

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN DEL USO DE DIFERENTES DOSIS DE UN BIOFERTILIZANTE  
A BASE DE *Azospirillum brasilense* Y MICORRIZA EN EL CRECIMIENTO EN UN  
CULTIVO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

**Tesis**

Que presenta VERÓNICA ELIZABETH NIÑO VILLANUEVA  
como requisito parcial para obtener el Diploma como  
ESPECIALISTA EN MANEJO SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES DE  
ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS

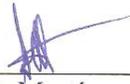
Saltillo, Coahuila

Diciembre 2019

EVALUACIÓN DEL USO DE DIFERENTES DOSIS DE UN BIOFERTILIZANTE  
A BASE DE *Azospirillum brasilense* Y MICORRIZA EN EL CRECIMIENTO EN UN  
CULTIVO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

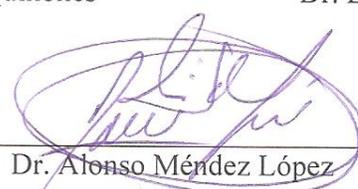
Tesis

Elaborada por VERÓNICA ELIZABETH NIÑO VILLANUEVA como requisito parcial  
para obtener el Diploma como ESPECIALISTA EN MANEJO SUSTENTABLE DE  
RECURSOS NATURALES DE ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS con la supervisión  
y aprobación del Comité de Asesoría

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Yudith Martínez Amador  
Asesor principal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rosa María Garza Quiñones  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Samaniego Moreno  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alonso Méndez López  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## **Agradecimientos**

Al ser Omnipotente que en todo momento me acompaña.

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por la formación de profesionistas orientados al cuidado del medio ambiente.

A CONACYT por el trabajo de incentivar la producción científica y tecnológica del país.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por la oportunidad del intercambio de conocimientos durante mi estancia de investigación.

A la Dra. Silvia Yudith Martínez Amador, mi asesora principal, por impulsarme a buscar este crecimiento profesional.

A la Dra. Rosa María Garza Quiñones, al Dr. Luis Samaniego Moreno y al Dr. Alonso Méndez López, mis asesores, por su acompañamiento durante el desarrollo de mis estudios.

A la Dra. Libia Iris Trejo Téllez, mi asesora adjunta, por la invaluable experiencia de trabajar en el Laboratorio a su digno cargo, y sus conocimientos compartidos.

Al personal del Laboratorio de Nutrición de Cultivos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo: Ing. Soledad, Lic. Roberto. Lic. Juan Manuel, Srita. Laura, M. C. Víctor, Ing. Wenceslao, por integrarme a su equipo de trabajo.

A la Srita. Cony Tello Quintero, por su amable orientación y apoyo en los trámites administrativos.

A la M. C. María del Socorro Bahena García, por su valiosa gestión y guía.

A mi compañera de estudios Ing. Beatriz Corvera Morales, gracias por brindarme su amistad.

A mis sobrinos Tamara Guadalupe Cárdenas Niño, Marco Antonio Hernández Niño por su colaboración durante el desarrollo del experimento.

## **Dedicatoria**

A mi esposa Gricelda Jazmín Valdés Moreno, a mi madre Ma. De la Cruz Villanueva Delgado, con mucho cariño dedico este trabajo a mis seres amados, por quienes emprendí este proyecto en busca de nuevos horizontes, que además de brindarme más conocimientos, sirvan para mejorar nuestras vidas.

En memoria a mí querido y amado cuñado Ing. Martín Lázaro Cárdenas López+, por ser un ejemplo de vida, por tu humildad, lealtad, perseverancia, respeto, responsabilidad y amor, tu partida no sólo deja una profunda huella, sino una gran lección. Harás falta en los campos, pero tu recuerdo permanecerá por siempre, por cada gota de agua hay una oración para ti.

## Índice General

Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Índice General.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
JUSTIFICIACIÓN.....	2
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	4
Micorrizas.....	6
Cultivo de Espinaca.....	8
Características generales para cosecha.....	8
Análisis de crecimiento del cultivo.....	9
Coefficiente de partición de biomasa.....	9
Índices de crecimiento.....	9
Tasa de crecimiento relativo.....	9
Tasa de asimilación neta.....	9
Relación de peso foliar.....	9
Área foliar específica.....	9
Análisis químico del material vegetal.....	10
Análisis de suelo.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Ubicación del campo de investigación.....	14
Diseño experimental.....	16
Descripción de tratamientos.....	17
Desarrollo experimental.....	17

Análisis estadístico de datos .....	35
Modelo estadístico .....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
CONCLUSIONES .....	59
REFERENCIAS .....	60

## Índice de Tablas

Tabla 1. Rangos de suficiencia de concentración de macro y micronutrientes para el cultivo de espinaca.....	11
Tabla 2. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para macronutrientes en hojas de espinaca.....	12
Tabla 3. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para micronutrientes en hojas de espinaca.....	13
Tabla 4. Descripción de los tratamientos.....	17
Tabla 5. Número de muestreo, fecha, intervalo y tiempo en días.....	17
Tabla 6. Análisis químico del suelo agrícola y del sustrato utilizado en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay.....	34
Tabla 7. Resultados de la emergencia de las semillas de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay.....	36
Tabla 8. Análisis de varianza y comparación de medias del área foliar en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	37
Tabla 9. Análisis de varianza y comparación de medias del largo de la raíz en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	37
Tabla 10. Análisis de varianza y comparación de medias del diámetro del tallo en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	38
Tabla 11. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco de la hoja en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	39
Tabla 12. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco del tallo en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	39
Tabla 13. Análisis de varianza y comparación de medias de peso seco de raíz en	

un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	40
Tabla 14. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco total en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza .....	41
Tabla 15. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa de hoja en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	41
Tabla 16. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa de tallo en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	42
Tabla 17. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa en un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	42
Tabla 18. Índices de crecimiento de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	43
Tabla 19. Área foliar específica (AFE), y relación de peso foliar (RPF) de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza.....	44
Tabla 20. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para macronutrientes en hojas de espinaca.....	44
Tabla 21. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para micronutrientes en hojas de espinaca.....	45
Tabla 22. Valores de concentración de macro y micro nutrientes obtenidos de los análisis varianza y comparación de medias de tejido vegetal (hojas) de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> ) var. Viroflay.....	45

## Índice de Figuras

Figura 1. Imagen satelital del Edificio de Botánica y del Invernadero No. 2 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. (Fuentes: Google Earth/INEGI 2019).....	14
Figura 2. Imagen satelital del Edificio de Botánica y del Invernadero No. 2 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. (Fuentes: Google Earth/INEGI 2019).....	15
Figura 3. Imagen satelital del Edificio de Edafología e Hidrociencia del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en Texcoco, Estado de México, México. (Fuentes: Google Earth/INEGI 2019).....	16
Figura 4. Siembra de 300 semillas de espinaca coinoculadas en sustrato PRO-MIX en charolas germinadoras.....	18
Figura 5. Siembra de 100 semillas de espinaca sin coinocular en sustrato PRO-MIX en charola germinadora .....	19
Figura 6. Semillas de espinaca coinoculadas sembradas en charolas de germinación.....	19
Figura 7. Germinación de semillas de espinaca coinoculadas.....	19
Figura 8. Germinación de semillas sin coinocular.....	20
Figura 9. Preparación del sustrato, mezcla 1:1:1 de: peat moss + perlita + suelo agrícola.....	20
Figura 10. Etiquetado y acomodo de macetas en una cama de la parte posterior del Invernadero No. 2.....	20
Figura 11. Trasplante de plántulas de espinaca a los 25 días después de la siembra.....	21
Figura 12. Tambos de 60 litros de capacidad etiquetados y con soluciones nutritivas colocados dentro del invernadero .....	21
Figura 13. Trasplante de plántulas del tratamiento Testigo absoluto.....	22

