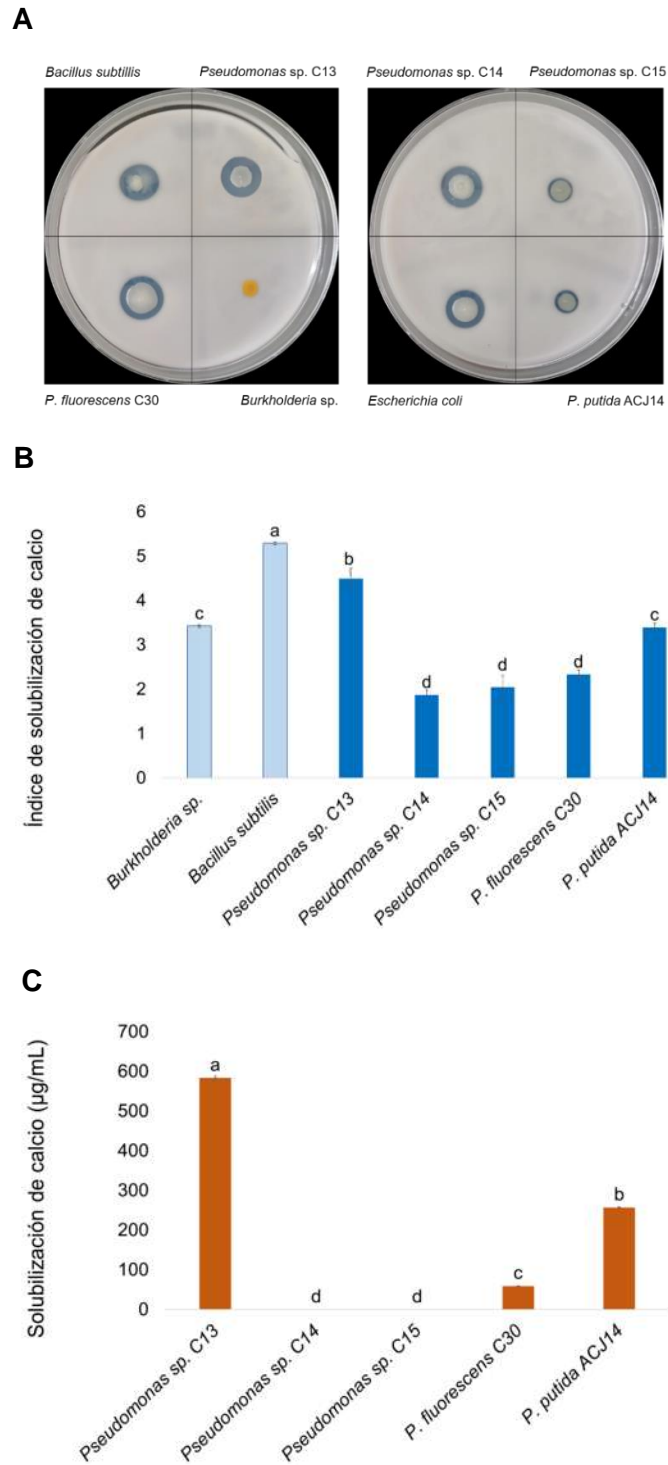


Figura 13. Solubilización de calcio *in vitro* por *Pseudomonas* spp. A) Halos de solubilización de calcio en medio Pikovskaya modificado con carbonato de calcio. B) Índices de solubilización de calcio. C) Cuantificación del calcio solubilizado por espectrometría de masa atómica. Cada prueba se realizó por

triplicado. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

El fósforo es uno de los elementos más importantes para lograr altos rendimientos en los cultivos. Sin embargo, el fósforo inorgánico en suelo representa una fracción mínima debido a la formación de compuestos insolubles (Alori et al., 2017). Por otro lado, la deficiencia de calcio es rara en la naturaleza, sin embargo, en horticultura se pueden producir limitaciones de este elemento debido a la capacidad de reacción con los iones fosfato del suelo, formando precipitados generalmente insolubles (White & Broadley, 2003), representando uno de los principales problemas en los suelos alcalinos. La solubilización de fosfato a través de la producción de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos más importantes de las bacterias promotoras del crecimiento (Khan et al., 2014). Además, se ha catalogado al género *Pseudomonas* spp. como uno de los principales productores de ácidos orgánicos responsables de la solubilización de fosfato tricálcico y fosfatos de roca (Vyas et al., 2009), por lo tanto, su aplicación mejora la disponibilidad de fosfato y calcio para la planta, como una práctica agrícola sostenible.

7.1.2 Biosíntesis de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas* spp.

Las cepas de *Pseudomonas* spp. presentaron la capacidad de producir auxinas. En primer lugar, se utilizó el reactivo de Salkowski propuesto por Glickmann & Dessaux, (1994) para identificar las bacterias productoras, donde el reactivo reacciona con el anillo indólico y es evidenciado por una coloración roja producto de una oxidación a partir del ácido sulfúrico. Sin embargo, los mismos autores demostraron que la reacción también puede ocurrir con compuestos como indol acetamida y triptamina, los cuales son intermediarios en la síntesis de ácido indol-3-acético dependiente de triptófano. Por lo tanto, la presencia de estos metabolitos en el medio podría interferir en la estimación real de la producción de AIA y se determinó como producción de indoles totales, lo cual, en un principio, permitió la selección de posibles bacterias productoras de este compuesto. La determinación específica de producción de ácido indol-3-acético, se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. *P. fluorescens* C30 exhibió la mayor eficiencia de producción (12680 $\mu\text{g/L}$), el resto de las cepas produjeron en un rango de 61.33 a 840.67 $\mu\text{g/L}$ (Cuadro 2). Contreras-Cornejo et al. (2009), reportaron la producción de AIA en concentraciones similares por el hongo *Trichoderma virens* y comprobaron su participación en el desarrollo de raíces laterales y aumento de biomasa en *Arabidopsis thaliana* en condiciones axénicas. Por otro lado, Gao et al. (2015), reportó la producción de 18.47

µg/mL de AIA por *Burkholderia* sp. 7016 y observaron aumentos significativos en la altura y peso de brotes, longitud y peso de las raíces y el diámetro del tallo en plantas de tomate en invernadero y el incremento en el rendimiento de tomate en campo, por tanto, la aplicación de bacterias productoras de AIA constituyen una alternativa ecológica en la agricultura sostenible por su papel en el desarrollo vegetal.

Cuadro 2. Producción de AIA por *Pseudomonas* spp.

Bacteria	Concentración AIA (µg/L)
<i>A. brasilense</i>	487.3 ± 70.7 b
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	61.3 ± 17.2 b
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	840.7 ± 5.8 b
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	122.5 ± 5.8 b
<i>P. fluorescens</i> C30	12680 ± 22.9 a
<i>P. putida</i> ACJ14	470.7 ± 13.7 b

7.2 Evaluación de antagonismo entre cepas de *Pseudomonas* spp.

El uso de inoculantes mixtos representa una mayor probabilidad de éxito para la promoción del crecimiento vegetal, debido a la combinación de diferentes mecanismos para lograr distintos efectos en la planta o por su capacidad de supervivencia al competir de forma más eficaz con la población y el ambiente de la rizósfera (Santos et al., 2019). En este estudio, se descartó el antagonismo entre las 5 cepas de *Pseudomonas* spp. al no observar inhibición en la siembra de interacción directa (Fig. 14), lo cual permitió emplear un consorcio para las pruebas posteriores en planta.

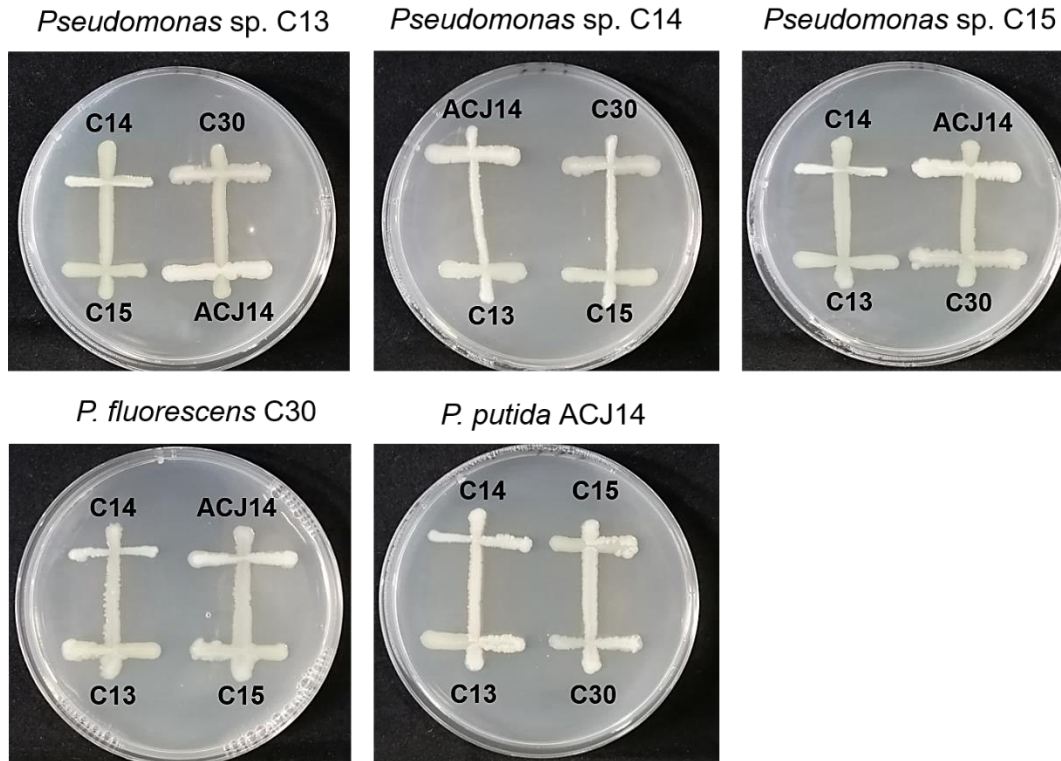


Figura 14. Evaluación de antagonismo entre cepas de *Pseudomonas* spp. Las líneas verticales de inóculo en cada placa corresponden a la bacteria mencionada en la parte superior de cada fotografía. Las líneas horizontales corresponden al resto de las cepas.

7.3 Efecto de *Pseudomonas* spp. sobre la germinación de semillas de jitomate e índice de vigor

La calidad de la semilla determina el rendimiento potencial de una planta después de la siembra (Finch-Savage & Bassel, 2015). Sin embargo, es muy común la pérdida de viabilidad por cierto grado de deterioro o envejecimiento celular, lo cual ha llevado a la búsqueda de métodos para proporcionar y mantener semillas de alto vigor y calidad (Xia et al., 2019), entre ellos, el recubrimiento de semillas antes de su siembra en suspensiones a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en un proceso llamado bacterización (Pandey & Gupta, 2020). Para examinar el efecto de la inoculación de las *Pseudomonas* spp. aisladas de caña de azúcar y agave sobre la germinación y vigor de las semillas de jitomate, se inocularon con suspensiones ajustadas a 1×10^9 UFC/mL, incluyendo un lote de semillas inmersas en caldo nutritivo como tratamiento control. Se colocaron en placas de Petri cubiertas con algodón (Fig. 15 A) y se calculó el porcentaje de semillas germinadas a los 7 días, tomando como criterio la emergencia de la radícula (Fig. 15 B). Se observó una baja viabilidad de las semillas empleadas en este estudio al

obtener un 70% de germinación en el tratamiento control, posiblemente atribuible al tiempo de almacenamiento. Bajo estas condiciones, se apreció un incremento del 8.5 al 18.5% en el porcentaje de germinación por la inoculación de *Pseudomonas* spp. pero sin diferencias significativas según el análisis estadístico (Cuadro 3). Pese a ello, el efecto positivo sobre la germinación muestra una tendencia creciente con respecto a la concentración de AIA, puesto que las bacterias con los niveles más altos de producción, como *P. fluorescens* C30 (12.6 µg/mL), *Pseudomonas* sp. C14 (0.67 µg/mL) y *P. putida* ACJ14 (0.47 µg/mL) generaron el mayor incremento. Caso contrario, *Pseudomonas* sp. C15 y *Pseudomonas* sp. C13 quienes produjeron las concentraciones más bajas de AIA, 0.12 µg/mL y 0.06 µg/mL, respectivamente, no ejercieron un efecto evidente.

La germinación de la semilla termina con la emergencia de la radícula tras la ruptura del episperma, una vez que se interrumpe el estado de latencia (Li et al., 2016). Dicho proceso está regulado por el equilibrio entre algunas hormonas vegetales, tales como el ácido abscísico quien induce el estado de latencia, inhibiendo la germinación, mientras las giberelinas realizan el efecto contrario (Shuai et al., 2017). El efecto de AIA sobre el desarrollo vegetal es dependiente de la dosis. Autores como Zhao en 2013, informaron un aumento en la tasa de germinación de semillas de abeto chino atribuible a auxinas en una concentración de hasta 17.5 µg/mL. Sin embargo, El-Mergawi & El-Wahed (2020), mostraron una disminución significativa en el porcentaje de germinación de semillas de maíz con concentraciones mayores a 43.8 µg/mL de AIA. Por lo tanto, la producción de AIA por las *Pseudomonas* evaluadas, sustenta la ventaja de su aplicación en el proceso de bacterización, con el fin de mejorar el porcentaje de germinación.

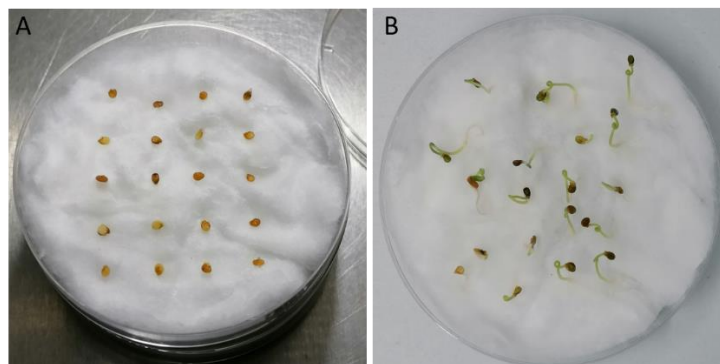


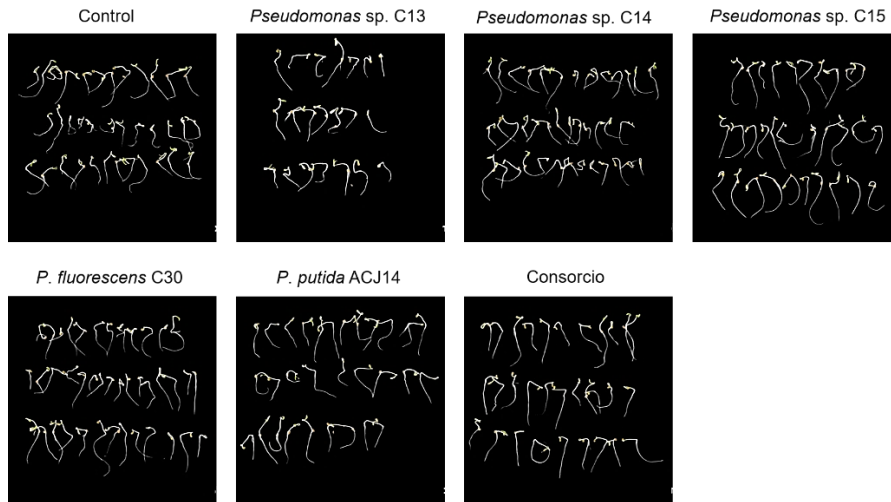
Figura 15. Germinación *in vitro* de semillas de jitomate inoculadas con *Pseudomonas* spp. A) Semillas de jitomate colocadas sobre cama de algodón estéril. B) Emergencia de la radícula de semillas de jitomate.

Cuadro 3. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate por inoculación de *Pseudomonas* spp.

Tratamiento	Germinación (%)
Control	70.0 ± 5.7
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	70.0 ± 5.0
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	83.3 ± 4.4
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	76.7 ± 1.6
<i>P. fluorescens</i> C30	81.7 ± 4.4
<i>P. putida</i> ACJ14	80.0 ± 5.0
Consortio	80.0 ± 2.88

Por otro lado, se determinó el índice de vigor a los 10 días posteriores a la inoculación, sumando la longitud de la radícula y el hipocótilo y multiplicándolo por el porcentaje de germinación. (Fig. 16). Todas las cepas de *Pseudomonas* spp. incrementaron estadísticamente el índice de vigor (Fig. 16 B), registrándose los valores más altos por *Pseudomonas* sp. C15., quien logró un incremento del 50% con respecto al control, seguido del consorcio con un incremento del 45%, lo cual podría indicar la influencia de las bacterias, particularmente en la emergencia de la plántula al estimular el alargamiento celular del eje embrionario (Li et al., 2016). Se han reportado cepas de *P. putida*, *P. aeruginosa* (Narendra et al., 2015) y *P. fluorescens* (Konappa et al., 2020) con la capacidad de mejorar el porcentaje de germinación y vigor de semillas de jitomate, atribuible a la producción mejorada de hormonas vegetales generando plántulas más vigorosas y con mayor capacidad para establecer el cultivo.