Figura 14. Trasplante de plántulas del tratamiento de coinoculación.....	22
Figura 15. Coinoculación de plántula después del trasplante.....	23
Figura 16. Macetas del primer muestreo.....	23
Figura 17. Medición del largo de la raíz con vernier Marca Mitutoyo Modelo CD-6”C.....	24
Figura 18. Medición del diámetro del tallo con vernier Marca Mitutoyo Modelo CD-6”C.....	24
Figura 19. Medición de área foliar en el integrador Marca LI-COR Modelo LI3100C.....	24
Figura 20. Obtención de peso fresco de hojas de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay en una balanza semi analítica Marca OHAUS Modelo 293A.....	25
Figura 21. Secado de muestras en horno de secado Marca TERLAB Modelo TE-H70DM.....	25
Figura 22. Los 0.25g de muestra pesados en una balanza analítica Modelo Marca OHAUS Modelo E01140 EXPLORER DE PRECISIÓN colocados en un tubo de ensaye con aforo 25 ml.....	27
Figura 23. Molienda de muestras de materia seca en una licuadora Marca OSTERIZER Blender Modelo 004093-008-NP0, con aspas de acero inoxidable para evitar la contaminación de la muestra.....	28
Figura 24. Adición de 2 ml de mezcla de ácidos a la muestra, bajo una campana de absorción de humos Marca TERMO SCIENTIFIC HAMILTON Modelo SAFEAIRE II .....	28
Figura 25. Adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para digestión húmeda de las muestras bajo una campana de extracción de humos Marca HAMILTON TERMO SCIENTIFIC Modelo SAFEAIRE II.....	29
Figura 26. Colocación de los tubos con ácidos en una parrilla de calentamiento para calentar arena y tubos de vidrio de fabricación nacional debido a los vapores de ácidos, se calientan bajo una campana de extracción de humos Marca HAMILTON TERMO SCIENTIFIC Modelo SAFEAIRE II.....	29
Figura 27. Retiro de las muestras que permanecieron en la plancha por un período de entre 2 y 3 h, el digestado se tornó transparente y tuvo un volumen de	

aproximadamente 1 ml.....	29
Figura 28. Se dejaron enfriar las muestras y se adicionó agua desionizada hasta el volumen de 25 ml.....	30
Figura 29. Filtrado del digestado en frascos de vidrio usando papel filtro de poro medio .....	30
Figura 30. Se tomó una alícuota de 10 mL de filtrado para la determinación de la concentración de N.....	31
Figura 31. Se colocó en el equipo de destilación los 10 ml del filtrado, se adicionaron 10 ml de NaOH (50%), e inició el calentamiento.....	31
Figura 32. El destilado se recibió en 20 ml ácido bórico al 4% más 0.2 ml de indicador (verde bromocresol y rojo de metilo), en matraces Erlenmeyer hasta alcanzar un volumen aproximado de 50 ml.....	32
Figura 33. Titulación con la solución de ácido sulfúrico 0.05 N previamente colocado en la microbureta de 10 ml hasta que se presentó el vire de color azul a rosa.....	33
Figura 34. Succión de muestra a la cámara de atomización, ICP-Optical Emission Spectrometer Marca VARIAN Modelo 725-ES.....	34
Figura 35. Comparación de concentración de N en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	45
Figura 36. Comparación de acumulación de N en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	46
Figura 37. Comparación de concentración de P en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	47
Figura 38. Comparación de acumulación de P en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un	

biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	47
Figura 39. Comparación de concentración de K en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	48
Figura 40. Comparación de acumulación de K en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	49
Figura 41. Comparación de concentración de Ca en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	49
Figura 42. Comparación de acumulación de Ca en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	50
Figura 43. Comparación de concentración de Mg en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	51
Figura 44. Comparación de acumulación de Mg en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	51
Figura 45. Comparación de concentración de Fe en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	52
Figura 46. Comparación de acumulación de Fe en muestras de hojas de un cultivo	

de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	53
Figura 47. Comparación de concentración de Cu en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	54
Figura 48. Comparación de acumulación de Cu en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	54
Figura 49. Comparación de concentración de Zn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	55
Figura 50. Comparación de acumulación de Zn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	55
Figura 51. Comparación de concentración de Mn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	56
Figura 52. Comparación de acumulación de Mn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	57
Figura 53. Comparación de concentración de B en muestras de hojas de un cultivo de espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de <i>A. brasilense</i> y micorriza, a los 55 días después de la siembra.....	57

Figura 54. Comparación de acumulación de B en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra..... 58

## RESUMEN

EVALUACIÓN DEL USO DE DIFERENTES DOSIS DE UN BIOFERTILIZANTE A BASE DE *Azospirillum brasilense* Y MICORRIZA EN EL CRECIMIENTO EN UN CULTIVO DE ESPINACA (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

Por

VERÓNICA ELIZABETH NIÑO VILLANUEVA

ESPECIALIDAD EN MANEJO SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES DE ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. SILVIA YUDITH MARTÍNEZ AMADOR - ASESOR -

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2019

El uso de microorganismos rizosféricos cada vez es más frecuente en la agricultura ya que estos han demostrado ser capaces de estimular el crecimiento de las plantas debido al amplio rango de interacciones benéficas que establecen con las raíces y la activación de mecanismos como la producción de sideróforos, antibióticos, inducción de resistencia al estrés biótico y abiótico y, la fijación de nitrógeno. En el presente trabajo se evaluó el efecto del uso de diferentes dosis de un biofertilizante a base de *Azospirillum brasilense* y micorriza en un cultivo de espinaca. La investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos corresponden a T1 (Testigo absoluto sin coinoculación ni solución nutritiva), T2 (Solución nutritiva Steiner Completa), T3 (Coinoculación en siembra y trasplante + solución nutritiva Steiner -N -P), T4 (Coinoculación en siembra, trasplante y diez días después del trasplante + solución nutritiva Steiner - N, -P), T5 (Coinoculación en siembra, trasplante, diez y 20 días después del trasplante + Solución nutritiva Steiner -N -P). Previo a la siembra, las semillas se coinoculaban con los microorganismos durante 24 horas, posteriormente se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades. Cuando las plántulas estuvieron listas fueron trasplantadas a bolsas negras que contenían como sustrato una mezcla de peat moss + perlita + suelo agrícola en proporción 1:1:1. Los resultados obtenidos revelaron el T5 (Coinoculación en siembra, trasplante, diez y 20 días después del trasplante + Solución nutritiva Steiner -N -P) obtuvo el mayor peso seco de hoja, en comparación con el T1 (Testigo absoluto sin coinoculación ni solución nutritiva), superior en un 20.68%. Así mismo en cuanto a suficiencia de N y P, se reportó un rango adecuado para cultivo de espinaca en el T4 (Coinoculación en siembra, trasplante y diez días después del trasplante + solución nutritiva Steiner - N, -P). Los resultados indican que los microorganismos contenidos en el biofertilizante contribuyeron a proporcionar los nutrientes requeridos por la planta para su crecimiento y alcanzar el rango adecuado de suficiencia de nutrimentos.

Palabras clave: *Azospirillum brasilense*, micorrizas, suficiencia, nutrimentos, *Spinacia oleracea* L., crecimiento.