A



B

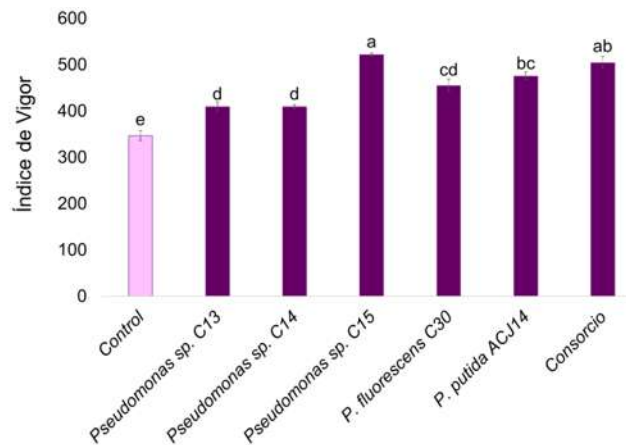


Figura 16. Índice de vigor de semillas de jitomate inoculadas con *Pseudomonas* spp. A) Radícula e hipocótilo de los tratamientos a los 10 días después de la inoculación. B) Índice de Vigor de semillas de jitomate inoculadas y no inoculadas. Cada prueba se realizó por triplicado, usando 10 semillas por repetición. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.4 Inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el sistema radicular de jitomate durante la etapa inicial de desarrollo

Desde hace algunos años, se han adaptado métodos de crecimiento *in vitro* para estudiar la interacción ente plantas y microorganismos, caracterizados por realizarse a microescala en

condiciones estériles y en condiciones ambientales optimizadas con respecto a factores tanto físicos como nutricionales, con el fin de conocer a detalle los mecanismos de funcionamiento y respuestas adaptativas (Pierik, 1990). Sin embargo, para una aplicación exitosa, también se deben considerar diversos aspectos del ambiente cuando la planta está en condiciones naturales (Wu et al., 2009). Por esta razón, se llevó a cabo un análisis preliminar del efecto de las bacterias sobre el sistema radicular de plántulas en las condiciones comúnmente utilizadas en el proceso de germinación, el cual incluye la siembra de la semilla desinfectada en sustrato no estéril en una bandeja de germinación y su exposición a luz solar natural y riego diario. Al no observar efectos inhibitorios por la inoculación de bacterias sobre la germinación de semilla de jitomate, se realizó su inmersión en suspensión bacteriana previa a la siembra en Peat moss. Pasados 21 días correspondientes a la etapa de desarrollo inicial del ciclo de jitomate, se retiraron del sustrato, se lavó la raíz y se cuantificó la longitud de la raíz principal (Fig. 17 A), el número de raíces laterales (Fig. 17 B) y se calculó la densidad de raíces dividiendo el número de raíces laterales por la longitud de la raíz primaria (Fig. 17 C). Las plantas sin inocular presentaron una longitud de ocho cm y un promedio de siete raíces laterales. La inoculación con *Pseudomonas* spp. no mostró un efecto significativo sobre el crecimiento de la raíz principal, a excepción de *P. fluorescens* C30. El número de raíces laterales incrementó de forma significativa por *Pseudomonas* sp. C13, *Pseudomonas* sp. C14 y *P. fluorescens* C30. De forma interesante, *Pseudomonas* sp. C14 incrementó de forma significativa el número de raíces laterales y acortó el crecimiento de la raíz principal, lo cual se observó por el incremento en la densidad de raíces, generando una arquitectura radicular característica del efecto generado por el ácido indol-3-acético (Spaepen et al., 2013). No obstante, la arquitectura radicular depende de diversos factores como la relación entre distintas fitohormonas (Sharma et al., 2021) y/o la disponibilidad de nutrientes al modificar de forma específica el patrón de raíces (López-Bucio, et al., 2003). Por lo tanto, es necesario realizar un análisis más profundo si se requiere conocer los factores específicos que están participando en la modificación del sistema radicular. Para términos de este proyecto, tales contribuciones sobre el sistema de raíces por la inoculación con *Pseudomonas* spp. sustentaron evaluar su efecto después del trasplante, ya que un sistema de raíces mejorado en etapas tempranas, representa una mayor probabilidad de éxito en el establecimiento del cultivo al favorecer la colonización y el establecimiento de la bacteria en la rizósfera de la planta (Stoll et al., 2021) y a la vez, confiere una mayor superficie de absorción de agua y nutrientes, así como un mayor potencial exploratorio en la etapa fenológica de mayor consumo de nutrientes (Bodale et al., 2021).

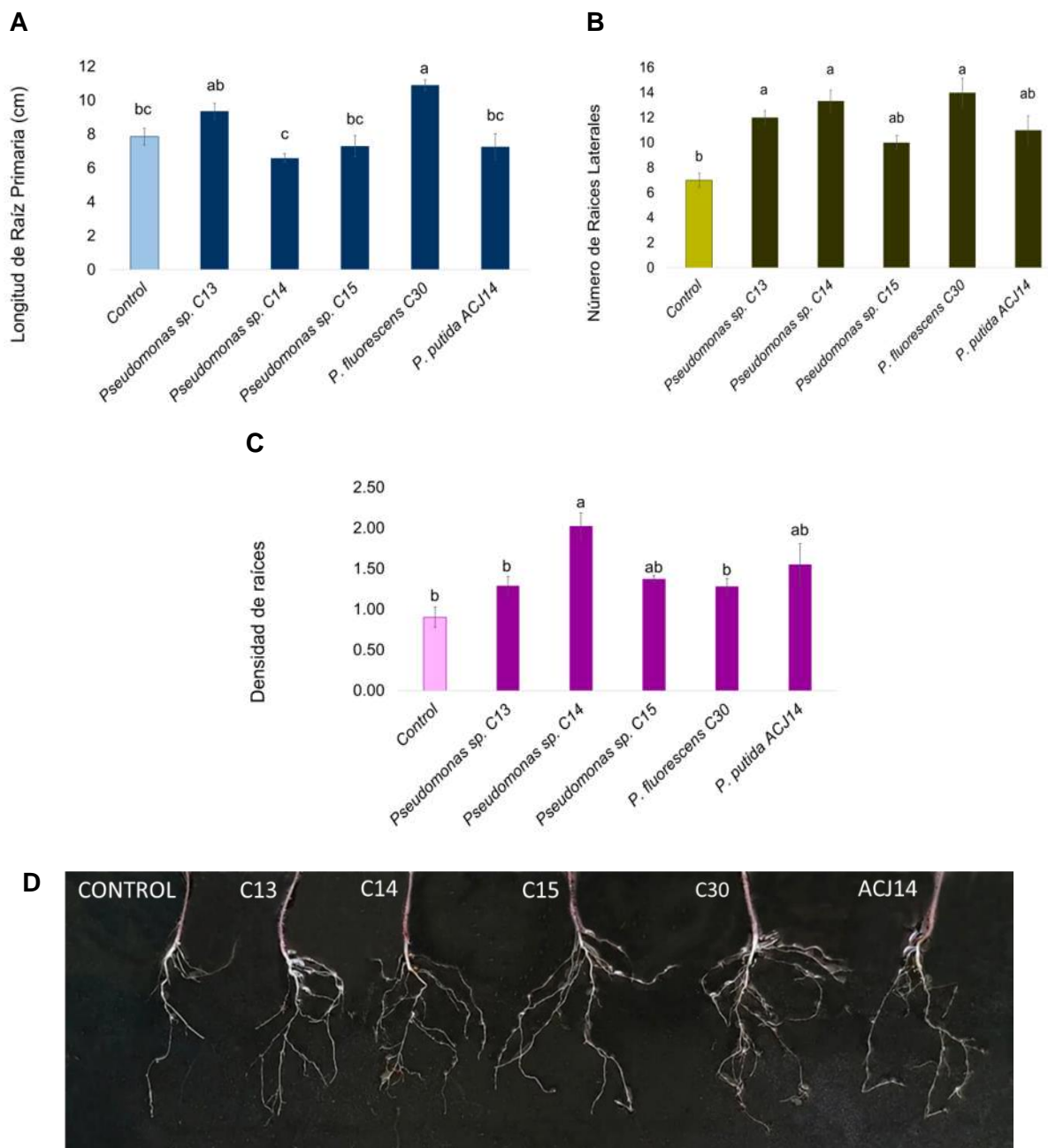


Figura 17. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el sistema radicular de jitomate a los 21 dds. A) Longitud de la raíz principal (cm); B) número de raíces laterales; C) Densidad de raíces. D) Sistema radicular de plántulas de jitomate con y sin inoculación. Cada prueba se realizó por triplicado. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las bacterias del género *Pseudomonas* spp. son importantes promotoras del crecimiento vegetal, dadas sus habilidades para colonizar la rizósfera, fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, producir AIA, producir sideróforos y metabolitos con actividad bactericida que evita el

establecimiento de microorganismos fitopatógenos para las plantas (Roquigny et al., 2017). Su uso como PGPR se ha evaluado exitosamente en cultivos como maíz, trigo, sorgo, tomate, etc. (Kour et al., 2020; Rodríguez et al., 2020). No obstante, la capacidad de una especie para promover el crecimiento de las plantas depende ampliamente de factores específicos, tanto de la especie vegetal como de las condiciones del cultivo porque afectan la diversidad y actividades de la comunidad microbiana (Tabassum et al., 2017). En lo que a esto respecta, autores como Shameer & Prasad, (2018) señalan esta especificidad como una limitante para la aplicación de bioinoculantes, es decir, no pueden ser aplicados de forma generalizada. Además, estudios previos demuestran la existencia de una amplia variabilidad genética y, por tanto, funcional, entre cepas dentro de una especie bacteriana (Loper et al., 2012). Por tal motivo, es importante su evaluación directa en algún cultivo de interés para poder ser utilizadas.

7.5 Monitoreo de parámetros vegetales en jitomate con dosis reducida de N, P y Ca, en respuesta a la inoculación de *Pseudomonas* spp.

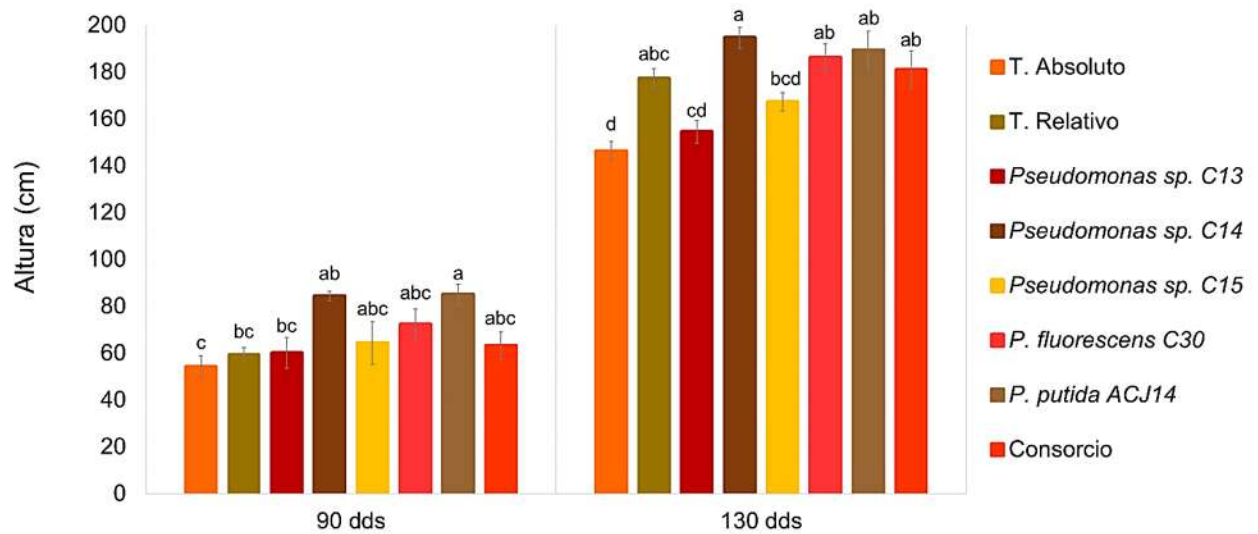
El consumo equilibrado de nutrientes es importante en todas las etapas de crecimiento vegetal. Para jitomate en invernadero, Bodale et al. (2021), identificaron los primeros 90 días de crecimiento como el periodo de mayor consumo de nutrientes, principalmente de nitrógeno, fósforo y potasio, por su participación en el crecimiento del tallo y formación de hojas y flores. Así pues, si uno sólo de los nutrientes es escaso, el crecimiento de la planta es limitado y se reduce el rendimiento del cultivo, lo cual propicia a la aplicación excesiva de fertilizantes para evitar la disminución en la producción por deficiencia (López-Marín, 2017). En este contexto, uno de los principales objetivos de este estudio es lograr la reducción en la aplicación de nitrógeno, fósforo y calcio de la solución nutritiva mediante el uso de bacterias promotoras del crecimiento. Al determinar actividades relacionadas con el aumento en la disponibilidad de nutrientes por parte de las *Pseudomonas* aisladas, la concentración de N, P y Ca en la solución nutritiva Steiner se redujo en un 50% de la solución nutritiva Steiner. La nutrición reducida se aplicó con y sin las cepas, individualmente y en consorcio. Posteriormente, se evaluaron la altura, el diámetro del tallo y el porcentaje de nitrógeno en hoja para el monitoreo del crecimiento. Hay varios métodos para medir el nitrógeno en la hoja, sin embargo, un método rápido y no destructivo es a través de las unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development). En 1991, Turner & Jund, demostraron la proporcionalidad entre la unidad SPAD y el contenido de clorofila, así como la relación con la cantidad de nitrógeno absorbido, lo cual nos permite conocer el estado nutrimental de la planta con respecto a la disponibilidad de nitrógeno. Las diferencias significativas en los tres parámetros

medidos se presentaron al inicio de la etapa reproductiva, posterior al periodo crítico de consumo de nutrientes según Bodale et al. (2020), por tanto, únicamente se presentan los datos correspondientes a la etapa reproductiva y al inicio de la cosecha (Fig. 18 A-C).

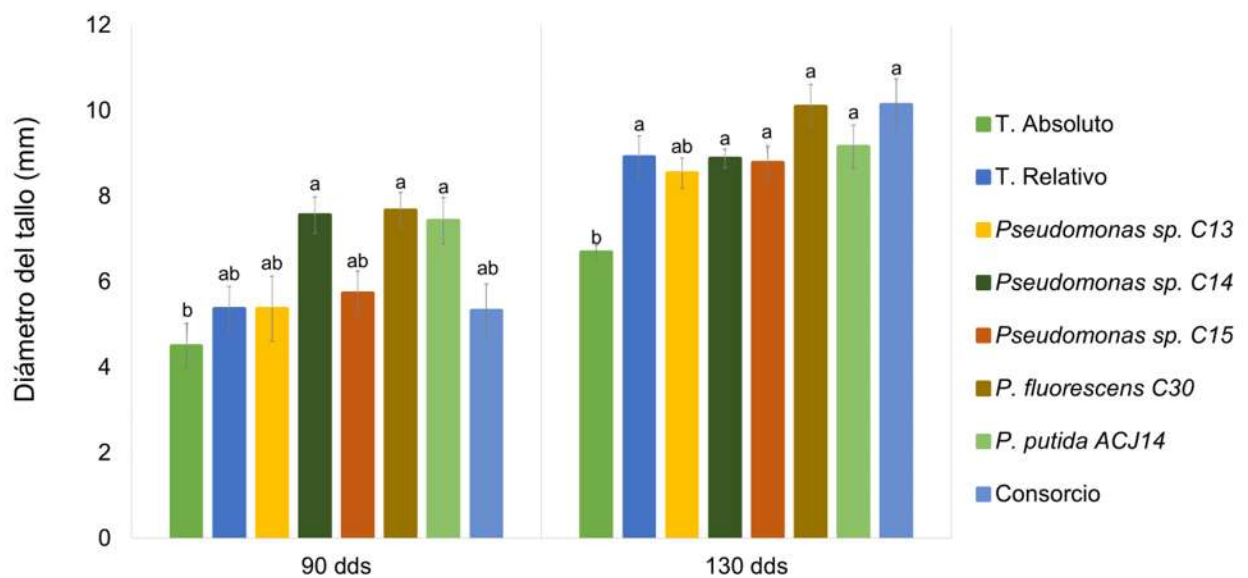
El testigo absoluto registró la menor altura, el menor diámetro de tallo y el contenido de nitrógeno en hoja más bajo respecto a los tratamientos desde los primeros 90 días después de la siembra, sin embargo, la diferencia fue mayor a los 130 dds, ya que presentó una altura de 146 cm, un tallo de 6.6 mm y una concentración de nitrógeno en hoja de 2.7%, correspondiente al 22%, 25% y 18%, respectivamente, menor al testigo fertilizado con la solución nutritiva completa, el cual presentó 177 cm de altura, 8.9 mm de diámetro de tallo y un 3.4% en el contenido de nitrógeno en hoja, demostrando que la reducción del 50% de nitrógeno, fósforo y calcio afectó el desarrollo de las plantas de tomate. La inoculación con las bacterias en plantas fertilizadas con el 50% de N, P y Ca, influyó positivamente sobre la altura, el diámetro del tallo y el contenido de nitrógeno en hoja, observándose su efecto desde la etapa reproductiva, principalmente por *Pseudomonas* sp. C14, *P. fluorescens* C30 y *P. putida* ACJ14. La inoculación con la cepa C14, indujo el mayor estímulo sobre la altura, con un promedio de 194 cm, correspondiente a un 9.7% superior al testigo relativo. Además, generó el mayor contenido de nitrógeno en hoja, lo cual es congruente puesto que fijó amonio en mayor concentración. Por otra parte, el diámetro del tallo incrementó significativamente por la aplicación de *P. fluorescens* C30 y el consorcio, ya que las plantas tenían un diámetro de cerca de 10 cm y un 13% mayor al testigo relativo. Además, generaron un aumento en el contenido de nitrógeno en hoja, junto con *P. putida* ACJ14. Es importante mencionar que el testigo con la solución al 50% y sin inoculación bacteriana, presentó niveles inferiores al contenido de nitrógeno foliar para una planta de jitomate, el cual se encuentra entre 3 y 5% (Argerich & Troilo, 2010), indicando una afectación sobre la absorción de nitrógeno dada por la reducción de la fertilización química, pero favorecida por la inoculación de *Pseudomonas* spp, al observar un porcentaje de nitrógeno en plantas inoculadas mayor al 3% en todos los casos. Los datos obtenidos en las tres variables, presentaron diferencias significativas con el testigo absoluto e incluso superaron al testigo con nutrición al 100%, indicando una compensación nutricional en plantas de jitomate con fertilización deficiente generada por la inoculación con *Pseudomonas* spp. probablemente por su participación al facilitar la disponibilidad de macronutrientes importantes en estas etapas debido a su capacidad para fijar nitrógeno y solubilizar fosfato o por la acción de sustancias sintetizadas por las bacterias que estimularon la elongación de la planta y la superficie de adquisición de nutrientes al mejorar el desarrollo radicular. Consistentemente, las bacterias con mayor capacidad para realizar las

actividades mencionadas anteriormente, presentaron un efecto mejorado sobre el crecimiento del jitomate.

A



B



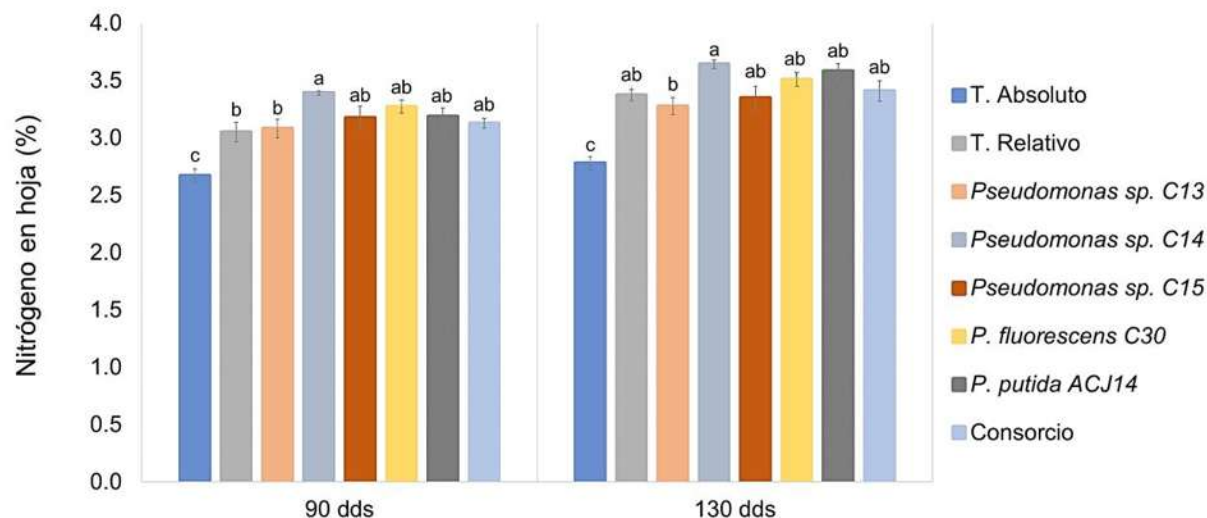
C

Figura 18. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre las variables vegetativas de jitomate. A) Altura; B) Diámetro de tallo y C) Unidades SPAD. Los valores corresponden a la media de siete repeticiones. Las barras representan la media \pm del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.6 Análisis de supervivencia de *Pseudomonas* spp. en la rizósfera de jitomate en invernadero.

Al final del ciclo de cultivo, se hicieron asilamientos a partir de suelo adherido a las raíces de cada uno de los tratamientos para confirmar la persistencia de las bacterias (Fig. 19). Se identificaron las colonias con morfologías similares a las bacterias inoculadas en planta y se comprobó su pureza con la observación de bacilos Gram negativos por tinción Gram. Las *Pseudomonas* producen pigmentos fluorescentes de color verde amarillento, denominados sideróforos (Cezard et al., 2015) observables bajo luz UV, lo cual apoyó la identificación presuntiva de *Pseudomonas*. Finalmente, se realizaron las pruebas cualitativas para identificar las características asociadas con la promoción del crecimiento que se evaluaron inicialmente.

En primera instancia, se observó una mayor carga bacteriana en los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* spp., lo cual podría significar la supervivencia de las mismas en la rizósfera de jitomate, además, se ha informado que la inoculación con *Pseudomonas* puede incrementar la densidad de las comunidades microbianas (Hu et al., 2021). En todos los tratamientos se aislaron colonias presuntivas a *Pseudomonas* con respecto a su morfología macroscópica (Fig. 19 A),

incluso en ambos testigos, sin embargo, estas últimas se descartaron al no presentar fluorescencia cuando se observaron bajo luz UV (Fig. 19 B) y por no poseer actividad fijadora de nitrógeno, solubilizar fosfato y calcio y producir AIA (Cuadro 4).

Según Kloepper, la capacidad para colonizar y sobrevivir en la rizósfera es una característica intrínseca de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal al ser un factor clave para la interacción benéfica con las plantas (Kloepper, 1978). En este sentido, autores como Subramanian et al. (2015) y Sultana et al. (2016), reportaron la promoción del crecimiento de plántulas de sorgo y tomate, respectivamente, inoculadas con *Pseudomonas* sp. debido a un incremento en la absorción de nutrientes asociado con la eficiente colonización de raíces. El género *Pseudomonas* posee una ventaja adicional para la colonización de la rizósfera debido a su habilidad para formar biopelículas (Zboralski et al., 2020), las cuales consisten en agregados microbianos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares generando un ambiente protegido que favorece su persistencia (Noirot-Gros et al., 2018). Así lo demostró Ansari & Ahmad en 2018, quienes determinaron la capacidad de *Pseudomonas entomophila* para promover el crecimiento de trigo y lo atribuyeron a la formación de biopelículas que favorecieron su colonización

La capacidad de colonización de las bacterias, además, les confiere ventaja en la competencia por espacio y nutrientes contra microorganismos potencialmente patógenos como una forma indirecta de promover el crecimiento vegetal (Rojas-Solís et al., 2016). En este mismo sentido, se ha reportado la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana por *Pseudomonas* spp., otorgándoles un papel importante como agentes de biocontrol (Couillerot et al., 2009). Con las consideraciones anteriores, los resultados de esta prueba indican una alta probabilidad de que las *Pseudomonas* evaluadas tengan la capacidad de establecerse y sobrevivir en la rizósfera de jitomate en condiciones no controladas al menos por 30 días, considerando la última inoculación. En estudios previos se ha demostrado la habilidad de cepas de *Pseudomonas fluorescens* para persistir en la rizósfera en la misma densidad del inóculo inicial durante dos semanas y, posteriormente, disminuyen gradualmente permaneciendo funcionales hasta por 35 días después de la siembra (Wang et al., 2004; Yan et al., 2003). Además, se comprobó que mantienen su capacidad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y calcio y producir indoles. Sin embargo, es importante mencionar que, para realizar un análisis más profundo sobre el comportamiento de las bacterias sobre la rizósfera tras la inoculación en planta, es necesario utilizar mutantes marcados con proteínas fluorescentes o, en su defecto, realizar la identificación bacteriana mediante pruebas moleculares.

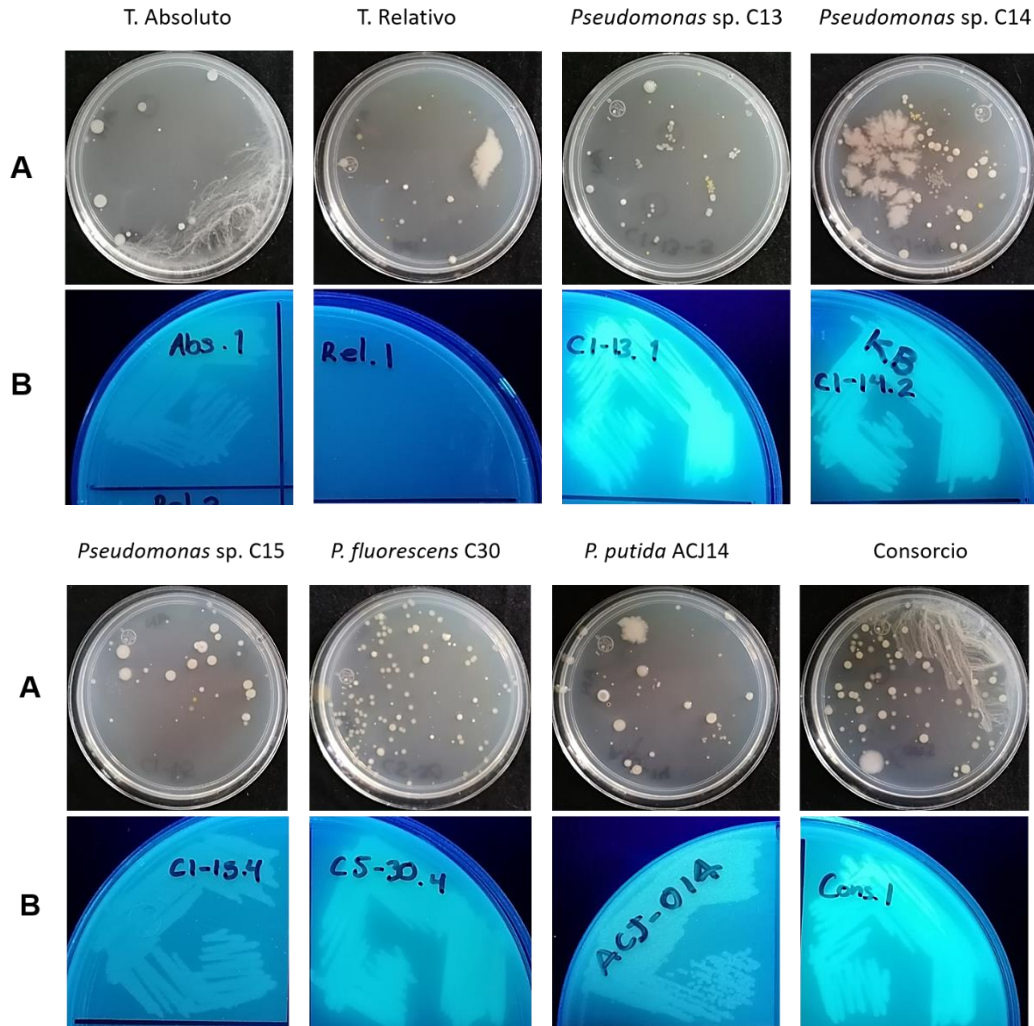


Figura 19. Evaluación cualitativa de la capacidad de supervivencia de *Pseudomonas* spp. en la rizósfera de jitomate en invernadero al término del ciclo de cultivo. A) Morfología colonial y B) Fluorescencia emitida por la exposición a rayos UV.

Cuadro 4. Características asociadas a la promoción del crecimiento de bacterias aisladas de rizósfera de jitomate.

Tratamientos	Tinción Gram	Fijación de nitrógeno	Solubilización de fosfato	Solubilización de calcio	Producción de AIA
T. Absoluto	Bacilos (-)	-	-	-	-
T. Relativo	Bacilos (-)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	Bacilos (-)	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	Bacilos (-)	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	Bacilos (-)	+	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> C30	Bacilos (-)	+	+	+	+
<i>P. putida</i> ACJ14	Bacilos (-)	+	+	+	+

7.7 Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el sistema radicular del jitomate

Al final del ciclo de cultivo, se evaluó el efecto de las *Pseudomonas* spp. sobre el sistema de raíces, cuantificando el peso seco (Fig. 20). La disminución en la concentración de nutrientes no afectó de forma significativa el peso de la raíz (Fig. 20 B). El testigo absoluto reportó un peso de 8.2 g, mientras el peso promedio de raíces del testigo fertilizado en la concentración completa fue de 12.7 g. Las cepas C13, C15, C30 y el Consorcio, no generaron diferencias significativas respecto a los testigos. Por otra parte, la inoculación con *Pseudomonas* sp. C14 y *P. putida* ACJ14 dio como resultado un incremento en el peso de la raíz, en un 63 y 60%, respectivamente, comparadas con el testigo relativo. Trabajos previos han informado que la deficiencia nutricional bajo ciertas condiciones, impulsa el crecimiento de raíces como mecanismo de defensa, con el fin de lograr una mayor absorción (De Bang et al., 2020). De este modo, se explica el peso similar entre el testigo absoluto y el testigo relativo y, a su vez, permite atribuir la mejora observada en el sistema radicular a la efectividad de las bacterias.

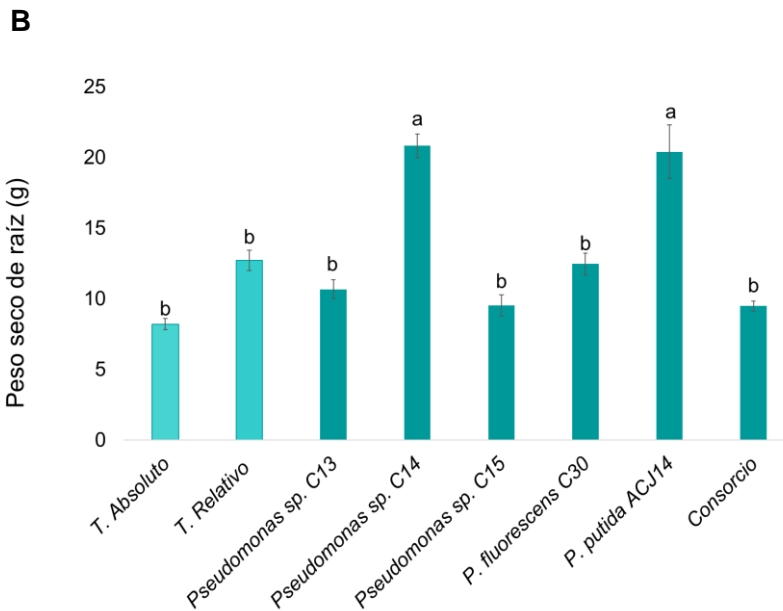
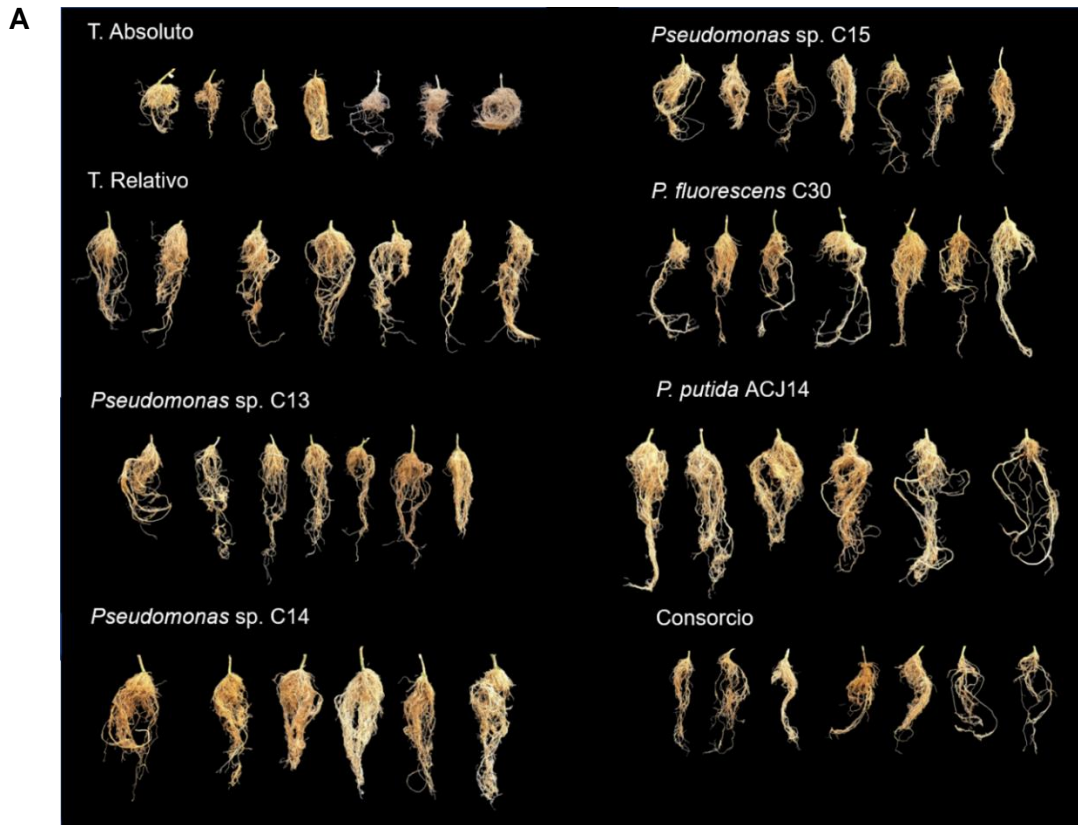


Figura 20. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre la raíz de jitomate al final del ciclo de cultivo. A) Sistema radicular de plantas inoculadas y no inoculadas con *Pseudomonas* spp. B) Peso de las raíces en gramos. Se representa la media de siete repeticiones. Las barras representan la media del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las PGPR colonizan el sistema de raíces y regulan su desarrollo (Hassan et al., 2019). A su vez, el aumento de la biomasa conduce a un mayor potencial exploratorio y mayor superficie para la absorción de agua y nutrientes (López-Bucio et al., 2003). Las cepas en este estudio, mostraron tener la capacidad para establecerse cerca de la raíz de jitomate, así mismo, la inoculación con *Pseudomonas* sp. C14 y *P. putida* ACJ14 mejoraron significativamente su desarrollo, lo cual se manifestó en la altura, diámetro de tallo y contenido de nitrógeno observados anteriormente.