## ABSTRACT

EVALUATION OF USE OF DIFFERENT DOSAGES OF *Azospirillum brasilense*  
BIOFERTILIZER AND MYCORRHIZA IN THE GROWTH OF SPINACH CROP  
(*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

By

VERÓNICA ELIZABETH NIÑO VILLANUEVA

SPECIALIST IN SUSTAINABLE MANAGEMENT OF NATURAL RESOURCES IN ARID  
AND SEMIARID ZONES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Ph. D. SILVIA YUDITH MARTÍNEZ AMADOR - THESIS ADVISOR -

Saltillo, Coahuila

December 2019

The use of rhizosphere microorganisms is increasingly common in agriculture as they have shown to be able to stimulate plant growth due to the wide range of beneficial interactions they establish with the roots. Additionally, they activate several mechanisms, such as the production of siderophores, antibiotics, induction of resistance to biotic and abiotic stress and, nitrogen fixation. In the present work the effect of the use of different doses of a biofertilizer based on *Azospirillum brasilense* and mycorrhiza in a spinach culture was evaluated. The research was carried out at the Antonio Narro Autonomous Agrarian University and at the Montecillo Campus Graduate College. A randomized complete block design with five treatments and four repetitions was used. The treatments correspond to T1 (Absolute Witness without co-inoculation or nutritive solution), T2 (Complete Steiner Nutrient Solution), T3 (Seeding and Transplant Coinoculation + Steiner -N -P Nutrient Solution), T4 (Seeding, Transplant and Ten Day Coinoculation after transplantation + Steiner nutrient solution - N, -P), T5 (Seed co-inoculation, transplant, ten and 20 days after transplantation + Steiner nutrient solution - N-P). Prior to the sowing, the seeds were co-inoculated with the microorganisms for 24 hours, then planted in 200-cavity polystyrene trays. When the seedlings were ready, they were transplanted into black bags containing as a substrate a mixture of peat moss + perlite + agricultural soil in a 1: 1: 1 ratio. The results obtained showed that the T5 (co-inoculation in sowing, transplantation, ten and 20 days after the transplant + Nutritive solution Steiner -N-P) obtained the highest dry weight of the leaf, compared to T1 (Absolute witness without co-inoculation or nutrient solution), higher by 20.68%. Likewise in terms of N and P sufficiency, a suitable range for spinach culture was reported in T4 (Coinoculation in seeding, transplantation and ten days after transplantation + Steiner - N, -P nutritive solution). The results indicate that the microorganisms contained in the biofertilizer contributed to provide the nutrients required by the plant for its growth and reach the appropriate range of nutrient sufficiency.

Key words: *Azospirillum brasilense*, mycorrhiza, *Spinacia oleracea* L., nutritional, growth.

## INTRODUCCIÓN

Dada la crisis ambiental ocasionada por el mal uso de fertilizantes y plaguicidas, el uso de los microorganismos benéficos hace más eficiente el aprovechamiento de los nutrientes (adicionados o disponibles en el suelo) apoyando así la sostenibilidad agrícola (Alcántar-González *et al.*, 2016). La actividad biológica de los suelos tiene un papel preponderante en el logro de cultivos de alto rendimiento. Los microorganismos en asociación con los cultivos son importantes, como insumos, para el mejoramiento de la producción y el control ambiental; además permiten el mantenimiento de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas (Carvajal y Mera, 2010).

La interacción raíz-suelo se define como efecto de rizosfera, y se refiere a la influencia que tienen en el sistema radical en el suelo adyacente a la superficie de la raíz. Fisiológicamente, la raíz ejerce influencia directa en las comunidades microbianas por efecto de la exudación de componentes orgánicos que son fácilmente asimilables y conforman la principal fuente de nutrición y energía para los diversos microorganismos rizosféricos (Ferrera-Cerrato y Alarcón 2007; De la Fuente, 2007).

Dentro de los diversos microorganismos que viven en la rizosfera, existe un grupo de bacterias capaces de estimular el crecimiento de las plantas. Estas bacterias son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), y establecen un amplio rango de interacciones benéficas con las raíces; así, algunas de ellas producen hormonas vegetales que estimulan el crecimiento de las plantas (Días *et al.*, 2009). El efecto beneficioso de las rizobacterias radica en diferentes mecanismos además de que producen hormonas, tales como: la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento, sideróforos y antibióticos; así como la inducción de resistencia en la planta y la fijación del nitrógeno (Torrente, 2010).

De Freitas y Germida (1992) mencionan que se conoce que algunos géneros de - *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas, auxinas (ácido indolacético), citocininas, ácido absícico y fijan N<sub>2</sub>, lo que estimula el crecimiento, la producción de raíces laterales y pelos radicales que, a su vez, favorecen la absorción de nutrientes. Tien *et al.*, (1979) reportó que cuando una cepa

de *Azospirillum* induce el crecimiento de las plantas, se debe principalmente a la formación del ácido indol acético (AIA) que se produce por su inoculación

Bago *et al.*, (2000, 2001 y 2002) mencionan que los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) se consideran biotrofos obligados, ya que su desarrollo y reproducción requieren de un sistema radical vivo para satisfacer sus requerimientos energéticos, cuya base son diferentes fuentes de carbono generadas por el proceso fotosintético de la planta.

Sharif y Claassen (2011) y Hart y Forsythe (2012) indican que uno de los beneficios mejor caracterizado que los HMA aportan a sus hospedantes se relaciona con la mejor nutrición por nutrimentos que son poco móviles en el suelo como el caso del P, Fe, y Zn, principalmente, mencionan que, por su relevancia simbiótica y su amplio espectro de colonización, los HMA se han canalizado a procesos biotecnológicos para generar inoculantes micorrizicos dirigidos a su aplicación en plantas de importancia hortícola, frutícola y forestal (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000); Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007b; Fuentes –Dávila y Ferrera-Cerrato, 2007).

Bashan y Holguin (1996), plantean que la inoculación mixta (hongo-bacteria) origina una interacción sinérgica, obteniéndose incrementos significativos en el crecimiento y los contenidos nutricionales de las plantas.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes dosis de aplicación del coinoculante a base de *Azospirillum brasilense* y micorriza en distintas etapas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

## JUSTIFICACIÓN

Los residuos en forma de sales que dejan en el suelo los fertilizantes químicos son causa de la contaminación y deterioro del suelo, de igual forma los lixiviados que llegan hasta los mantos freáticos provocan la contaminación del agua, por lo que el uso de biofertilizantes es una alternativa que permitirá mejorar el suelo y continuar con la actividad agrícola sin que ello signifique el deterioro del medio ambiente.

## HIPÓTESIS

El uso de un mayor número de aplicaciones de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza incrementará el crecimiento en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay debido a la fijación de nitrógeno y solubilización del fósforo, así como a la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal.

## REVISIÓN DE LITERATURA

De acuerdo con Pérez y Ferrera (1996), la sostenibilidad agrícola ha cobrado especial interés en los últimos años, ya que este tipo de manejo de los agroecosistemas repercute en beneficios para el hombre, así como para el balance ecológico y agroecológico.

Mejía (1995), indica que la sostenibilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles, ya que son un medio económicamente atractivo y aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos.

### ***Bacterias promotoras del crecimiento vegetal***

Dentro de las bacterias asociativas más estudiadas, se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*, el cual ha sido objeto de estudio desde la década del setenta, pues su inoculación conlleva a un aumento significativo del sistema radical, además de inducir resistencia a agentes patógenos y proveer de elementos tan necesarios como el nitrógeno, inhibe la proliferación de plantas parásitas y produce hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, lo que permite un desarrollo más económico y saludable de los cultivos. La habilidad que tiene esta bacteria de colonizar el interior de las plantas y ocupar nichos protegidos contra el oxígeno y otros factores, lo convierten en el grupo más promisorio de diazótrofos asociados con gramíneas y otras plantas no leguminosas según Camelo *et al.*, (2011).

Las bacterias pertenecientes a este género son muy promisorias como inoculantes para las plantas; pues tienen un número de características interesantes que las hace adaptables para establecerse ellas mismas en el extremadamente complejo medio competitivo de la rizosfera según Burdman *et al.*, (2000).

De los mecanismos empleados por bacterias, se pueden diferenciar claramente dos procesos esenciales, el primero consiste en la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las bacterias, que son capaces de promover respuestas fisiológicas en las células vegetales. El segundo mecanismo se puede

encontrar en la intervención directa de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos en los cuales pueden hacer disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Ahn *et al.*, 2007).

Blakeslee *et al.*, (2005); Tsavkelova *et al.*, (2006) mencionan que el ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada debido a su clara acción en la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos. Varios géneros bacterianos han sido reportados como productores de AIA, entre los cuales se pueden citar *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. (Ahmad *et al.*, 2006), *Azospirillum* sp. (Lugtenberg *et al.*, 2002), *Pantoea agglomerans* (Caballero *et al.*, 2007; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Las giberelinas son fitohormonas capaces de incrementar el crecimiento de los tallos, irrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar. Este tipo de hormonas producidos por microorganismos se describieron inicialmente en hongos, sin embargo, varios géneros bacterianos, entre los que se pueden incluir *A. lipoferum* y *A. brasilense*, se han caracterizado por producir giberelinas (Bottini *et al.*, 2004).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal producen compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos, que son compuestos que desempeñan la función de solubilizar específicamente el hierro e incorporarlo al metabolismo celular, químicamente, se consideran compuestos ligantes a hierro que funcionan de forma general uniéndose covalentemente a hierro sin generar cambios en el estado de oxidación (Whipps, 2001).

De acuerdo con Azcón y Barea (1996), la interacción entre bacterias promotoras del crecimiento vegetal y micorrizas puede ser selectiva y dependiente de la bacteria y el hongo. Estos autores mencionan una estimulación notable de crecimiento de una población de *Pseudomonas fluorescens* en la superficie del micelio extra radical del hongo. También Graninazzi-Pearson (1982) determinó que las bacterias de vida libre como *Azotobacter* sp y *Azospirillum* sp, aumentaron su población en la rizosfera de la planta hospedera al estar micorrizadas las raíces. Se ha demostrado que la presencia de bacterias benéficas alrededor de las raíces tiene la capacidad de proteger a las plantas contra enfermedades, ya que preparan la maquinaria genética y bioquímica de respuesta

sistémica frente a enfermedades, mediante un mecanismo llamado Resistencia Sistémica inducida (Audenaest *et al.*, 2002; Jetiyanon y Kloepper, 2002; Romamoorthy *et al.*, 2001; Ron *et al.*, 2002).

### ***Micorrizas***

La formación de la simbiosis micorrízica arbuscular es un complejo proceso caracterizado por distintos estadios del establecimiento del hongo, donde se distinguen las siguientes fases (Barea *et al.*, 1991):

1. Germinación de la spora, la cual se ve estimulada por la presencia de los exudados radicales y está influida por determinados microorganismos del suelo y, fundamentalmente, por sus condiciones físico- químicas.
2. Formación del apresorio sobre las células epidérmicas, producto del aumento de la presión hidrostática en la zona apical de la hifa infectiva.
3. Penetración radical a través de los pelos radicales o de las células epidérmicas, por la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos.
4. Crecimiento intracelular a partir de la hifa de penetración que se extiende entre las células de la epidermis hacia la corteza de la raíz, sin penetrar el sistema vascular ni los meristemas radicales.
5. Desarrollo del micelio extramatricial en el suelo con la formación de las estructuras ramificadas de absorción, las que aumentan considerablemente la superficie de absorción de la planta y su capacidad para captar nutrientes y agua.
6. Formación de arbuscúlos intracelularmente, con el consiguiente aumento en la superficie de contacto entre el hongo y la planta. También se pueden formar vesículas y células auxiliares, en dependencia de la especie fúngica.
7. Formación de esporas, cerrándose el ciclo de la vida de los HMA.

Los resultados de coinoculación se basan en el hecho de que la relación mutualista que se establece entre micorrizas y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ocurre de

tal forma que por un lado las bacterias ponen a disposición de la planta el N atmosférico fijado y las micorrizas incrementan la absorción de otros elementos, entre los que se encuentra el P, muy importante para garantizar una adecuada fijación del N y el crecimiento de las plantas (Ojeda, 1998; Rivera *et al.*, 2003).

De acuerdo con Allen *et al.*, (2003), las hifas extraradicales de los HMA contribuyen en la absorción de hasta 80% de fósforo, 10% de potasio, 25% de zinc, 60% de cobre y 25% de nitrógeno de la planta.

En suelos ácidos, el fósforo se inmoviliza con óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio de acuerdo con Bohn *et al.*, (1993). Bajo condiciones favorables y con la intervención de microorganismos, las formas insolubles de fósforo pueden pasar a formas solubles, principalmente mediante la producción microbiana de ácidos orgánicos que compiten con el fosfato y forman complejos con los cationes que lo inmovilizan, liberando fosfato a la solución del suelo. Un grupo muy especial de bacterias tienen la capacidad de asimilar nitrógeno gaseoso utilizando la enzima nitrogenada que cataliza la conversión del gas inerte N<sub>2</sub> a amoníaco o amonio (Alexander, 1981; Kucey, 1989; Rodríguez y Fraga, 1999).

Bashan (1996), y Nacamulli *et al.*, (1997) mencionan que una estrategia para mantener el rendimiento de trigo sin daño ambiental es la aplicación de N fraccionada y la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Costacurta (1995), indica que la coinoculación HMA-*Azospirillum* sp, es un ejemplo de interacción benéfica, ya que la colonización de las raíces por los hongos, estimula el flujo de carbohidratos desde el follaje hasta la raíz, estos carbohidratos pueden constituir fuentes de carbono para el crecimiento de la bacteria. Hernández (2000) y Pulido (2002), mencionan que, trabajando en tomate, encontraron una mayor colonización rizosférica en los tratamientos coinoculadas con micorrizas y rizobacterias, demostrando la compatibilidad entre hongos micorrízicos arbusculares y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Mediante la coinoculación se han obtenido resultados favorables en cultivos como gerbera, trigo y cebolla (Soroa, 2000; Iglesias *et al.*, 2000 y; Pulido, 2002).

De acuerdo con Raj *et al.*, (2005) y; Khalid *et al.*, (2009), aun cuando la tecnología de los biofertilizantes ofrece a los agricultores productos de bajo precio en comparación con el costo económico y ambiental de los agroquímicos, su uso todavía es limitado.

### ***Cultivo de Espinaca***

Clasificación taxonómica de la espinaca de acuerdo con Zabala (2017).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida, Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Género: Spinacia

Especie: *Oleracea*

La espinaca posee una raíz pivotante que tiene un desarrollo superficial, su tallo es erecto y de longitud variable entre 30 cm a 1m. Las hojas crecen en forma de roseta, alternas, de color verde oscuro, pecíolo cóncavo y rojo en la base. Las plantas de espinaca pueden ser femeninas, masculinas y hermafroditas. Las flores masculinas son verdes, se agrupan de 6 a 12 en las espigas terminales, conformadas con 4 estambres y de 4 a 5 pétalos de acuerdo con Jiménez y Arias, (2010).