Estos resultados en conjunto, mostraron un comportamiento evidente de deficiencia de nutrientes en las plantas cuando se redujo al 50% la concentración de nitrógeno, fósforo y calcio de la solución nutritiva, ya que, en esta condición, presentaron un diámetro reducido del tallo, una menor altura, un bajo porcentaje de nitrógeno en hojas y poco volumen radicular, indicando que una reducción de nutrientes puede poner en riesgo el rendimiento de los cultivos al afectar el desarrollo de las plantas, además, resalta la necesidad de su aplicación en concentraciones desfavorables para el ambiente. No obstante, la mejora de las variables medidas en plantas inoculadas, sugiere que las *Pseudomonas* spp. aisladas de caña de azúcar y agave aportaron cantidades significativas de estos elementos al cultivo a través de la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfato y calcio, lo cual permitió el desarrollo mejorado de la planta, incluso mayor a cuando son fertilizadas con la dosis recomendada por la solución Steiner.

7.8 Análisis de calidad de fruto de jitomate fertilizado con 50% de N, P y Ca tras la inoculación de *Pseudomonas* spp.

La nutrición correcta es esencial para el desarrollo de una planta durante todo el ciclo de vida, de modo que un desequilibrio puede afectar tanto el crecimiento vegetativo como el reproductivo, en términos de rendimiento y calidad (Bodale et al., 2021). Los componentes principales que determinan la calidad de una hortaliza son aspectos basados en i) apariencia, como color, forma, tamaño y textura; ii) en su composición química como concentración de ácidos, azúcares y iii) en su valor nutritivo, en referencia a los compuestos bioactivos que contienen (vitaminas, minerales, antioxidantes, etc.).

Estudios previos han estudiado ampliamente el papel de los microorganismos sobre el crecimiento vegetal, realizando investigaciones en modelos vegetales *in vitro* o evaluando su efecto sobre el crecimiento de las plantas, no obstante, cuando el objetivo es la optimización en la aplicación de fertilizantes, es necesario realizar un análisis que muestre los efectos directos

sobre la producción, ya que, en algunos casos, las deficiencias nutricionales se manifiestan en el estado fisiológico de los frutos o en la productividad. En esta investigación, se evaluó la firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable y concentración de licopeno como parámetros de calidad, para determinar los efectos directos de la inoculación bacteriana sobre frutos de jitomate fertilizados con solución nutritiva reducida al 50% de nitrógeno, fósforo y calcio (Cuadros 5 y 6).

La firmeza es un parámetro importante relacionado con el estado de madurez del fruto, es decir, a mayor estado de madurez, la firmeza disminuye debido a la hidrólisis de almidones y pectinas o por la degradación de las paredes celulares (Cárdenas-Coronel et al., 2012). Los frutos de jitomate se cosecharon en el Estadio 6 de madurez, según la guía de madurez de la FAO basado en el color (Fig. 21). La aplicación óptima de calcio confiere mayor rigidez a la pared celular, influyendo directamente sobre la firmeza de los frutos (Ahmed et al., 2022) por tanto, los resultados muestran que la reducción del 50% de calcio pudo haber afectado la firmeza de los frutos, al observar la firmeza más baja en el testigo absoluto, con un promedio de 4.6 N (Cuadro 5). Así mismo, se observó un incremento con la aplicación completa de fertilizantes y con la inoculación. Es importante mencionar que la mayor firmeza se presentó en el tratamiento con *Pseudomonas* sp. C14, pero esta cepa no mostró capacidad para solubilizar calcio *in vitro*, no obstante, generó el mayor volumen radicular, de modo que, en este caso, la relación entre la concentración de calcio y el incremento observado se puede atribuir a la mejora en la absorción del elemento más que en su capacidad de solubilización. Sin embargo, la firmeza de los frutos también depende de otros factores. Por ejemplo, Mena-Violante & Olalde-Portugal., en 2007, obtuvieron un valor similar para la firmeza de frutos en un tratamiento control (4.97 N) y un incremento de 1.11 unidades por la inoculación con *Bacillus subtilis* BEB-13BS y lo asociaron con la disminución de la actividad de la enzima poligalacturonasa quien es responsable de la degradación de poliuronido, componente de la pared celular en el tomate. Por otro lado, es conocido el papel del etileno en el proceso de maduración (Zhao et al., 2021). Así mismo, se ha descrito ampliamente la expresión de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilasa (ACC) desaminasa, por bacterias del género *Pseudomonas* spp. como mecanismo de promoción del crecimiento (Glick & Nascimento, 2021), lo cual podría estar modulando la síntesis de etileno, ralentizando el proceso de maduración y, con ello, disminuyendo la pérdida de firmeza. La firmeza es importante en los frutos al proporcionar resistencia al ataque de patógenos o al deterioro causado por el manejo del producto, por tanto, los resultados sugieren que la inoculación con *Pseudomonas* spp. podría contribuir a la disminución de la pérdida poscosecha de jitomate y a la prolongación de la vida de anaquel al mejorar la firmeza de los frutos.



Figura 21. Grado de maduración de jitomates para cosecha

Cuadro 5. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. en la firmeza de frutos

Tratamiento	Firmeza (Newton)
T. Absoluto	4.26 ± 0.15 b
T. Relativo	5.42 ± 0.27 ab
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	5.15 ± 0.21 ab
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	5.56 ± 0.25 a
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	4.95 ± 0.16 ab
<i>P. fluorescens</i> C30	5.30 ± 0.45 ab
<i>P. putida</i> ACJ14	5.20 ± 0.34 ab
Consortio	5.46 ± 0.17 ab

Se expresan las medias con ± la media del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los sólidos solubles y la acidez titulable son factores que determinan el sabor del jitomate (Gómez & Camelo, 2002). El contenido de sólidos solubles totales (SST) medido como °Brix,

está en función al grado de madurez y variedad del tomate (Katsenios et al., 2021). La sacarosa y hexosas constituyen el 65% de los SST, el 13% está representado por ácidos, principalmente cítrico y málico, el resto lo componen elementos como fenoles y aminoácidos (Li et al., 2021). De manera general, se observó un incremento en los SST por la aplicación de la solución de Steiner completa y por la inoculación, cuando se compara con el testigo absoluto, cuyos frutos presentaron 6.2° Brix (Cuadro 6). El mayor contenido se obtuvo por la inoculación de la cepa C14, con un total de 7.3° Brix. Estos valores superan a los reportados por diversos autores para la misma variedad comercial, en distintas formas de manejo del cultivo. Por ejemplo, Preciado-Rangel et al., en 2011, presentaron valores entre 4.1 y 4.4° Brix para jitomates con el mismo grado de madurez cultivados bajo cuatro diferentes fuentes orgánicas de nutrientes. Rosa-Rodríguez et al., en 2016, reportaron valores similares (entre 4.85 y 5.3° Brix) independientemente del número de racimo cosechado o del tipo de sistema hidropónico utilizado, es decir, cerrado o abierto. Por otro lado, Mendoza-Pérez en 2018, cultivaron jitomate dejando 1, 2 y 3 tallos por planta, encontrando valores de 4.13 a 4.83° Brix para todos los frutos. Dado que el mayor porcentaje está compuesto por azúcares, el incremento en los SST observado se podría relacionar con una mayor eficiencia de la fotosíntesis. Autores como Hernández et al. (2020), observaron un incremento significativo en la concentración de azúcares de frutos cultivados con menor concentración de nitrógeno, debido a que la limitación del elemento disminuye el crecimiento vegetativo, dando como resultado un aumento en la irradiación de luz hacia el fruto, con lo cual, aumenta su actividad fotosintética y, por tanto, su contenido de azúcar. En este estudio, el crecimiento vegetativo no se vio afectado por la disminución de nitrógeno en los tratamientos, no obstante, se realizó la técnica de eliminación de las hojas inferiores al racimo en maduración, de modo que podrían haberse dado las condiciones mencionadas anteriormente. En este mismo sentido, Aini et al. (2019) relacionaron el incremento en la concentración de nutrientes con el contenido de azúcares, asociándolo con el nitrógeno como componente básico de la clorofila y el incremento en la síntesis de fotoasimilados, lo cual podría explicar el incremento obtenido por la inoculación con *Pseudomonas* spp., ya que generaron un incremento en el contenido de nitrógeno en hoja. Por otra parte, González-Rodríguez et al. (2018), atribuyeron el aumento de los SST al incremento de la salinidad del suelo debido a la aplicación de fertilizantes, generando un estrés osmótico para la planta, con la consecuente síntesis de solutos impactando en la calidad de los frutos. Esto podría explicar los valores de los Grados Brix observados en el testigo con solución reducida y el incremento generado por la aplicación completa de fertilizantes en el caso del testigo relativo, o por el incremento en la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera tras la aplicación de *Pseudomonas* spp. Por otro lado, el contenido

de SST está directamente relacionado con el grado de maduración y, consecuentemente, con la pérdida de firmeza (Kaur et al., 2006). Sin embargo, los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos de este estudio, siguen la misma tendencia que la firmeza determinada, es decir, los tratamientos con mayor firmeza, presentaron mayor contenido de SST, lo cual se traduce en una alta capacidad de resistencia mecánica, indicando que el tratamiento con *Pseudomonas* spp. promotoras del crecimiento mejoró significativamente dos de los factores que definen la calidad de jitomate.

Con respecto a la acidez titulable, los frutos presentaron valores entre 0.29 y 0.41% (Cuadro 6). Estos valores se encuentran en el rango normal para jitomate (0.2 - 0.6%) y se representa como porcentaje de ácido cítrico por ser el ácido mayoritario del fruto (Nielsen, 2009). Los valores son similares a los reportados por Bona et al. (2017), quienes determinaron acidez titulable entre 0.29 y 0.34% en frutos de jitomate inoculados con *Pseudomonas* sp. 19Fv1T y *Pseudomonas* sp. C7, con nutrición reducida al 75%. Sin embargo, el efecto de la inoculación bajo el régimen reducido de fertilizantes, los valores de ácido cítrico contrastan con lo obtenido en este estudio. Los autores observaron un incremento significativo en la acidez tras la reducción de fertilizantes y cuando se inoculó la cepa bacteriana en comparación con el tratamiento con la fertilización al 100%. A diferencia de lo obtenido en esta investigación, donde el valor menor se presentó en el tratamiento con fertilización al 50% sin inoculación e incrementó significativamente por la aplicación de fertilización completa, así como por la inoculación del consorcio en un 41% en ambos casos. El resto de los tratamientos también presentaron un incremento de hasta 37% en el caso de *P. putida* ACJ14, sin embargo, la diferencia no fue significativa según el análisis estadístico. Aini et al. (2019), asociaron el incremento en la acidez titulable a la alta concentración de fosfato facilitado por la inoculación de un consorcio de *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*.

Finalmente, se evaluó el licopeno como parámetro de calidad nutracéutica, por ser el componente bioactivo más importante en el jitomate debido a su capacidad antioxidante (Assar et al., 2016). El contenido de licopeno fue de 94 mg/g en los frutos del testigo absoluto y se vio afectado positivamente por la inoculación de bacterias, con un incremento significativo por las cepas C14 (37.93%), C15 (37.94%), ACJ14 (40.13%) y por el Consorcio (30.8%) (Cuadro 6). Estudios previos han analizado el papel de los microorganismos en la modulación de compuestos bioactivos en tomate (Singh & Pandey, 2021), aunque se han reportado resultados contradictorios. Por ejemplo, Inculet et al. (2019), obtuvieron un incremento en la concentración de licopeno en jitomates inoculados con PGPR y lo atribuyeron a la mejora del estado nutricional

de las plantas. Sin embargo, Katsenios et al. (2021), analizaron el efecto de *Pseudomonas* sp. 19Fv1T y *P. fluorescens* C7 sobre tomate fertilizado al 70%, donde descartaron una alteración en el contenido de licopeno en frutos de jitomate por la limitación de nutrientes. En el mismo contexto, Hernández et al. (2020), relacionaron el contenido de licopeno con la aplicación de nitrógeno dependiendo del momento fenológico. Por un lado, observaron una mayor acumulación de licopeno en jitomate con altas concentraciones de nitrógeno a partir del trasplante. Sin embargo, cuando se restringe la concentración de nitrógeno en la etapa de floración, la concentración del licopeno aumenta debido a la disminución del crecimiento vegetativo, lo cual favorece la irradiación hacia el fruto, estimulando la síntesis de carotenoides. Por tanto, el incremento en el contenido de licopeno observado tras la inoculación con *Pseudomonas* spp. se podría explicar debido a la mejora en el contenido de nitrógeno en hoja en etapas tempranas de desarrollo de la planta, generado por la disponibilidad de nutrientes favorecido por las bacterias, junto con la práctica de deshoje en etapas posteriores, causando mayor irradiación de luz hacia el fruto. Desde otro punto de vista, se ha asociado un aumento del licopeno en los frutos con la capacidad de las PGPR para reducir los efectos negativos ocasionados por estrés, lo cual conduce a la producción de moléculas antioxidantes (González- Rodríguez, 2018). Por ejemplo, Dorais & Papadopoulos (2008), mencionaron que el estrés moderado por salinidad activó respuestas antioxidantes, lo cual mejoró el nivel de carotenoides. Sin embargo, la inoculación de tomate con *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. tuvo diferentes efectos sobre la concentración del licopeno dependiendo de la variedad de jitomate (de la Osa et al., 2021). Los mismos autores concluyeron que la acumulación de licopeno depende de distintos factores, tanto bióticos como abióticos y no de una respuesta directa. Por lo tanto, es necesario realizar un análisis más profundo si se quiere conocer el efecto particular de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre los niveles de licopeno.

Cuadro 6. Parámetros de calidad de frutos de jitomate inoculados con *Pseudomonas* spp.

Tratamiento	SST (°Brix)	Acidez titulable (% Ác. cítrico)	Licopeno (mg/g)
T. Absoluto	6.2 ± 0.2 b	0.29 ± 0.004 b	94.40 ± 3.5 b
T. Relativo	6.9 ± 0.3 ab	0.41 ± 0.028 a	112.85 ± 4.1 ab
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	6.6 ± 0.3 ab	0.39 ± 0.022 ab	116.74 ± 5.3 ab
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	7.3 ± 0.2 a	0.39 ± 0.016 ab	130.22 ± 4.3 a
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	6.8 ± 0.2 ab	0.38 ± 0.017 ab	130.66 ± 2.7 a
<i>P. fluorescens</i> C30	6.9 ± 0.3 ab	0.39 ± 0.047 ab	116.87 ± 5.7 ab
<i>P. putida</i> ACJ14	7.0 ± 0.2 ab	0.40 ± 0.027 ab	132.29 ± 2.9 a
Consortio	7.1 ± 0.3 ab	0.41 ± 0.008 a	123.53 ± 9.0 a

Nota: Se expresan las medias con ± la media del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.9 Respuesta de la inoculación de *Pseudomonas* spp. en el rendimiento del cultivo de jitomate de invernadero con dosis reducida al 50% de N, P y Ca

Según los resultados del ensayo *in vivo*, la inoculación de *Pseudomonas* spp. aumentó los parámetros morfológicos evaluados en plantas fertilizadas con el 50% de nitrógeno, fósforo y calcio de la solución nutritiva Steiner, confirmando su capacidad para promover el crecimiento vegetal. Además, los frutos mantuvieron la firmeza, concentración de azúcares, acidez titulable y concentración de licopeno, incluso superando al tratamiento convencional.

En la práctica agrícola, obtener un buen rendimiento es el objetivo principal de los productores. Autores como Aini et al. (2019), señalan una relación directa entre la concentración de nutrientes con el desarrollo vegetativo y rendimiento del cultivo. Sin embargo, la concentración debe ser equilibrada, ya que las dosis excesivas provocan repercusiones en la producción, tal como lo determinó Núñez-Ramírez et al. (2017), quienes realizaron un estudio para observar el efecto de la fertirrigación nitrogenada sobre el crecimiento y rendimiento de tomate. El análisis mostró una reducción del rendimiento como consecuencia de la alta concentración de nitrógeno (500 kg N ha^{-1}), infiriendo que la planta destinó la energía en el crecimiento vegetativo, impactando el crecimiento reproductivo. En el caso contrario, una dosis baja de nitrógeno (250 kg N ha^{-1}) causó

una disminución del crecimiento vegetativo, limitando la aparición y desarrollo de órganos reproductivos, generando también la reducción del rendimiento. De manera que, para lograr la reducción en la aplicación de fertilizantes en un sistema agrícola, es necesario analizar las variables durante todo el ciclo de cultivo para descartar alguna afectación relacionada con la deficiencia de nutrientes.

El cultivo de jitomate requiere grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y potasio, por lo que la deficiencia de alguno de ellos afecta severamente su crecimiento y rendimiento (Zaidi et al., 2015), tal como se observó en el testigo absoluto, puesto que la reducción del 50% de los nutrientes se manifestó en la producción de frutos, produciendo 933 g por planta (Fig. 22). No obstante, el rendimiento incrementó un 19.4% con la fertilización completa, ya que el peso total en el testigo relativo fue de 1115.97 g promedio por planta. Así mismo, la deficiencia se recompensó con la actividad bacteriana, ya que, en este análisis, la inoculación con *Pseudomonas* spp. caracterizadas como PGPR por su estimulación del crecimiento de variables morfológicas de la planta, generaron un incremento en el rendimiento del jitomate en condiciones reducidas de fertilizantes, incluso superaron la producción generada por los tratamientos convencionales de fertilización agrícola. La inoculación con *Pseudomonas* sp. C13 y *Pseudomonas* sp. C15, presentaron un incremento comparado con el testigo relativo de 14.3 y 10.3%, respectivamente. Es importante destacar que estas cepas mostraron poca actividad en las pruebas *in vitro*, además, no generaron cambios notorios en las variables medidas a lo largo del ciclo. La inoculación con *P. fluorescens* C30, produjo un incremento de 32.4% con respecto al testigo relativo y del 58.17% comparado con el testigo absoluto. El efecto generado por *P. putida* ACJ14 y el Consorcio fue similar, con un rendimiento de 1727 y 1711 g, respectivamente, lo cual representa un incremento sobre el testigo relativo cercano al 54% en ambos casos. A diferencia de las cepas C13, C15 y C30, este incremento fue estadísticamente significativo con el rendimiento obtenido cuando se aplicó la concentración completa de nutrientes. Se obtuvo un incremento significativamente mayor por la inoculación con *Pseudomonas* sp. C14, quien produjo 1893 g de jitomate por planta, esto equivale a un incremento del 102% con respecto a las plantas fertilizadas con la dosis reducida y un 73% con respecto al testigo con la solución Steiner completa. Las plantas inoculadas por esta cepa, mostraron un crecimiento mejorado desde el trasplante, además, generó el mayor volumen radicular que se expresó en el rendimiento y los frutos incrementaron su calidad.

Según Oteino et al. (2015), la investigación actual sugiere que la inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo permite la reducción hasta del 50% en la aplicación de este elemento

sin generar una reducción significativa en el rendimiento. En esta investigación, se demostró que la inoculación con *Pseudomonas* spp. con características asociadas a la promoción del crecimiento de plantas, incluida la solubilización de fosfato, permite la disminución del 50% en la tasa de aplicación, no solo de fósforo, también de nitrógeno y calcio, generando un notable incremento en el rendimiento de jitomate.

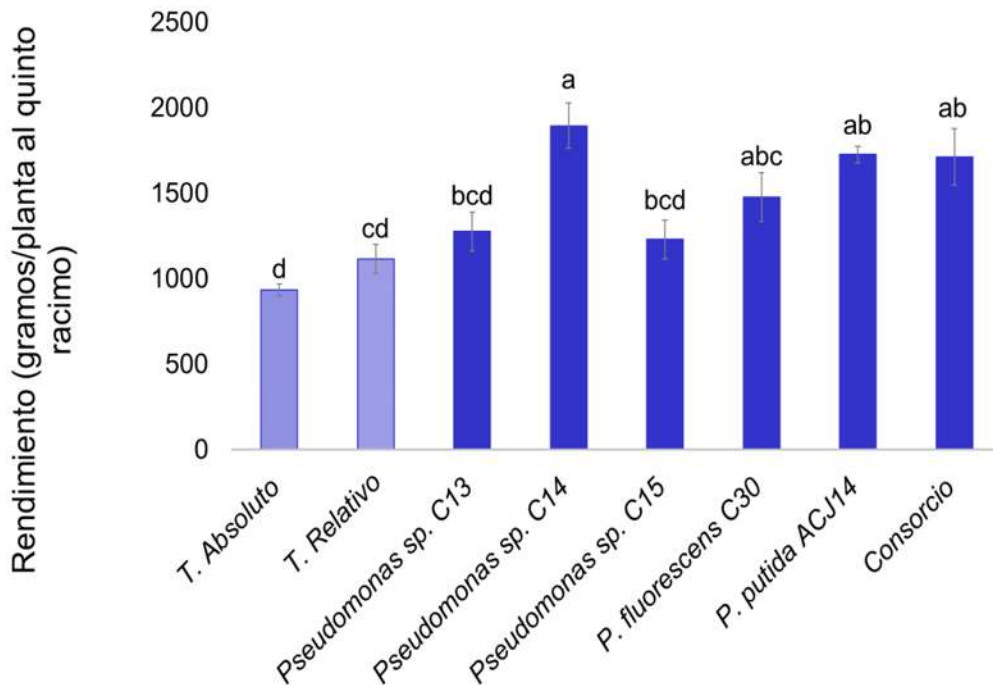


Figura 22. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el rendimiento de jitomate fertilizado con el 50% de N, F y Ca. Se representa la media de siete repeticiones. Las barras representan la media del error estándar. Las letras corresponden a las medias con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Finalmente, se calculó el porcentaje de frutos cosechados por tratamiento catalogados como “frutos comercializables”, según la norma mexicana NMX-FF-031-1997-SCFI Productos Alimenticios No Industrializados Para Consumo Humano - Hortalizas Frescas - Tomate - (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – Especificaciones, la cual establece que su diámetro ecuatorial debe ser mayor a 38 mm. Bajo esta condición, únicamente el 70% de los frutos del testigo absoluto cumplieron el parámetro de calidad con un peso promedio de 65 g (Cuadro 7), indicando que la disminución de nutrientes de la solución nutritiva impactó en el desarrollo de frutos, dando lugar a la producción de frutos pequeños (Fig. 23). Por su parte, en el testigo fertilizado con el

100% de nutrientes, el 76% de los frutos fueron de tamaño aceptable, es decir, cerca del 25% de la cosecha no cumplió los estándares de calidad respecto al tamaño. Sin embargo, a excepción de los tratamientos con *Pseudomonas* sp. C13 y el Consorcio, donde el tamaño del producto fue similar al de los testigos, la inoculación de *Pseudomonas* spp. aumentó visiblemente el volumen de los frutos (Fig. 23). La cepa C14 de *Pseudomonas* sp y *P. putida* ACJ14 produjeron los frutos más grandes, con un peso de 84 y 74 g, respectivamente y, de los cuales, el 90% se incluyó dentro del rango aceptable para su comercialización. Anteriormente, también se observó la producción de frutos pequeños fuera de la clasificación de “frutos comercializables” con la reducción de fertilización tradicional al 70% y el aumento de tamaño por la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* C7, generando frutos con un peso promedio de 75 g (Bona et al., 2017), destacando el papel de *Pseudomonas* spp. sobre un parámetro de calidad física que define el valor comercial del jitomate (Fig. 23).

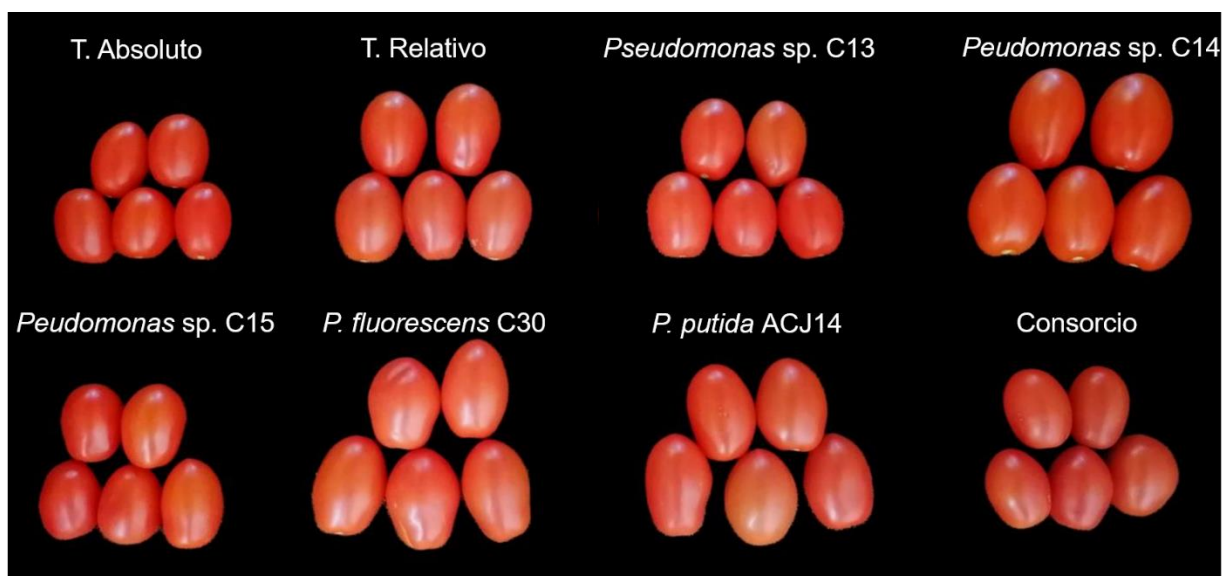


Figura 23. Frutos de jitomate cosechados a partir de plantas con y sin inoculación de *Pseudomonas* spp.

Cuadro 7. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas* spp. sobre el porcentaje de frutos comercializables y peso individual de jitomate en régimen reducido de N, P y Ca.

Tratamiento	Frutos comercializables* (%)	Peso (gramos)
T. Absoluto	70.25 ^d	65.56 ^b
T. Relativo	76.75 ^{cd}	78.33 ^{ab}
<i>Pseudomonas</i> sp. C13	78.63 ^{bcd}	73.46 ^{ab}
<i>Pseudomonas</i> sp. C14	90.83 ^a	84.88 ^a
<i>Pseudomonas</i> sp. C15	85.88 ^{abc}	66.71 ^{ab}
<i>P. fluorescens</i> C30	87.4 ^{abc}	78.81 ^{ab}
<i>P. putida</i> ACJ14	90.26 ^{ab}	74.27 ^{ab}
Consorcio	89.55 ^{ab}	71.73 ^{ab}

* Frutos comercializables según la Norma Mexicana NMX-FF-031-1997: aquellos que tienen un diámetro ecuatorial mayor a 38 mm. Se presentan las medias de siete repeticiones. Las letras diferentes corresponden a las medias con diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey (p<0.05).

Diversos autores han observado efectos similares tras la inoculación con *Pseudomonas* spp. sobre distintos cultivos de solanáceas. Por ejemplo, Chiquito-Contreras et al. (2017), evaluaron el efecto de tres cepas de *Pseudomonas putida* de forma individual y combinada sobre el crecimiento y productividad de chile habanero en invernadero aplicando fertilización inorgánica completa y reducida en un 25%. Observaron incrementos significativos en el rendimiento, específicamente cuando las plantas se fertilizaron con solución nutritiva al 75%. No observaron cambios significativos en las variables de calidad evaluadas, sin embargo, no hubo disminución cuando se redujo la concentración de fertilizantes. Los autores concluyeron que la inoculación de *P. putida* permitió reducir la aplicación de fertilizantes inorgánicos en un 25%, disminuyendo los costos de producción y la contaminación al ambiente y, a la vez, lograron un incremento en la productividad hasta en un 36%. Sin embargo, al no observar diferencias en la inoculación combinada con la fertilización completa, argumentan que la eficiencia de las PGPR es particularmente notoria en dosis reducidas de fertilizantes, es decir, la acción de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal es especialmente significativa cuando los elementos nutricionales son escasos en la rizósfera. Estos mismos resultados se presentaron por Batool & Ahsan (2017), quienes descartaron un efecto positivo en el rendimiento de chile por la inoculación de PGPR cuando se aplicación la nutrición convencional, además, según los

rendimientos obtenidos, determinaron que la inoculación permite la disminución del 75 u 80% en la concentración de fertilizantes y obtener rendimientos estadísticamente equivalentes a plantas con la fertilización inorgánica tradicional, mientras que dosis por debajo del 75%, afecta de manera evidente la productividad, es decir, pese a la eficiencia mejorada en plantas por la inoculación de microorganismos benéficos, su uso no sustituye los fertilizantes inorgánicos, más bien los complementa. Masood et al. (2020) comprobaron este argumento al observar mejoría en el crecimiento de tomate por la inoculación de *Bacillus pumilus* únicamente cuando se aplicó nitrógeno, indicando la esencialidad del elemento para la supervivencia de los microorganismos y para iniciar con el proceso de fijación. En el mismo contexto, esta investigación mostró resultados destacables, puesto que la inoculación con *Pseudomonas* spp. permitió la reducción del 50% de macronutrientes (nitrógeno, fósforo y calcio) sin afectar el rendimiento. También se ha reportado la capacidad de especies de *Pseudomonas* para promover el crecimiento de la papa, provocando un aumento en el peso fresco y seco de las plantas con respecto a plantas sin inocular, junto con un mayor contenido de N en los brotes y las raíces, atribuyéndolo a su capacidad para fijar nitrógeno y producir ácido indol-3-acético (Naqqash et al., 2016). En otros experimentos se ha logrado mejorar el desarrollo morfológico del tomate, reflejándose en el rendimiento, mediante la aplicación de *P. putida* (Gravel et al., 2007), *Pseudomonas* sp. (Sánchez-López et al., 2012), *P. fluorescences* SS5 (Ahirwar et al., 2015), etc. con capacidades bioquímicas asociadas a la promoción del crecimiento vegetal evaluadas *in vitro*, como la fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes y producción de AIA.

La participación de las bacterias para el incremento del rendimiento se ha relacionado con distintas actividades. Narendra et al. (2015), mencionan que los efectos beneficiosos de las PGPR se deben a una mayor absorción de nutrientes, al facilitar su disponibilidad a través de la capacidad para solubilizar fósforo y/o fijar nitrógeno. Específicamente, se ha relacionado la absorción mejorada de fósforo y su participación en el proceso de floración, lo que podría proporcionar un mayor número de frutos por planta o probablemente por su papel en el desarrollo radicular (Coutinho-Edson et al., 2014). En este sentido, Pérez-Rodríguez et al. (2020), atribuyeron el aumento en el crecimiento y rendimiento de tomate a la mejora en el sistema radicular por la inoculación de *Pseudomonas fluorescens*, lo cual incrementó el potencial exploratorio para la absorción de agua y nutrientes. Por su parte, Espinosa-Palomeque et al. (2019), atribuyeron el aumento en el rendimiento del tomate a la mejora en el contenido de clorofila, con lo cual, aumenta la eficiencia fotosintética y, posteriormente, conduce al aumento en el peso del tomate. Narendra et al. (2015), también mencionan que el crecimiento y

productividad de las plantas podría atribuirse a la capacidad de las rizobacterias para colonizar y sobrevivir en las raíces.

En este caso, la promoción del crecimiento y el rendimiento mejorado por medio de la inoculación con *Pseudomonas* spp. en plantas fertilizadas bajo un régimen reducido de nutrientes, se podría atribuir a una mayor absorción de nutrientes y un mejor estado nutrimental, debido a su capacidad mostrada para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, solubilizar calcio y producir AIA, tal como se observó en el contenido de nitrógeno en hoja, así como el desarrollo del sistema radicular mejorado. Además, las bacterias lograron sobrevivir hasta por 30 días en la rizósfera del jitomate, brindándoles ventaja en la competencia contra otros microorganismos.

Los altos precios de insumos agrícolas que enfrenta la agricultura global, reflejan el impacto de su escasez y, al mismo tiempo, se prevé un aumento en la demanda de inoculantes debido a la adopción de nuevas técnicas para minimizar el costo en los sistemas de producción. Pese al potencial demostrado de los microorganismos en la agricultura, aún falta por lograr el éxito deseado y aún se requieren esfuerzos en la investigación para explorar e identificar cepas específicas para tales efectos (Nosheen, 2021). Debido a la variabilidad funcional de *Pseudomonas* spp., es necesario una valoración exhaustiva de cepas para determinar su efecto en un sistema en particular. Además, gran parte de la diversidad del género permanece sin explorar (Loper et al., 2012). El desarrollo de un inoculante generalmente comienza con la detección y selección *in vitro* de una colección de cepas con base a funciones microbianas específicas relacionadas con la promoción del crecimiento de las plantas (Finkel et al., 2017), es decir, identificando las características fisiológicas que emplean para realizar la promoción de crecimiento, tales como la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos o producir hormonas, entre otras (Vivanco-Calixto et al., 2016), seguido de pruebas en invernadero y finalmente, pruebas en campo (Compant et al., 2019). Por tanto, esta investigación brinda información directa sobre la ventaja de la inoculación de *Pseudomonas* spp. aisladas de caña de azúcar y agave para ser aplicadas sobre jitomate en cultivo hidropónico. Según Biel et al. (2021), los inoculantes microbianos no pueden reemplazar a los fertilizantes químicos, pero se pueden utilizar para complementar y reducir considerablemente la tasa de aplicación. En este caso, fue posible optimizar la concentración de nitrógeno, fósforo y calcio hasta en un 50%, manteniendo, e incluso superando el rendimiento y parámetros de calidad. Adicionalmente, al utilizar las cepas estudiadas con el 50% de los nutrientes mencionados, es posible obtener un ahorro de hasta un 32% en la compra de los fertilizantes que aportan nitrógeno, fósforo y calcio, además, una disminución en la contaminación ambiental.

8. Conclusiones

La inoculación con *Pseudomonas* spp. aisladas de caña de azúcar y agave del estado de Michoacán, permitió reducir un 50% la aplicación de nitrógeno, fósforo y calcio en jitomate cultivado en invernadero con sistema de riego hidropónico utilizando la Solución Universal de Steiner, incrementando el rendimiento hasta en un 73% y manteniendo e incluso mejorando los parámetros de calidad de plantas fertilizadas con la dosis recomendada convencionalmente, con lo cual, se demostró su capacidad para usarse como una herramienta alternativa factible en la optimización de fertilizantes químicos, representando un ahorro cercano al 32% en el costo total de la solución nutritiva, además de una reducción considerable de elementos perjudiciales para el ambiente.