### ***Características generales para cosecha***

Las plantas se pueden cosechar cuando tienen 5 o 6 hojas y hasta antes que emitan el tallo floral. Esto se realiza cortando las plantas con parte de la raíz para evitar que las hojas se separen indica INIFAP (2010).

De acuerdo con Maroto (1990) el cultivo de espinaca, se desarrolla bien en suelos profundos, aireados, drenados y en suelos neutros. Debe tomarse en cuenta el análisis de suelo, la fertilidad y el manejo del terreno.

### *Análisis de crecimiento del cultivo*

#### Coeficiente de Partición de Biomasa

El Coeficiente de Partición de Biomasa (CPB) nos muestra cómo se distribuyeron los asimilados en la planta a lo largo del ciclo del cultivo.

#### Índices de crecimiento

El análisis matemático de crecimiento usa medidas directas tales como masa seca total de la planta, área foliar total y tiempo; y medidas derivadas como son la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa de asimilación neta (TAN), y el área foliar específica (AFE) que pueden ser obtenidas a partir de las medidas directas. Los valores se obtienen de los muestreos destructivos estimados como masa seca: peso seco uno y peso seco dos, realizados en los tiempos: tiempo uno y tiempo dos, respectivamente.

#### Tasa de crecimiento relativo (TCR)

Es la eficiencia de la planta para producir nuevo material en un tiempo determinado ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ ) (Hunt, 1982).

#### Tasa de asimilación neta (TAN)

Expresa el aumento en peso seco total de la planta por unidad de tiempo y por unidad de superficie foliar ( $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1}$ ) (Sivori y Montaldi, 1980). Este índice representa una medida del balance que existe entre la actividad fotosintética y la actividad respiratoria de la planta.

#### Relación de peso foliar (RPF)

Este índice está formado por dos componentes: la magnitud del peso seco de la hoja, y por la unidad de peso seco total de la planta. No tiene unidades ya que al calcular en gramos el peso seco de la hoja y dividirlo entre gramos del peso seco total el resultado queda adimensional. Aunque es una medida instantánea, a menudo se emplea la media entre el intervalo de  $t_1$  a  $t_2$ .

#### Área foliar específica (AFE)

Este índice expresa la densidad o el grosor relativo de la hoja. Es una medida de la relación entre el área foliar y el peso seco de la hoja por lo que las unidades en que se expresa son:  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ .

### ***Análisis químico del material vegetal***

De acuerdo con Alcántar y Sandoval (1999), una interpretación correcta de las condiciones nutrimentales de un cultivo a través del análisis vegetal, deberá complementar con información del suelo y del manejo, ya que ambos tienen un efecto directo en la nutrición de las plantas. En el suelo habrá que considerar, al menos, factores como pH, textura, estructura, humedad y contenido de materia orgánica, ya que todos estos factores tienen un efecto directo sobre la disponibilidad de nutrientes. Conociendo dichos factores se puede inferir cuáles de ellos podrían originar un problema en la nutrición de algún elemento, lo cual sería corroborado mediante el análisis de la planta.

Jones y Steyn (1973) mencionan cuatro etapas previas al análisis químico:

Limpieza del material para eliminar la contaminación superficial.

Secado de las muestras para detener la actividad enzimática y acondicionar el material para la molienda.

La molienda que permite reducir el tamaño y homogeneizar el material.

Secado final hasta peso constante para tener una base estándar de valores y para mejorar las condiciones de almacenamiento del tejido vegetal.

El secado del tejido vegetal a una temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  a  $72^{\circ}\text{C}$  antes del análisis, parece ser lo más recomendable (Alcántar y Sandoval, 1999).

Uno de los métodos que se han utilizado para evaluar el nitrógeno presente en diversos materiales, es el Kjeldahl, el cual fue desarrollado por Johan Kjeldahl en 1883 según Jones *et al.*, (1991), pero debido a su firme principio químico, todavía, se emplea en casi todo el mundo, con muy ligeras modificaciones mencionan Bradstreet (1965); Morris (1983). En este método, el nitrógeno orgánico y el nitrato, son convertidos a la forma

amoniacal, en presencia de ácido sulfúrico; el amonio es posteriormente destilado y recibido en ácido bórico, para finalmente ser cuantificado, por titulación con un ácido fuerte, en presencia de un indicador que generalmente es mezcla de verde bromocresol-rojo de metilo de acuerdo con Alcántar y Sandoval (1999).

Del proceso de digestión del tejido, para destruir los componentes orgánicos y liberar los elementos minerales que serán, posteriormente analizados. El procedimiento de digestión húmeda utiliza diferentes combinaciones de ácido nítrico, sulfúrico y perclórico, aunque ocasionalmente alguno algunos de estos componentes son substituidos por otros solventes como ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno y metanol, entre otros mencionan Alcántar y Sandoval (1999).

Cada uno de los reactivos que se adicionan tiene una función específica en el proceso de digestión, en el caso de digestión húmeda:

$\text{HNO}_3$  = abastecedor de oxígeno y conductor de la oxidación, disminuye la temperatura para evitar una evaporación excesiva en las primeras etapas. Se requiere en menor cantidad cuando la mezcla tiene ácido perclórico.

$\text{HClO}_4$  = desdoblamiento de los complejos orgánicos en compuestos más simples, además evita la espuma y la proyección. Se requiere en pequeñas cantidades.

$\text{H}_2\text{SO}_4$  = transformación de los cationes a sulfatos, es la sal más eficiente para evitar los espectros en el arco eléctrico de las determinaciones espectroquímicas.

Además, diluye el ácido perclórico, regulando la intensidad de degradación del material orgánico y, por último, ayuda en la deshidratación del silicio y disminuye la adsorción.

$\text{H}_2\text{O}_2$  = Aumenta el poder oxidante de la mezcla y disminuye el tiempo de digestión.

$\text{CH}_3 - \text{OH}$  = solubilización de lípidos (incluyendo ceras y terpenoides) presentes en el tejido vegetal.

Alcántar y Sandoval (1999), indican que una parte de la demanda nutrimental de un cultivo es normalmente cubierta por el suelo. Es necesario estimar esta parte mediante un análisis de suelos. Entre los elementos que la planta demanda y que frecuentemente el

suelo es incapaz de suministrar íntegramente se encuentran el N, P, K, y con menor frecuencia al S, Mg y B. En los suelos de carácter alcalino es común observar problemas de abastecimiento de algunos micronutrientes. En los de carácter ácido se pueden presentar deficiencias de P, Mo, Ca, Mg y K, y toxicidad de Al.

Para la interpretación de resultados, en la Tabla 1 se presentan una referencia de rangos de suficiencia para análisis de plantas del Boletín de la Southern Cooperative (2000).

Tabla 1. Rangos de suficiencia de concentración de macro y micronutrientes para el cultivo de espinaca:

Macronutrientes					
N	P	K	Ca	Mg	S
4.0-6.0%	0.3-0.5%	3.0-8.05%	1.0-1.5%	0.4-1.0%	0.2-0.8%
Micronutrientes					
Fe	Mn	Zn	Cu	B	Mo
50-200 ppm	25-200 ppm	20-75 ppm	5-15 ppm	25-60 ppm	0.2-1.0 ppm

ppm = partes por millon, % = por ciento Fuente: Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States, Boletín de la Southern Cooperative. (2000).

De acuerdo con el Instituto de Ciencias de Agricultura y Alimentos de la Universidad de Florida las siguientes tablas (2 y 3) de concentración de nutrientes fueron desarrolladas para vegetales de investigación conducida en nutrición vegetal.

Tabla 2. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para macronutrientes en hojas de espinaca.