9. Referencias bibliográficas

- Aasfar, A., Bargaz., A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y. & Kadmiri, M.I. (2021). Nitrogen Fixing *Azotobacter* Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Abdullahi, I. I., Abdullahi, N., Abdu, A. M. & Ibrahim, A. S. (2016). Approximate, mineral and vitamin analysis of fresh and canned tomato. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13 (2), 1163-1169. <https://doi.org/10.13005/bbra/2147>
- Abubakar, M. & Attanda, M. (2013). The concept of sustainable agriculture: challenges and prospects. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 53. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/53/1/012001>
- Aguilar, A., Alcántar, G. Etchevers, J. D., Rodríguez, M. N. & Santizó, J. A. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila entomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoamericana*, 16(2), 135-141. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57316204>
- Ahirwar, N.K., Gupta, G., Singh, V., Rawley, R.K. & Ramana, S. (2015). Influence on growth and fruit yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants by inoculation with *Pseudomonas fluorescence* (SS5): possible role of plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 720–730. <https://www.ijcmas.com/vol-4-2/N.K.%20Ahirwar,%20et%20al.pdf>
- Ahmed, Z. F., Kaur, N., Maqsood, S., & Schmeda-Hirschmann, G. (2022). Preharvest Applications of Chitosan, Salicylic Acid, and Calcium Chloride Have a Synergistic Effect on Quality and Storability of Date Palm Fruit (*Phoenix dactylifera* L.), *American Society for Horticultural Science*, 57(3), 422-430. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16416-21>
- Aini, N., Yamika, W. S. & Pahlevi, R. W. (2019). The effect of nutrient concentration and inoculation of PGPR and AMF on the yield and fruit quality of hydroponic cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. cerasiforme). *Journal of Applied Horticulture*, 21(2), 116-122. <https://doi.org/10.37855/jah.2019.v21i02.20>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8 (971). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Álvarez–Hernández, J. C., Cortez–Madrigal, H. & García–Ruiz, I. (2009). Exploración y caracterización de poblaciones silvestres de jitomate (*Solanaceae*) en tres regiones de Michoacán, México. *Polibotánica*, (28), 139-159. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62112485007>

- Anderson, T. (2019). Agricultura climáticamente inteligente. En *Pluriverso, un diccionario del posdesarrollo*. Barcelona, España, pp 85-88.
- Ansari, F.A. & Ahmad, I. (2018) Biofilm Development, Plant Growth Promoting Traits and Rhizosphere Colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: A Promising PGPR. *Advances in Microbiology*, 8, 235-251. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.83016>
- Arai, Y. & Sparks, D.L. (2007). Dynamics of the phosphate reaction in soils and soil components: a multiscale approach. *Advances in Agronomy*, 94, 135-179. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)94003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)94003-6)
- Argerich, C. & Troilo, L. 2010. Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Argentina. <http://www.fao.org/3/a-i1746s.pdf>
- Asociación Internacional de Fertilizantes, IFA. (2022). An unfolding food crisis: a perspective from the fertiliser industry Alzbeta Klein, CEO/Director General, International Fertilizer Association. https://www.fertilizer.org/Public/News___Events/IFA_News/2022_04_21_An_Unfolding_Food_Crisis.aspx
- Asociación Mexicana de Horticultura Protegida A.C., AMHPAC. (2020). Industria hortofrutícola protegida de México terminará 2020 con superávit pese a pandemia. <https://n9.cl/pwm0h>
- Assar, E.A., Vidalle, M.C., Chopra, M. & Hafizi, S. (2016). Lycopene acts by inhibiting I-B kinase to suppress NF-B signaling in human breast and prostate cancer cells. *Tumor Biology*, 37 (7), 9375–9385. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4798-3>
- Bach-Álvarez, T., & Díaz, M. (2008). Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura orgánica*, 1, 35-38
- Bahulikar, R. A., Torres-Jerez, I., Worley, E., Craven, K., & Udvardi, M. K. (2014). Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Switchgrass in the Native Tallgrass Prairie of Northern Oklahoma. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (18), 5636–5643. <https://doi.org/10.1128/AEM.02091-14>
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1-2), 413–431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Bano, A., & Muqarab, R. J. P. B. (2017). Plant defence induced by PGPR against *Spodoptera litura* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biology*, 19(3), 406-412. <https://doi.org/10.1111/plb.12535>

- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S. & Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13 (3), 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
- Batool, S., & Ahsan, A. M. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduces Application Rates of Fertilizers in Chili (*Capsicum frutescens* L.) Cultivation. *Journal of Horticulture*, 4(4). <https://doi.org/10.4172/2376-0354.1000215>
- Bharucha, U., Patel, K. & Trivedi, U.B. (2013). Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research* 2, 215-221. <https://doi.org/10.1007/s40003-013-0065-7>
- Bhat, T. A., Ahmad, D., Ganai, A. & Khan, O. A. (2015) Nitrogen Fixing Biofertilizers; Mechanism and Growth Promotion: A Review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9 (2), 1675-1690.
- Bhattacharai, A., Bhattacharai, B. & Pandey, S. (2015). Variation of Soil Microbial Population in Different Soil Horizons. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 2 (2), 75-78. <https://doi.org/10.15406/jmen.2015.02.00044>
- Biel, C., Camprubí, A., Lovato, P. E., & Calvet, C. (2021). On-farm reduced irrigation and fertilizer doses, and arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improve water productivity in tomato production. *Scientia Horticulturae*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110337>
- Bodale, I., Mihalache, G., Achi,tei, V., Teliban, G.-C., Cazacu, A. & Stoleru, V. (2021). Evaluation of the Nutrients Uptake by Tomato Plants in Different Phenological Stages Using an Electrical Conductivity Technique. *Agriculture*, 11, 292. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040292>
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., Lingua, G., D'Agostino, G., Gamalero, E. & Berta, B. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza* 27, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>
- Burchi, G., Chessa, S., Gambineri, F., Kocian, A., Massa, D., Milazzo, P., Rimediotti, L. & Ruggeri, A. (2018) Information Technology Controlled Greenhouse: A System Architecture. Conference: IEEE IoT Summit Vertical and Topical Summit for AgricultureAt: Monteriggioni, SI, Italy. <https://doi.org/0.1109/IOT-TUSCANY.2018.8373044>
- Burén, S., & Rubio, L. M. (2017). State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx274>
- Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, A., Morsy, M., Eisen, J. A. Leach, J. E. & Dangl, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLOS Biology*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001793>

- Calvo, P., Watts, D. B., Kloepper, J. W., & Torbert, H. A. (2016). Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 56–70. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500616>
- Cárdenas-Coronel, W. G., Velez-de la Rocha, R., Siller-Cepeda, J. H., Osuna-Enciso, T., Muy-Rangel, M. D. & Sañudo-Barajas, J. A. (2012). Cambios en la composición de almidón, pectinas y hemicelulosas durante la maduración de mango (*Mangifera indica* cv. Kent). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 18(1), 05-19. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60923315001>
- Cassán, F., Penna, C., Creus, C., Radovancich, D., Monteleone, E., García de Salamone, I., Di Salvo, L., Mentel, I., García, J., Mayans Pasarello, M. C., Lett, L., Puente, M., Correa, O., Valerio, P., Massa, R., Roos, A., Díaz, M., Catafesta, M., Righes, S., Carletti, S. & Rodriguez, E. (2010). Protocolo para el control de calidad de inoculantes que contienen *Azospirillum* sp. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, p. 13.
- Castellanos, J. (2009). Manual de producción de tomate en invernadero. INTAGRI, S. C Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, CEDRSSA. (2019). Fertilizantes. http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-fertilizantes-n.htm
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, CEDRSSA. (2020). Análisis de la Producción y Consumo de Hortalizas. <https://n9.cl/s1rbow>
- Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2014). Chemistry and Biology of Pyoverdines, Pseudomonas Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165–186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>
- Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B. & Nagpal, A. K. (2018). Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *Journal of Food Science and Technology*, 55 (8), 2833–2849. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z>
- Chiquito-Contreras, R. G., Murillo-Amador, B., Chiquito-Contreras, C. J., Márquez-Martínez, J. C., Córdoba-Matson, M. V., & Hernández-Montiel, L. G. (2017). Effect of *Pseudomonas putida* and inorganic fertilizer on growth and productivity of habanero pepper (*Capsicum Chinense* Jacq.) in greenhouse. *Journal of Plant Nutrition*, 40(18), 2595–2601. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1381119>
- Chuang, C., Kuo, Y. L., Chao, C. & Chao, W. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 575-584. <https://doi.org/10.1007 / s00374-006-0140-3>

- Cisneros-Rojas, C. A., Sánchez-de Prager, M. & Menjivar-Flores, J. C. (2017). Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (1), 149-158. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22021>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C., & Lopez-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149 (3), 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Corrales-Ramírez, L. C., & Sánchez-Leal, L. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 3(4), 21-29. <https://doi.org/10.22490/24629448.333>
- Costa-Gutierrez, S.B., Lami, M.J., Santo, M.C.CD., Zenoff, A. M., Vincent, P. A., Molina-Henares, M. A., Espinosa-Urgel, M. & de Cristóbal, R. E. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 4577–4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>
- Costa-Rodrigues, J., Fernandes, MH, Pinho, O. & Rocha, P. R. (2018). Modulation of human osteoclastogenesis and osteoblastogenesis by lycopene. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 57, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.004>
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J. & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 505–512, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x>
- Coutinho-Edson, L. M., Orioli, J., Valdeci, S., Coutinho, N., André, M. & Cardoso, S. S. (2014). Nutrición, producción y calidad de frutos de tomate para procesamiento en función de la fertilización con fósforo y potasio. *Agrociencia*, 18(2), 40-46. <https://doi.org/10.2477/VOL18ISS2PP40-46>.
- David, B. V., Chandrasehar, G., & Selvam, P. N. (2018). *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, 221–243. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63987-5.00010-4>
- De Bang, T. C., Husted, S., Laursen, K. H., Persson, D. P., & Schjoerring, J. K. (2020). The molecular-physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for

deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 229(5), 2446-2469.
<https://doi.org/10.1111/nph.17074>

de la Osa, C., Rodríguez-Carvajal, M.Á., Gandullo, J., Aranda, C., Megías, M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J. & Monreal, J.A. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Modulate the Concentration of Bioactive Compounds in Tomato Fruits. *Separations*, 8(223).
<https://doi.org/10.3390/separations8110223>

de Oliveira, A.L.M., de Canuto, E.L., Urquiaga, S., Massena, V. & Baldani, J. I. (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*, 284, 23–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>

Dessaux, Y., Grandclément, C., & Faure, D. (2016). Engineering the rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21 (3), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>

Díaz-Rodríguez, A. M., Salcedo-Gastelum, L. A., Félix-Pablos, C. M., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Puente, M. L., Bhattacharya, D., Mukherjee, J. & de los Santos-Villalobos, S. (2021). The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.614739a>

Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J. & Alcántar-González, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 19 (4), 327-335. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57319405>

División Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAOSTAT. (2021). <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC>

Dobereiner, J., Marriel, I. E., & Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22 (10), 1464-1473.
<https://doi.org/10.1139/m76-217>

Dorais, M., Ehret, D.L. & Papadopoulos, A.P. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7(231).
<https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>

Edi-Premono, Moawad, M. A. & Vleck, P.L.G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, 13–23.

Eisenhauer, N., Lanoue, A., Strecker, T., Scheu, S., Steinauer, K., Thakur, M. P., & Mommer, L. (2017). Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44641>

- Elbadrawy, E. & Sello, A. (2016). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (2), 1010-1018. <https://doi.org/0.1016/j.arabjc.2011.11.011>
- El-Mergawi, R.A. & Abd El-Wahed, M.S.A. (2020). Effect of exogenous salicylic acid or indole acetic acid on their endogenous levels, germination, and growth in maize. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 167. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00416-7>
- Emmanuel, O. C., & Babalola, O. O. (2020). Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, 126569. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126569>
- Erisman, J. W., Galloway, J. N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N. B., Petrescu, A. M. R., Leach, A. M. & de Vries, W. (2013). Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1621). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0116>
- Escobar & Lee (2009). Manual de producción de tomate bajo invernadero. [Archivo PDF]. <http://hdl.handle.net/20.500.12010/1892>
- Esitken, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., Donmez, M. F., Turan, M. & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124, 62–66. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2009.12.012>
- Espinosa-Palomeque, B., Cano-Ríos, P., Salas-Pérez, L. García-Hernández, J. L., Preciado-Rangel, P., Sáenz-Mata. J. & Reyes-Carrillo, J. L. (2019). Bioinoculantes y concentración de la solución nutritiva. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 21(3), 100-107. DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i3.1038>
- FAO. (2003). Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas. <https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s00.htm#Contents>
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura, FIRA. (2019). Panorama Agroalimentario. Tomate rojo. [Archivo PDF]. <https://n9.cl/d5bl>
- Finch-Savage, W. E., & Bassel, G. W. (2015). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 567–591. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>
- Finkel, O. M., Castrillo, G., Herrera Paredes, S., Salas González, I., & Dangl, J. L. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.018>

- Fox, A. R., Soto, G., Valverde, C., Russo, D., Lagares, A., Zorreguieta, Alleva, K., Pascuan, C., Frare, R., Mercado-Blanco, J., Dixo, R. & Ayub, N. D. (2016). Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3522–3534. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13376>
- Gamalero, E., Bona, E. & Glick, B. 2022. "Current Techniques to Study Beneficial Plant-Microbe Interactions" *Microorganisms* 10(7), 1380. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071380>
- Gao, M., Zhou, J., Wang, E., Chen, Q., Xu, J., & Sun, J. (2015). Multiphasic characterization of a plant growth promoting bacterial strain, *Burkholderia* sp. 7016 and its effect on tomato growth in the field. *Journal of Integrative Agriculture*, 14 (9), 1855–1863. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(14\)60932-1](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(14)60932-1)
- García-Closas, R.; Berenguer, A.; Tormo, M. J.; Sánchez, M. J.; Quirós, J. R.; Navarro, C.; Arnaud, R.; Dorronsoro, M.; Chirlaque, M. D.; Barricarte, A.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; Martínez C.; Agudo, A. & González, C. A. (2004). Dietary Sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain. *British Journal Of Nutrition*, 91(6), 1005-1011. <https://doi.org/10.1079/bjn20041130>
- Gawad, S. a., Jaiswal, P. & Narayan J. S. (2014). Non-destructive quality evaluation of intact tomato using VIS-NIR spectroscopy. *International Journal of Advanced Research*, 2(12), 632-639. https://www.journalijar.com/uploads/391_IJAR-4687.pdf
- Gerhardt, R. G. E., Murray, W. A. Wood & Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 791 pp.
- Glick, B.R. & Nascimento, F.X. (2021). *Pseudomonas* 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Deaminase and Its Role in Beneficial Plant-Microbe Interactions. *Microorganisms*, 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122467>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61 (2), 793–796. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.793-796.1995>
- Gómez, P. & Camelo, A. (2002). Calidad postcosecha de tomates almacenados en atmósferas controladas. *Horticultura Brasileira*, 20(1), 38-43. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362002000100007>
- González-Mancilla, A., Almaraz-Suárez, J., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Guzmán, M., Taboada-Gaytán, O., Trinidad-Santos, A., Alarcón, A. & Arteaga-Garibay, R. (2017). Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de Chile

- poblano (*Capsicum annuum* L.). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 3 (3), 463-474. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.03.09>
- González-Rodríguez, G., Espinosa-Palomeque, B., Cano-Ríos, P., Moreno-Reséndez, A., Leos-Escobedo, L., Sánchez-Galván, H. & Sáenz-Mata, J. (2018). Influence of rhizobacteria in production and nutraceutical quality of tomato fruits under greenhouse conditions. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(2), 367-379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1078>
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J. & Vera-Nuñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(6), 1261-1274. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i6.1376>
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>
- Grupo Consultor de Mercados Agrícolas, GCMA. (2021). Precios de fertilizantes se elevan como el gas. <https://gcma.com.mx/aprecios-de-fertilizantes-se-elevan-como-el-gas/>
- Gupta, G., Parihar, S. S., Kumar, N., Kumar, S. & Singh, V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07 (02), 96-102. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>
- Guzmán, L., Antunez, A. B., Martínez, A., Salinas, J., Corradini, L., Rodríguez, F., Riquelme, F., Allende, J., Olivares, M., Abarca, N., Felmer, P. & Sepulveda, R. P. (2017) Manual de cultivo del Tomate bajo invernadero [en línea]. La Cruz: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 377. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/6708>
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M.S., Laraib, I., Siddique, M.J., Zia, R., Mirza, M.S. & Imran, A. (2021). Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5 (617157). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2019). The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture*, 9 (7), 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>
- Hernández, V., Hellín, P., Fenoll, J., & Flores, P. (2020). Impact of nitrogen supply limitation on tomato fruit composition. *Scientia Horticulturae*, 264. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109173>

- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E. & Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, *81*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11>
- Hu, J., Yang, T., Friman, V. P., Kowalchuk, G. A., Hautier, Y., Li, M., Wei, Z., Xu, Y., Shen, Q., & Jousset, A. (2021). Introduction of probiotic bacterial consortia promotes plant growth via impacts on the resident rhizosphere microbiome. *Proceedings Biological sciences*, *288*(1960). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1396>
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipaniski, M. E., Atwood, L. W. & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience*, *67*: 386–391. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Inculet, C. S., Mihalache, G., Sellitto, V. M., Hlihor, R. M. & Stoleru, V. (2019). The Effects of a Microorganisms-Based Commercial Product on the Morphological, Biochemical and Yield of Tomato Plants under Two Different Water Regimes. *Microorganisms* *2019*, *7*(12), 706. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120706>
- Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos. (2021). Product List. [Archivo PDF]. <https://www.omri.org/es/lista-mexico>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Jaramillo, J., Rodríguez, V. P., Guzmán, M., Zapata, M. & Rengifo, T. 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas. [Archivo PDF]. <http://www.fao.org/3/a1374s/a1374s00.pdf>
- Kalayu, G. (2019). Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kalyanasundaram, G. T., Syed, N., & Subburamu, K. (2021). Recent developments in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 181–192. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821406-0.00017-5>
- Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Stergiou, P., Xanthou, M. Z., Kakabouki, I., Vlachakis, D., Djordjevic, S., Katsaros, G., & Efthimiadou, A. (2021). Evaluation of Plant Growth Promoting Bacteria Strains on Growth, Yield and Quality of Industrial Tomato. *Microorganisms*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102099>

- Kaur J. (2021) PGPR in Management of Soil Toxicity. En: Kumar V., Prasad R., Kumar M. (eds) Rhizobiont en Bioremediation of Hazardous Waste. Springer, Singapur, pp. 17-344. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0602-1_14
- Kaur, D., Sharma, R., Abas Wani, A., Singh Gill, B., & Sogi, D. S. (2006). Physicochemical Changes in Seven Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Cultivars During Ripening. *International Journal of Food Properties*, 9(4), 747–757. <https://doi.org/10.1080/10942910600575716>
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2015). Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics. *Pedosphere*, 25 (3), 428–437. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(15\)30010-2](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(15)30010-2)
- Ke, X., Feng, S., Wang, J., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., & Lin, M. (2018). Effect of Inoculation with Nitrogen-fixing Bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on Maize Plant Growth and the Microbiome Indigenous to the Rhizosphere. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(2), 248-260. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S. & Rasheed, M. (2009b). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1 (1), 48-58. http://www.uaar.edu.pk/jabs/files/jabs_1_1_6.pdf
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K. & Alamri, S.A. (2018). Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 225–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09888-2>
- Khan, M. S., Zaidi A. & Wani P.A. (2009a) Role of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture - A Review. En: Lichtfouse E., Navarrete M., Debaeke P., Véronique S., Alberola C. (eds) Sustainable Agriculture. Springer, pp. 551-570. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_34
- Khan, M. S., Zaidi, A. & Ahmad, E. (2014). Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. En: Khan, M., Zaidi, A. & Musarrat, J. (eds) Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 31-62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5_2
- Kimble, K. W., Walker, J. P., Finegold, D. N., & Asher, S. A. (2006). Progress toward the development of a point-of-care photonic crystal ammonia sensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(4), 678–685. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0453-y>
- Kloepper, J. & Schroth, M. (1978). Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Plant Pathogenic Bacteria*, 2, 879-882.

- Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R. Lee, Y. P., Lee, B. L., Yu, M. C. & Ong, C. N. (2011). Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in Singapore Chinese Health Study. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 21 (9), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.12.005>.
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Arakere, U.C. Chowdappa, S. & Siddapura, N. (2020). Efficacy of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and *Trichoderma* strains in eliciting resistance against bacterial wilt in a tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 106. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00303-3>
- Kotasthane, A.S., Agrawal, T., Zaidi, N.W. & Singh, U. S. (2017). Identification of siderophore producing and cynogenic fluorescent *Pseudomonas* and a simple confrontation assay to identify potential bio-control agent for collar rot of chickpea. *3 Biotech*, 7, 137. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0761-2>
- Kour, D., Rana, K. L., Sheikh, I., Kumar, V., Yadav, A. N. Singh, D. H. & Kumar, A. (2020). Alleviation of Drought Stress and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas libanensis* EU-LWNA-33, a Drought-Adaptive Phosphorus-Solubilizing Bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 785–795. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01151-4>
- Kuan, K. B., Othman, R., Abdul Rahim, K., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PLOS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Kumar, A. y Dubey, A. (2020). Rhizosphere microbiome: Engineering bacterial competitiveness for enhancing crop production. *Journal of Advanced Research*, 24, 337–352. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.014>
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Srivastava, R. (2019). Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101271>
- Kumar, U., Shahid, M., Tripathi, R., Mohanty, S., Kumar, A., Bhattacharyya, P., Lal, B., Gautam, P., Raja, R., Panda, B. B., Jambhulkar, N. N., Shukla, A. K. & Kumar, A. (2017). Variation of functional diversity of soil microbial community in sub-humid tropical rice-rice cropping system under long-term organic and inorganic fertilization. *Ecological Indicators*, 73, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.10.014>

- Lara-Mantilla, C., Villalba-Anaya, M. & Oviedo-Zumaqué, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9 (2), 6-14. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/22205>
- Laslo, É. & Mara, G. (2019). Is PGPR an Alternative for NPK Fertilizers in Sustainable Agriculture?. En: Singh, D., Gupta, V., Prabha, R. (eds). *Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8391-53>
- Latef, A., Alhmad, M. F. A., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. & Zakir, A. (2020). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1293–1306. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>
- Lenka, S., Rajendiran, S., Coumar, V., Dotaniya, M. & Saha, J. (2016). Impact of Fertilizers use on Environmental Quality. In *Environmental concern for fertilizer use in future*. National Seminar held in Division of Environmental Soil Science, India.
- Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., & Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa* and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and Tillage Research*, 199, <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104577>
- Li, H.-B., Singh, R. K., Singh, P., Song, Q.-Q., Xing, Y.-X., Yang, L.-T., & Li, Y.-R. (2017). Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01268>
- Li, N., Wang, J., Wang, B., Huang, S., Hu, J., Yang, T., Asmutola, P., Lan, H. & Qinghui, Y. (2021). Identification of the Carbohydrate and Organic Acid Metabolism Genes Responsible for Brix in Tomato Fruit by Transcriptome and Metabolome Analysis. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.714942>
- Li, Z., Zhang, J., Liu, Y., Zhao, J., Fu, J., Ren, X., Wang, G. & Wang, J. (2016). Exogenous auxin regulates multi-metabolic network and embryo development, controlling seed secondary dormancy and germination in *Nicotiana tabacum* L. *BMC Plant Biology* 16, 41. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0724-5>
- Lin, G.-H., Chang, C.-Y., & Lin, H.-R. (2015). Systematic profiling of indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteria using LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 988, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.02.025>
- Loper, J. E., Hassan, K. A., Mavrodi, D. V., Davis, E. W., Lim, C. K., Shaffer, B. T., Elbourne, L., Stockwell, V. O., Hartney, S. L., Breakwell, K., Henkels, M. D., Tetu, S. G., Rangel, L. I.,

- Kidarsa, T. A., Wilson, N. L., van de Mortel, J. E., Song, C., Blumhagen, R., Radune, D., ... Paulsen, I. T. (2012). Comparative Genomics of Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Insights into Diversity and Inheritance of Traits Involved in Multitrophic Interactions. *PLoS Genetics*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (3), 280–287. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00035-9)
- López-Marín, L. (2017). Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum*). Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Luna-Coss, S., Perales Salvador, A., & Lastiri Salazar, A. (2017). Calentamiento global, población, alimentación y sustentabilidad: límites en el contexto económico y social del sector agropecuario en México. *Crece Empresarial Journal of Management and Development*, (1). <https://journalusco.edu.co/index.php/cempresarial/article/view/1567>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R. & Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants*, 9 (1), 97. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Martínez-Centeno, A. L., & Huerta-Sobalvarro, K. K. (2018). La revolución verde. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, 4(8), 1040–1052. <https://doi.org/10.5377/ribcc.v4i8.6717>
- Marschner, H. (1995). Nutrient availability in soil. En Mineral nutrition of higher plants. 2da ed. Elsevier, pp: 483-486
- Masood, S., Zhao, X. Q., & Shen, R. F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109581>
- Mena-Violante, H. G., & Olalde-Portugal, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.031>
- Mendoza-Pérez, C., Ramírez-Ayala, C., Martínez-Ruiz, A., Rubiños-Panta, J. E., Trejo, C. & Vargas-Orozco, A. G. (2018). Effect of number of stems in the production and quality of tomato grown in greenhouse. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(2), 355-366. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1077>
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H. & Appel, T. (2001) Calcium. En: Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H. & Appel T. (eds) Principles of Plant Nutrition. *Springer*, https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2_11

- Mohamed, E., Farag, A. & Youssef, S. (2018) Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* isolated from tomato plant rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 9, 266-277. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.93018>
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J.-L. (2020). The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. *Advances in Applied Microbiology*, 110, 149-180. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.12.002>
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M. & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias*, 17 (2), 24-34.
- Mordor Intelligence. (2021). Agricultural inoculants market - growth, trends, covid-19 impact, and forecasts (2021 - 2026). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/agricultural-inoculants-market#>
- Moreno, A., García, V., Reyes, J., Vásquez, J. & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 10(1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., & Young, M. (2003). Adoption of the transiently non-culturable state — a bacterial survival strategy? *Advances in Microbial Physiology*, 47, 65-129. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(03\)47002-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(03)47002-1)
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Naqqash, T., Hameed, S., Imran, A., Hanif, M. K., Majeed, A., & van Elsas, J. D. (2016). Differential Response of Potato Toward Inoculation with Taxonomically Diverse Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00144>
- Narendra, B. A., Jogaiah, S., Ito, S., Kestur Nagaraj, A., & Tran, L.-S. P. (2015). Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science*, 231, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.00>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170 (1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

- Navarro & Navarro. (2003). El nitrógeno en el suelo. En Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Segunda edición. Mundi-prensa, España, pp. 183-215.
- Navarro & Navarro. (2013). Elementos químicos y la vida vegetal. En Química agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas. Tercera edición. Mundi-prensa, España, pp. 229-232.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. Biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y moléculas relacionadas. En Lehninger, Principios de Bioquímica. pp 851-857.
- Nielsen, S. (2003) Chemical Properties and Characteristics of Foods. En Food Analysis. (eds). New York. pp. 219-238
- Noirot-Gros, M.-F., Shinde, S., Larsen, P. E., Zerbs, S., Korajczyk, P. J., Kemner, K. M., & Noirot, P. H. (2018). Dynamics of Aspen Roots Colonization by Pseudomonads Reveals Strain-Specific and Mycorrhizal-Specific Patterns of Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00853>
- Norma mexicana NMX-FF-031-1997-SCFI. Productos Alimenticios No Industrializados Para Consumo Humano - Hortalizas Frescas - Tomate - (*Lycopersicon esculentum* Mill.) – Especificaciones. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/1998/nmx-ff-031-1998.pdf>
- Nosheen, S., Ajmal, I. & Song, Y. (2021). Microbes as Biofertilizers, a Potential Approach for Sustainable Crop Production. *Sustainability*, 13 (4), 1868. <https://doi.org/10.3390/su13041868>
- Núñez-Ramírez, F., Grijalva-Contreras, R. L., Robles-Contreras, F., Macías-Duarte, R., Escobosa-García, M. I. & Santillano-Cázares, J. (2017). Nitrogen fertigation influence on nitrate concentration of nitrates on extract cellular of petiole, yield and quality of greenhouse tomato. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 49(2), 93-103. https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/9636/20172-cp07-nuez-ramirez.pdf
- Olanrewaju O. S., Glick B. R., Babalola O. O., (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2022a). El mercado mundial de fertilizantes: balance de la situación de un mercado en dificultades. <https://www.fao.org/3/ni280es/ni280es.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2022b). Surging food prices: FAO calls for import financing facility for poorer nations at G20 meeting. <https://www.fao.org/newsroom/detail/surging-food-prices-fao-calls-for-import-financing-facility-for-poorer-nations-at-g20-meeting/en>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2002). Perspectivas para el medio ambiente. Informe para Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s11.htm#r>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. (2018). More people, more food... worse water? - Water Pollution from Agriculture: a global review. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/CA0146EN>
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L. & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (8), 701-712. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9047>
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>
- Paguay, L. & Vasco, E. A. (2013). Aislamiento de bacterias solubilizadoras de calcio de la rizósfera de cultivos de alcachofa (*Cynara scolymus*) ubicados en Laso- Latacunga- Cotopaxi. [Tesis de grado. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito].
- Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15 (2), 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>
- Pandey, S. & Gupta, S. (2020). Evaluation of *Pseudomonas* sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77850-0>
- Parra-Gómez, M. A.; Lobato Ortiz, R.; García Zavala, J. J.; Reyes López, D. y Velasco Alvarado, M. J. (2016). Evaluación de líneas de una cruce interespecífica de tomate. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39 (1), 59–65. <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.1.59-65>
- Patiño-Torres, C. O. & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10 (2), 288-297. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265433711018>
- Peoples, M. B., Richardson, A. E., Simpson, R. J., & Fillery, I. R. P. (2014). Soil: Nutrient Cycling. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 197–210. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00094-2>

- Pérez-Rodríguez, M. M., Pontin, M., Lipinski, V., Bottini, R., Piccoli, P., & Cohen, A. C. (2020). *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* Increase Yield and Fruit Quality of Tomato Under Field Conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20, pages1614–1624. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00233-x>
- Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., & Ahmad, S. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (7), 919–929. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657809>
- Pierik, R.L.M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid. P. 15 y 35.
- Poncheewin, W., van Diepeningen, A.D., van der Lee, T.A.J., Suarez-Diez, M. & Schaap, P. J. (2022). Classification of the plant-associated lifestyle of *Pseudomonas* strains using genome properties and machine learning. *Scientific Reports* 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14913-4>
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture, 129–157. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815879-1.00007-0>
- Pratt, L. & Ortega, J. M. (2019). Agricultura protegida en México: elaboración de la metodología para el primer bono verde agrícola certificado. Banco Interamericano de Desarrollo. <http://dx.doi.org/10.18235/0001705>
- Preciado-Rangel, P., Rueda-Puente, E. O., Esparza-Rivera, J. R., García-Hernández, J. L. Orozco-Vidal, J. A., Lara-Herrera, A., Segura-Castruita, M. A. & Fortis-Hernández, M. (2011). Evaluación de soluciones nutritivas orgánicas en la producción de tomate en invernadero. *Interciencia*, 36(9),689-693. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33921204009>
- Rana, G., Mandal, T., Mandal, N. K., Sakha, D., & Meikap, B. C. (2015). Calcite Solubilization by Bacteria: A Novel Method of Environment Pollution Control. *Geomicrobiology Journal*, 32 (9), 846–852. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1010755>
- Ray, P., Lakshmanan, V., Labbé, J. L. & Craven, K. D. (2020) Microbe to Microbiome: A Paradigm Shift in the Application of Microorganisms for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622926>
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucia-Baldani, V. & Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica.

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 46 (1), 63-76.
<https://revista.cnice.cu/index.php/RevBiol/article/view/95>

Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Bejar, V., Sampedro, I. & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>

Rodríguez-Gámez, O., Aguilera-Rodríguez, I. & Pérez-Silva, R. M. (2013). Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos. *Revista Cubana de Química*, 25 (1), 3-8.
<https://cubanaquimica.uo.edu.cu/index.php/cq/article/view/803>

Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E., & Santoyo, G. (2016). Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 22(1), 45-58. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.06.009>

Roquigny, R., Novinscak, A., Biessy, A., Filion, M. (2017). Pseudomonadaceae: From Biocontrol to Plant Growth Promotion. In: Mehnaz, S. (eds) Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. *Microorganisms for Sustainability*, vol 2. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3_3

Rosa-Rodríguez, R., Lara-Herrera, A., Lozano-Gutiérrez, J., Padilla-Bernal, L. E., Jesús Avelar-Mejía, J. & Castañeda-Miranda, R. (2016). Rendimiento y calidad de tomate en sistemas hidropónicos abierto y cerrado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícola*, 17. p. 3439-3452

Rudolph, N., Labuschagne, N., & Aveling, T. A. S. (2015). The effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling growth of maize. *Seed Science and Technology*, 43 (3), 507–518. <https://doi.org/10.15258/sst.2015.43.3.04>

Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring Plant-Associated Microbial Inoculants in Agriculture - A Roadmap for Successful Application. *Journal of Experimental Botany*, 71 (13), 3878-3901. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa111>

Salgado, G. S. & Núñez, E. (2012). Manejo de fertilizantes químicos y orgánicos. Biblioteca Básica para la Agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo de México. 146 p.