%									
Cultivo	Parte de la planta	Tiempo de muestreo	Estatus	N	P	K	Ca	Mg	S
Espinaca	Hojas	Cosecha	Deficiente	<3.0	0.3	2.5	0.6	1	
			Rango de adecuado	3 4	0.3 0.5	2.5 3.5	0.6 1	1 1.6	
			alto	>4.0	0.5	4	1	1.6	

% = por ciento, < = menor que, > = mayor que. (Fuente: Plant Tissue Analysis and Interpretation for Vegetable Crops in Florida. University of Florida, 2015).

Tabla 3. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para micronutrientes en hojas de espinaca.

			ppm						
Cultivo	Parte de la planta	Tiempo de muestreo	Estatus	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo
Espinaca	Hojas	55 dds	Deficiente	<-	30	50	20	5	0.1
			Adecuado		30	50	20	5	0.1
			rango		50	70	40	7	1
			alto	>-	80	70	40	7	1

ppm = partes por millón, dds = días después de la siembra <- = menor que, >- mayor que. Fuente: Plant Tissue Analysis and Interpretation for Vegetable Crops in Florida. University of Florida (2015).

### ***Análisis de suelo***

VARIABLES QUÍMICAS QUE ESTÁN ASOCIADAS INDIRECTAMENTE CON LA FERTILIDAD DE LOS SUELOS. Entre los análisis de suelo que pertenecen a este grupo se puede mencionar: pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), N Kjeldahl (Nk), C/N, porcentaje de CaCO<sub>3</sub>, acidez intercambiable (AI), aluminio intercambiable (Al), capacidad de intercambio catiónico (CIC), porcentaje de saturación de bases (PSB), relación de adsorción de sodio (RAS), porcentaje de sodio intercambiable (PSI), entre otros de menor importancia de acuerdo con (Alcántar 2016).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del campo de investigación

La presente investigación se llevó a cabo durante la primavera de 2019, se realizó en dos etapas, la primera etapa en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en el Edificio B del Departamento de Botánica y en el Invernadero No. 2 de la Subdirección de Operación de Proyectos (figura 1), de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

### Ubicación geográfica:

Altitud: 1782 m.s.n.m.

Longitud: 101°1'51.45" oeste

Latitud: 25°21'19.87" norte



Figura 1. Imagen satelital del Edificio de Botánica y del Invernadero No. 2 de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. (Fuente: Google Earth/INEGI 2019).

El Invernadero No. 2 tiene una orientación norte-sur, su área total es de 240m<sup>2</sup>, y una temperatura promedio de 28°C, de tipo túnel con cubierta de fibra de vidrio, cuenta con una ventana húmeda en la parte posterior y dos extractores en la parte frontal.

Para la preparación del sustrato se utilizó suelo agrícola de una parcela ubicada en la localidad de Rancho Nuevo (figura 2), municipio de Ramos Arizpe, Coahuila de Zaragoza, México.

Ubicación geográfica

Altitud: 1034 m.s.n.m.

Longitud: 101°06'55.84" oeste

Latitud: 25°44'08.87" norte

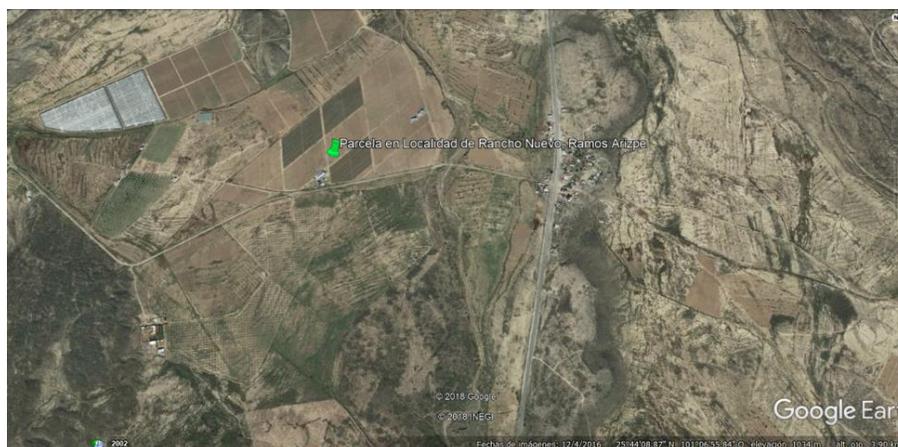


Figura 2. Imagen satelital de la parcela donde se obtuvo el suelo agrícola localizada en Rancho Nuevo, municipio de Ramos Arizpe, Coahuila de Zaragoza, México. (Fuente: Google Earth/INEGI 2019).

El suelo se clasifica como xerosol cálcico y clase textural media de acuerdo con la carta edafológica Clave G14C23 del INEGI.

La segunda etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco”, del Departamento de Edafología (figura 3), del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en Texcoco, Estado de México, México.

Ubicación geográfica

Altitud: 2243 m.s.n.m.

Longitud: 98°54'25.71" oeste

Latitud: 19°27'48.57" norte



Figura 3. Imagen satelital del Edificio de Edafología e Hidrociencia del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en Texcoco, Estado de México, México. (Fuente: Google Earth/INEGI 2019).

Material vegetal utilizado:

Semilla de Espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

Material biológico utilizado:

Biofertilizante líquido a base de *A. brasilense* y micorriza.

Sustrato:

Mezcla 1:1:1 de: peat moss + suelo agrícola + perlita.

Diseño experimental.

Se diseñó un modelo de bloques completos al azar con 5 tratamientos y cuatro repeticiones un total de 200 unidades experimentales.

En la siguiente tabla se muestra la descripción de los tratamientos (Tabla 4), y el número de muestreos, fecha de muestreo, intervalo en días y tiempo en días se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos.

	Descripción
Testigo Absoluto	Testigo absoluto
SNS Completa	Solución Nutritiva Steiner Completa
SNS -N -P + BF al trasplante	Coinoculación a la siembra +Solución Nutritiva Steiner -N -P
SNS -N -P + BF 10 d	Coinoculación a la siembra, al trasplante, y 10 días después del trasplante + Solución nutritiva Steiner -N -P
SNS -N -P + BF 20 d	Coinoculación a la siembra, al trasplante, 10 y 20 días después del trasplante + Solución nutritiva Steiner -N -P

Tabla 5. Número de muestreo, fecha, intervalo y tiempo en días.

Número de muestreo	Fecha de muestreo	Intervalo en días	Tiempo en días
1	02 julio 2019	10	35
2	12 julio 2019	10	45
3	22 julio 2019	10	55

### Desarrollo experimental

#### Materiales del Laboratorio de Biotecnología:

- Cuchara espátula
- Micro pipeta
- Probeta 100 ml
- Frascos con tapa rosca
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas 10 ml
- Vasos de precipitado 1 l
- Vasos de precipitado 200 ml
- Puntas para micro pipeta 5 ml
- 3 charolas germinadoras de 200 cavidades

#### Reactivos del Laboratorio de Biotecnología

- Tween 20
- Hipoclorito de sodio
- Tiosulfato de sodio
- Etanol
- Goma de acacia

La siembra se realizó el 29 de abril de 2019, se utilizó sustrato PRO-MIX para el llenado de las charolas germinadoras.

Procedimiento:

1. Siembra de 300 semillas coinoculadas en 2 charolas germinadoras de plástico de 200 cavidades llenas previamente con sustrato de peat moss humedecido hasta el punto de saturación (figura 4).



Figura 4. Siembra de 300 semillas de espinaca coinoculadas en sustrato PRO-MIX en charolas germinadoras.

2. Siembra de 100 semillas sin coinocular, testigo absoluto, en 1 charola germinadora de plástico de 200 cavidades llenas previamente con sustrato de peat moss humedecido hasta el punto de saturación (figura 5).