Sánchez-López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3 (7), 1401-1415.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v3i7.1346>

- Sanjuan-Delmás, D., Josa, A., Muñoz, P., Gassó, S., Rieradevall, J., & Gabarrell, X. (2020). Applying nutrient dynamics to adjust the nutrient-water balance in hydroponic crops. A case study with open hydroponic tomato crops from Barcelona. *Scientia Horticulturae*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108908>
- Santos, M. S., Nogueira, M. A. & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9 (1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Santoyo, G.; Guzmán-Guzmán, P.; Parra-Cota, F.I.; Santos-Villalobos, S.d.I., Orozco-Mosqueda, M.d.C.; Glick, B.R. (2021). Plant Growth Stimulation by Microbial Consortia. *Agronomy*, 11 (2), 219. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>
- Saravaiya, S. N., Patel, N. B. & Kumar, S. (2014). Protected Cultivation: Future Technology for Vegetable Crops. Conference: Global Conference on Technological Challenges and Human Resources for Climate Smart Horticulture- Issues and Strategies, Navsari.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E. U. B., Sadhana, B. & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (4), 2133–2144. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>
- Savci, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3 (1): 73-80. <https://doi.org/10.7763/IJESD.2012.V3.191>
- Scagliola, M., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Cesco, S., Crecchio, C. & Pii, Y. (2021). Bioinoculants as Promising Complement of Chemical Fertilizers for a More Sustainable Agricultural Practice. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.622169>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. [Archivo PDF]. <https://n9.cl/3c7r>
- Secretaría de Desarrollo Rural y Agroalimentario (SEDRUA). (2018). Michoacán, segundo productor nacional de jitomate. <https://n9.cl/7teiz>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. (2022). Expectativas agroalimentarias. <https://bmeditores.mx/wp-content/uploads/2022/04/Expectativas-21-ABRIL-2022-337-DE-LA-TARDE.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2018). Superficie Agrícola Protegida. <http://www.agricultura.gob.mx/siap/superficie-agricola-protegida>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2020). Avance de Siembras y Cosechas. Resumen por estado.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2021). Panorama Agroalimentario. https://nube.siap.gob.mx/panorama_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2022a). Escenario mensual de productos agroalimentarios. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/621464/Escenario_Tomate_rojo__Jitomate__feb_2021.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2022b). Escenario mensual de productos agroalimentarios. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/732608/Jitomate_Mayo.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SENASICA. (2016). La aplicación de sistemas de protección garantiza la disposición de frutas y verduras todo el año. <https://n9.cl/va21l>
- Shameer, S. & Prasad, T.N. (2018) Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>
- Shamshiri, R. R. 2014. Determining Peak-hours of Cooling Requirement for Greenhouse Production of Tomato in Tropical Lowland Condition. Conference: 2nd International Conference on Agricultural and Food Engineering, CAFEi2014At: Kuala Lumpur, Malaysia Volume: 2
- Sharma, L., Shukla, S. K., Jaiswal, V. P., Gaur, A., Pathak, A. D., Sharma, K. K. & Singh, S. K. (2021). Importance of PGPRs in the Rhizosphere. In: Nath M., Bhatt D., Bhargava P., Choudhary D.K. (eds) *Microbial Metatranscriptomics Belowground*. Springer, Singapore, pp. 141-161. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9758-9_7
- Sharma, L., Shukla, S. K., Jaiswal, V. P., Gaur, A., Pathak, A. D., Sharma, K. K. & Singh, S. K. (2021). Importance of PGPRs in the Rhizosphere. In: Nath M., Bhatt D., Bhargava P., Choudhary D.K. (eds) *Microbial Metatranscriptomics Belowground*. Springer, Singapore, pp. 141-161. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9758-9_7
- Sharma, M., Singh, D., Saksena, H. B., Sharma, M., Tiwari, A., Awasthi, P., Botta, H. K., Shukla, B. N. & Laxmi, A. (2021). Understanding the Intricate Web of Phytohormone Signalling in Modulating Root System Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5508. <https://doi.org/10.3390/ijms22115508>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587–600. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

- Shuai, H., Meng, Y., Luo, X., Chen, F., Zhou, W., Dai, Y., Qi, Y., Du, J., Yang, F., Liu, J., Yang, W. & Shu, K. (2017). Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13093-w>
- Singh, M., & Pandey, K. D. (2021). Endophytic bacterial strains modulated synthesis of lycopene and bioactive compounds in *Solanum lycopersicum* L. fruit. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102088>
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., & Vanderleyden, J. (2013). Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*, 201(3), 850–861. <https://doi.org/10.1111/nph.12590>
- Steiner, A. A. (1961). A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant Soil* 15, 134–154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Stoll, A., Salvatierra-Martínez, R., González, M., Cisternas, J., Rodríguez, A., Vega-Gálvez, A. & Bravo, J. (2021). Importance of crop phenological stages for the efficient use of PGPR inoculants. *Scientific Reports*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98914-9>
- Suárez, O., Hurtado Salazar, A., & Ceballos Aguirre, N. (2017). Número de racimos y la sostenibilidad económica del tomate bajo condiciones semicontroladas. *Temas Agrarios*, 23 (1), 55-61. <https://doi.org/0.21897/rta.v23i1.1144>
- Subrahmanyam, G., Kumar, A., Sandilya, S. P. Chutia, M. & Yadav, A. N. (2020). Diversity, plant growth promoting attributes, and agricultural applications of rhizospheric microbes. En: Yadav, A. N., Singh, J., Rastegari, A. A. Yadav, N. (eds). *Plant microbiomes for sustainable agricultura*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2003). Assimilation of mineral nutrients. In: *Plant Physiology*. Panima Publishing Corp. New Delhi, India. pp: 259-282.
- Terralia, 2017. Agroquímicos de México. https://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/composition_index
- Tsegaye, Z. Assefa, F. & Beyene, D. (2017). Properties and Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *International Journal of Current Trends in Pharmacobiology and Medical Sciences*, 2(1), 30-43. <https://doi.org/10.15413/ajmr.2017.0104>

- Turner, F. T., & Jund, M. F. (1991). Chlorophyll Meter to Predict Nitrogen Topdress Requirement for Semidwarf Rice. *Agronomy Journal*, 83(5), 926. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300050029x>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.0035>
- Vargas-Canales, J. M., Palacios-Rangel, M. I., Aguilar-Ávila, J., Camacho-Vera, J. H., Ocampo-Ledesma, J. G. & Medina-Cuellar, S. E. (2018). Efficiency of small enterprises of protected agriculture in the adoption of innovations in Mexico. *Estudios Gerenciales* 34 (146), 52-62. <https://doi.org/10.18046/j.estger.2018.146.2811>
- Vats, S., Bansal, R., Rana, N., Kumawat, S., Bhatt, V., Jadhav, P., Kale, V., Sathe, A., Sonah, H., Jugdaohsingh, R., Sharma, T. J. & Deshmukh, R. (2020). Unexplored nutritive potential of tomato to combat global malnutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22, 1–32. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1832954>
- Vega-Celedón, P., Bravo, G., Velásquez, A., Cid, F. P., Valenzuela, M., Ramírez, I., Vasconez, I-N, Álvarez, I., Jorquera, M. A., & Seeger, M. (2021). Microbial Diversity of Psychrotolerant Bacteria Isolated from Wild Flora of Andes Mountains and Patagonia of Chile towards the Selection of Plant Growth-Promoting Bacterial Consortia to Alleviate Cold Stress in Plants. *Microorganisms*, 9(3), 538. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030538>
- Verbon, E. H., & Liberman, L. M. (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, 21 (3), 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Vivanco-Calixto, R., Molina-Romero, D., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Munive-Hernández, J. A., Baez-Rogelio, A. & Muñoz-Rojas, J. (2016). Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP*, 1 (1), 1–10. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5069043>
- Vyas, P., Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology* 9, (174). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-174>
- Wang, C., Wang, D., & Zhou, Q. (2004). Colonization and persistence of a plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain CS85, on roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(7), 475–481. <https://doi.org/10.1139/w04-040>

- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C. & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME Journal*, 11, 1602–1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39 (8), 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- White, P. J. & Broadley, M. R. (2003). Calcium in Plants. *Annals of Botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Wu, C. H., Bernard, S. M., Andersen, G. L., & Chen, W. (2009). Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology*, 2(4), 428–440. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00109.x>
- Xia, Y., Xu, Y., Li, J., Zhang, C., & Fan, S. (2019). Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. *Artificial Intelligence in Agriculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aiia.2019.05.001>
- Yadav, B. K., Akhtar, M. S. & Panwar, J. (2015). Rhizospheric plant-microbe interactions: Key factors to soil fertility and plant nutrition. En: Arora, N. (eds) *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, New Delhi, pp. 127–145. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_6
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., ... Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7564–7569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801093105>
- Yan, Z., Reddy, M. S., & Kloepper, J. W. (2003). Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(6), 383–389. <https://doi.org/10.1139/w03-051>
- Zaidi, A., Khan, M. S., Saif, S., Rizvi, A., Ahmed, B. & Shahid, M. (2017). Role of nitrogen-fixing plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. En: Zaidi, A., Khan, M. (eds) *Microbial Strategies for Vegetable Production*. Springer, Cham, pp. 49-79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54401-4_3
- Zboralski, A., & Fillion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19(18), 3539-3554. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.025>
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by

- Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(7), 1411.
<https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
- Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2015). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 528, 51–59.
<https://doi.org/10.1038/nature15743>
- Zhao, G., & Zhong, T. (2013). Influence of exogenous IAA and GA on seed germination, vigor and their endogenous levels in *Cunninghamia lanceolata*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 28(6), 511–517. <https://doi.org/10.1080/02827581.2013.783099>
- Zhao, T., Nakano, A., & Iwasaki, Y. (2021). Differences between ethylene emission characteristics of tomato cultivars in tomato production at plant factory. *Journal of Agriculture and Food Research*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.20>
- Zineb, A. B., Trabelsi, D., Ayachi, I., Barhoumi, F., Aroca, R. & Mhamdi, R. (2019): Inoculation with Elite Strains of Phosphate-Solubilizing Bacteria Enhances the Effectiveness of Fertilization with Rock Phosphates. *Geomicrobiology Journal*, 37 (1), 22-30.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1658826>
- Zou, Z. Y., Xu, X. R., Lin, X. M., Zhang, H. B., Xiao, X., Ouyang, L., Huang, Y. M., Wang, X. & Liu, Y. Q. (2014). Effects of lutein and lycopene on carotid intima–media thickness in Chinese subjects with subclinical atherosclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 111 (3), 474–480.
<https://doi.org/10.1017/S0007114513002730>

10. Anexos

Anexo 1. Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Componente	Cantidad / L
Extracto de levadura	2.5 g
Triptona	5.0 g
D-glucosa	1.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

pH final: 7.0 ± 0.1

Anexo 2. Agar Nutritivo.

Componente	Cantidad / L
Peptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

pH final: 6.8 ± 0.2

Anexo 3. Agar Soya Tripticaseína.

Componente	Cantidad / L
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de soya	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

pH final: 7.3 ± 0.2

Anexo 4. Medio semisólido NFb.

Componente	Cantidad / L
Ácido málico	5.0 g
Fosfato de potasio dibásico	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Hidróxido de potasio	4.5 g
Sulfato de hierro	0.56 g
Azul de bromotimol al 0.5% en KOH 1N	2.0 mL
* Solución de micronutrientes	2.0 mL
Agar bacteriológico	2.0 g

pH final: 7.0 ± 0.2

* Solución de micronutrientes	Cantidad / 200 mL
Ácido bórico	0.286 g
Sulfato de manganeso	0.235 g
Sulfato de zinc	0.024 g
Sulfato de cobre	0.008 g
Molibdato de sodio	0.2 g

Anexo 5. Caldo Extracto de Suelo.

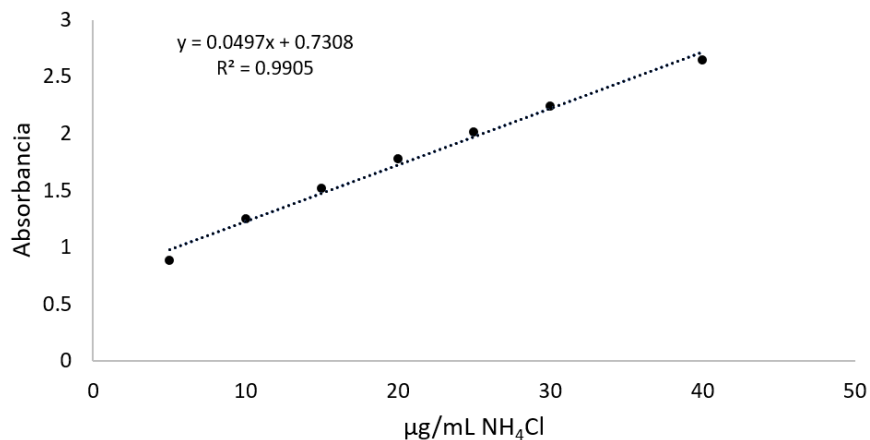
Componente	Cantidad por Litro
Fosfato de potasio dibásico	0.4 g
Cloruro de magnesio	0.1 g
Sulfato de magnesio	0.05 g
Cloruro de hierro	0.01 g
Cloruro de calcio	0.1 g
Triptona	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
* Extracto de suelo al 10%	250 mL

pH final: 7.3 ± 0.2

* Extracto de suelo al 10%:

Mezclar 250.0 g de suelo rizosférico con 500.0 mL de agua destilada y hervir por dos horas. Posteriormente, completar a 500.0 mL con agua destilada, dejar sedimentar el suelo y filtrar el sobrenadante. Tomar 25.0 mL del filtrado y aforar a 500.0 mL con agua destilada.

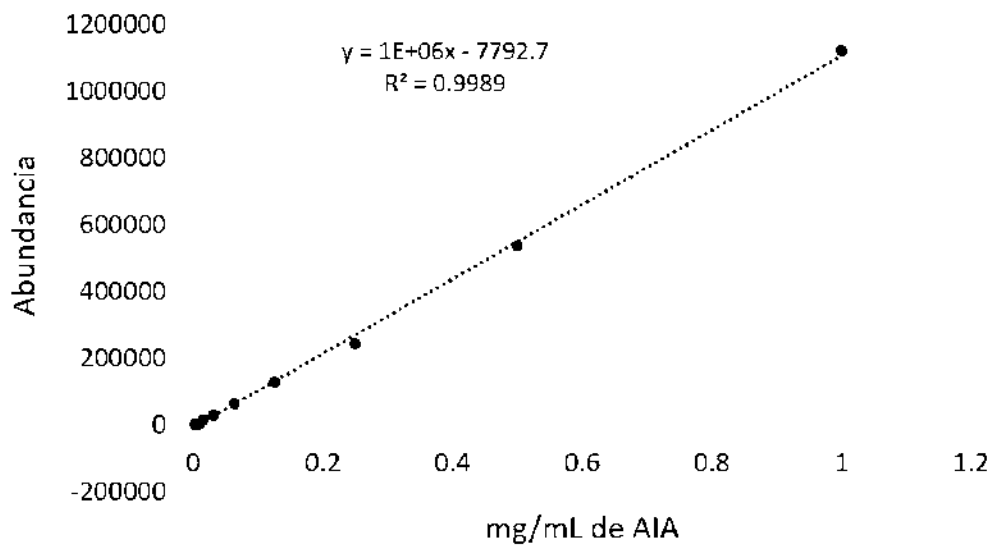
Anexo 6. Curva de calibración de cloruro de amonio (NH_4Cl).



Anexo 7. Reactivo de Salkowsky.

Componente	Cantidad para 1 L
Cloruro férrico	4.5 g
Ácido sulfúrico 10.8 M	1 L

Anexo 8. Curva de calibración de AIA.



Anexo 9. Medio del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP).

Componente	Cantidad por Litro
Dextrosa anhidra	10 g
Fosfato tricálcico	5 g
Cloruro de Magnesio	5 g
Sulfato de magnesio	0.25 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Sulfato de amonio	0.1 g
Agar bacteriológico	14.0 g

Anexo 10. Medio Pikovskaya modificado para solubilización de calcio.

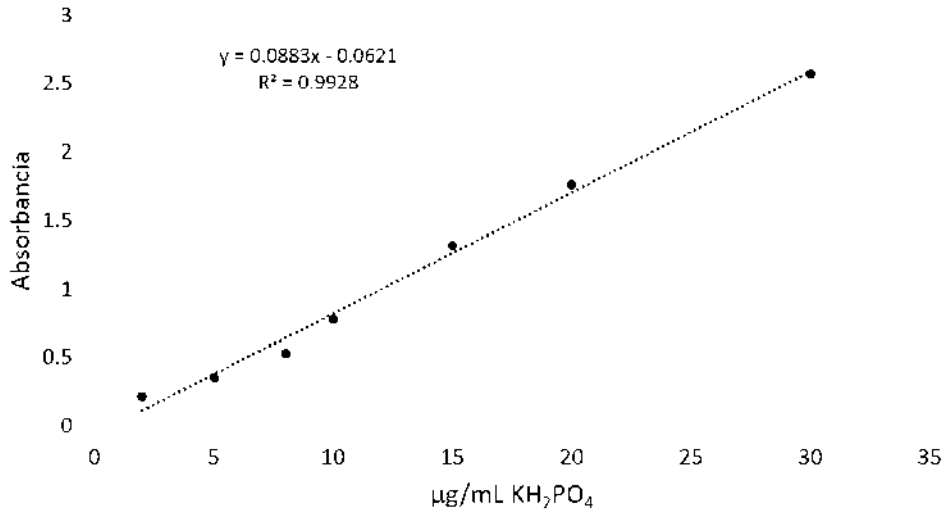
Componente	Cantidad por Litro
Dextrosa anhidra	10 g
Carbonato de calcio	5 g
Sulfato de amonio	0.5 g
Cloruro de sodio	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Sulfato de manganeso	0.1 g
Agar bacteriológico	15.0 g

Anexo 11. Reactivos del método de azul de fosfomolibdenO

Ácido sulfúrico 5N	70 mL de H ₂ SO ₄ a una pureza de 98.08% en 500 mL de agua destilada.
Molibdato de amonio (1% p/v)	Disolver 20 g de molibdato en 500 mL de agua destilada. Almacenar en frasco de vidrio ámbar.
Ácido ascórbico (0.1M)	Disolver 1.32 g de ácido ascórbico en 75 mL de agua destilada. Mantener en oscuridad y a 4°C.
Tartrato de antimonio y potasio (1 mg/mL)	Disolver 0.2743 g de tartrato de antimonio y potasio en 100 mL de agua estilada.
Mezcla de reactivos	Mezclar 125 mL de H ₂ SO ₄ 5 N, 37.5 mL de molibdato de amonio, 75 mL de ácido ascórbico y

12.5 mL de la solución de tartrato de antimonio y potasio.

Anexo 12. Curva de calibración de fosfato monopotásico (KH_2PO_4).



Anexo 13. Solución nutritiva Steiner al 50 y 100%

ELEMENTO	SNS al 50%		SNS al 100%	
	mg/L	meq/L	mg/L	meq/L
Nitrógeno	120.44	8.6	230	16.4
Fósforo	13.57	0.4	26	0.8
Calcio	129.45	6.5	260	13
	mg/L		meq/L	
Potasio	275.07		7.1	
Azúfre	225.01		14	
Magnesio	101.35		8.3	
Hierro	2.35		0.084	
Manganeso	1.15		0.042	
Cobre	0.124		0.042	
Zinc	0.25		0.008	
Boro	0.215		0.040	
Molibdeno	0.08		0.002	