Figura 5. Siembra de 100 semillas de espinaca sin coinocular en sustrato PRO-MIX en charola germinadora.

3. Colocación de las charolas de germinación en una cama dentro del Invernadero No. 2 (figuras 6).



Figura 6. Semillas de espinaca coinoculadas sembradas en charolas de germinación.

A los 5 días después de la siembra se realizó un conteo de semillas germinadas coinoculadas y sin coinocular (figura 7 y 8)



Figura 7. Germinación de semillas de espinaca coinoculadas.



Figura 8. Germinación de semillas sin coinocular.

El trasplante se efectuó a los 25 días después de la siembra, para la preparación del sustrato se realizó una mezcla 1:1:1 de: suelo agrícola + peat moss + perlita (figura 9), se llenaron bolsas negras de 1.5 litros de capacidad que se acomodaron a una distancia adecuada entre sí en una de las camas del invernadero No. 2 (figuras 10 y 11).



Figura 9. Preparación del sustrato, mezcla 1:1:1 de: peat moss + perlita + suelo agrícola.



Figura 10. Etiquetado y acomodo de macetas en una cama de la parte posterior del Invernadero No. 2.



Figura 11. Trasplante de plántulas de espinaca a los 25 días después de la siembra.

Los riegos se realizaron únicamente con agua potable diariamente desde la siembra hasta la fecha de trasplante, posteriormente se regó cada tercer día con 100 ml de agua potable para T1 (tratamiento Testigo absoluto sin coinocular), con 100 ml de solución nutritiva Steiner completa para T2 (solución nutritiva Steiner completa sin coinocular), con 100 ml de solución nutritiva Steiner -N y -P para T3 (tratamiento con solución nutritiva Steiner -N y -P, coinoculado a la siembra y al trasplante), con 100 ml de solución nutritiva Steiner -N y -P para T4 (tratamiento con solución nutritiva Steiner -N y -P, coinoculado a la siembra, al trasplante y a los 10) y, con 100 ml de solución nutritiva Steiner -N y -P para T5 (tratamiento con solución nutritiva Steiner -N y -P, coinoculados a la siembra, al trasplante, a los 10 y a los 20 días después de la siembra) (figura 12).



Figura 12. Tambos de 60 litros de capacidad etiquetados y con soluciones nutritivas colocados dentro del invernadero.

La segunda coinoculación se efectuó al momento del trasplante, en la Figura 13 se pueden observar plántulas de Tratamiento testigo al momento del trasplante y, en la Figura 14 plántulas del tratamiento de semillas coinoculadas.



Figura 13. Trasplante de plántulas del tratamiento Testigo absoluto.



Figura 14. Trasplante de plántulas del tratamiento de coinoculación.

En la segunda coinoculación se aplicó 1 ml de biofertilizante a base de *A. brasiliense* y micorriza a cada planta de los tratamientos 3, 4, y 5 al momento del trasplante, en la tercera coinoculación se aplicó 1 ml de biofertilizante a base de *A. brasiliense* y micorriza a cada planta de los tratamientos 4 y 5 a los diez días después del trasplante, en la cuarta coinoculación se aplicó 1 ml de biofertilizante biofertilizante a base de *A. brasiliense* y micorriza a cada planta del tratamiento 5 a los 20 días después del trasplante. (figura 15).



Figura 15. Coinoculación de plántula después del trasplante.

Se tomaron 4 plantas por tratamiento, un total de 24 plantas por muestreo (figura 16).



Figura 16. Macetas del primer muestreo.

En el Laboratorio de Biotecnología, se realizó el registro de datos para análisis de variables agronómicas e índices de crecimiento.

Para los análisis de las variables agronómicas, coeficiente de partición de biomasa e índices de crecimiento se recabaron los datos del largo de la raíz en milímetros (figura

17), diámetro del tallo en milímetros (figura 18), área foliar en centímetros cuadrados (figura 19) peso fresco en gramos (figura 20).



Figura 17. Medición del largo de la raíz con vernier Marca Mitutoyo Modelo CD-6”C.



Figura 18. Medición del diámetro del tallo con vernier Marca Mitutoyo Modelo CD-6”C.



Figura 19. Medición de área foliar en el integrador Marca LI-COR Modelo LI3100C.



Figura 20. Obtención de peso fresco de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay en una balanza semi analítica Marca OHAUS Modelo 293A.

Una vez terminado el proceso se introdujo cada muestra en una bolsa de papel y se colocaron en un horno de secado a 65°C, durante 72 horas (figura 21).



Figura 21. Secado de muestras en horno de secado Marca TERLAB Modelo TE-H70DM.

Materiales y métodos en el Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador alcalde Blanco”.

- Balanza analítica
- Espátula
- Tubos de digestión

- Dispensadores o pipeta de repetición de 5 y 1 ml.
- Matraces Erlenmeyer por arrastre de vapor (micro-Kjeldahl)
- Micro bureta de 10 ml.
- Papel filtro de poro medio cortado en círculos de 12.5 cm de diámetro.
- Embudos de tallo corto de 10 cm de diámetro.

#### Reactivos

- Mezcla de ácido sulfúrico-perclórico.

Se preparó una mezcla de ácido sulfúrico y perclórico concentrados en una proporción 2:1 (v:v).

- Peróxido de hidrógeno solución al 37%.
- Solución de hidróxido de sodio al 50%.

Se disolvieron 500 g de NaOH en un litro de agua destilada. Debido a que es una reacción exotérmica deberá colocarse bajo agua corriente y agitándolo hasta que se disuelva.

- Solución de ácido bórico al 4%.

Se pesaron 40 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y se disuelven en un litro de agua destilada caliente.

- Ácido sulfúrico 0.05 N estandarizado.

Se diluyeron 1.4 ml de ácido sulfúrico concentrado en un litro de agua destilada.

Se estandarizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seco. Pesar 0.250 g de la sal y disolver en 50 ml de agua. Se agregaron 5 o 6 gotas de anaranjado de metilo y titular con el ácido sulfúrico.

Se calculó la normalidad del ácido sulfúrico según la siguiente fórmula:

$$N_{\text{H}_2\text{SO}_4} = N = \frac{\text{Peso Na}_2\text{CO}_3 \text{ (g)}}{\text{Peso equivalente Na}_2\text{CO}_3 * \text{X Volumen de ácido (L)}}$$

Peso equivalente  $\text{Na}_2\text{CO}_3^* = 53$

- Indicador de verde bromocresol – rojo de metilo

Se preparó una solución acuosa 0.1% de bromocresol. Antes de aforar se agregaron a esta solución 2 ml de solución NaOH de 0.1 N. Se preparó una solución de 0.1% de rojo de metilo en alcohol etílico. Antes de aforar se agregaron 3 ml de la solución de NaOH de 0.1 N.

Finalmente, se mezclaron 75 ml de la solución del indicador verde de bromocresol con 25 ml de rojo de metilo y diluya a 200 ml con alcohol etílico.

Procedimientos para la digestión de material vegetal.

1. Se pesaron 0.25 g de material vegetal de parte aérea seco y molido y se colocaron en tubos de digestión (figuras 22 y 23).

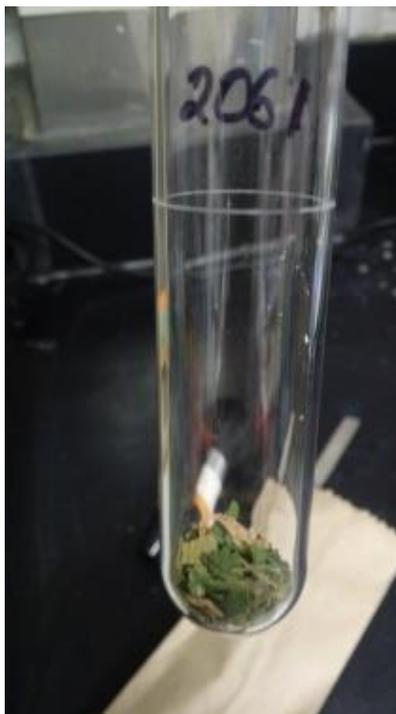


Figura 22. Los 0.25g de muestra pesados en una balanza analítica Modelo Marca OHAUS Modelo E01140 EXPLORER DE PRECISIÓN, colocados en un tubo de ensaye con aforo 25 ml.



Figura 23. Molienda de muestras de materia seca en una licuadora Marca OSTERIZER Blender Modelo 004093-008-NP0, con aspas de acero inoxidable para evitar la contaminación de la muestra.

2. Se incluyeron tubos de digestión sin muestra y se siguió la metodología (blancos). Se adicionaron 2 ml de la mezcla de ácidos sulfúrico y perclórico (figura 24).



Figura 24. Adición de 2 ml de mezcla de ácidos a la muestra, bajo una campana de absorción de humos Marca TERMO SCIENTIFIC HAMILTON Modelo SAFEAIRE II.

3. Posteriormente se adicionó 1 mL de  $H_2O_2$  (figura 25) y, se colocaron en la plancha de digestión a  $400^\circ C$  (figura 26).

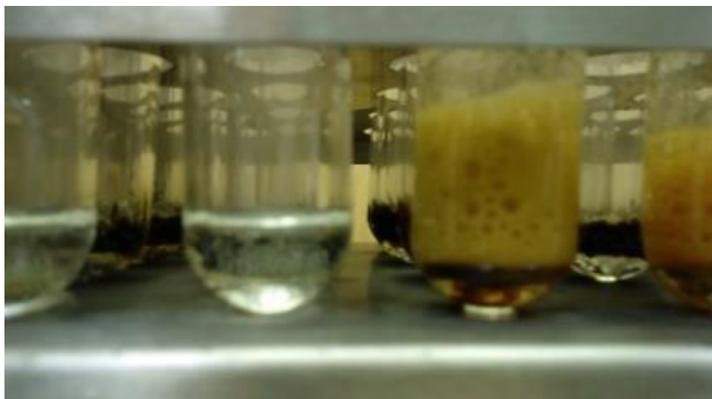


Figura 25. Adición de  $H_2O_2$  para digestión húmeda de las muestras bajo una campana de extracción de humos Marca HAMILTON TERMO SCIENTIFIC Modelo SAFEAIRE II.

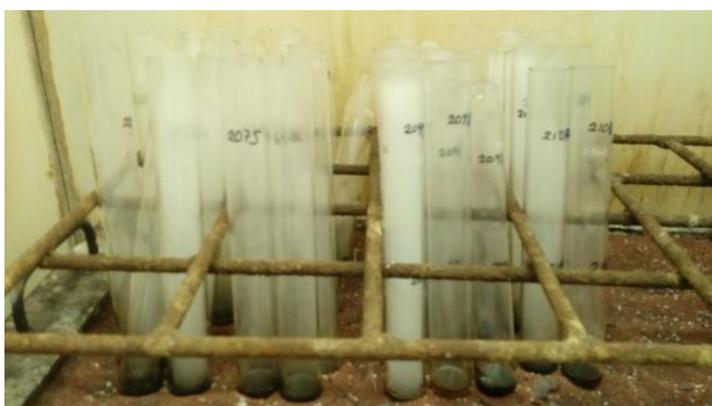


Figura 26. Colocación de los tubos con ácidos en una parrilla de calentamiento para calentar arena y tubos de vidrio de fabricación nacional, debido a los vapores de ácidos, se calientan bajo una campana de extracción de humos Marca HAMILTON TERMO SCIENTIFIC Modelo SAFEAIRE II.

4. Las muestras permanecieron en la plancha por un período de entre 2 y 3 h, hasta que el digestado se tornó transparente y tuvo un volumen de ésta de aproximadamente 1 ml (figura 27).



Figura 27. Retiro de las muestras que permanecieron en la plancha por un período de entre 2 y 3 h, el digestado se tornó transparente y tuvo un volumen de aproximadamente 1 ml.

5. Se dejaron enfriar las muestras y se adicionó agua desionizada hasta el volumen de 25 ml (figura 28).

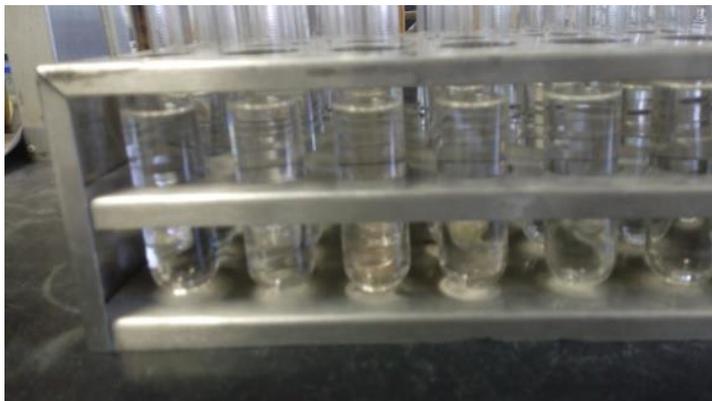


Figura 28. Se dejaron enfriar las muestras y se adicionó agua desionizada hasta el volumen de 25 ml.

6. Posteriormente se filtró el digestado en frascos de vidrio usando papel filtro de poro medio (figura 29).



Figura 29. Filtrado del digestado en frascos de vidrio usando papel filtro de poro medio.

7. Se tomó una alícuota de 10 ml de filtrado para la determinación de la concentración de N (figura 30).



Figura 30. Se tomó una alícuota de 10 ml de filtrado para la determinación de la concentración de N.

8. Destilación y cuantificación de N por titulación. Se colocó en el equipo de destilación los 10 ml del filtrado, se adicionaron 10 ml de NaOH (50%) e inició el calentamiento (figura 31).



Figura 31. Se colocó en el equipo de destilación los 10 ml del filtrado, se adicionaron 10 ml de NaOH (50%), e inició el calentamiento.

9. El destilado se recibió en 20 ml ácido bórico al 4% más 0.2 ml de indicador (verde bromocresol y rojo de metilo), hasta alcanzar un volumen aproximado de 50 ml (figura 32).



Figura 32. El destilado se recibió en 20 ml ácido bórico al 4% más 0.2 ml de indicador (verde bromocresol y rojo de metilo), en matraces Erlenmeyer hasta alcanzar un volumen aproximado de 50 ml.

10. La titulación se llevó a cabo con la solución de ácido sulfúrico 0.05 N previamente colocado en la microbureta de 10 ml hasta que se presentó el vire de color azul a rosa (figura 33).

Cálculos de concentración de nitrógeno:

$$\% N = \frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \times N \text{ ácido} \times 14 \times \text{volumen de aforo}}{\text{Peso muestra} \times \text{alícuota destilada}} \times \frac{1}{10}$$

Donde:

V muestra = Volumen del ácido sulfúrico empleado en titular la muestra.

V blanco = Volumen del ácido sulfúrico empleado en titular el blanco.

N = Normalidad exacta del ácido sulfúrico.

14 = peso equivalente del N.

P = Peso de la muestra expresada en gramos (0,2g)

Volumen de aforo = 25 ml.

Alícuota destilada = 10 ml.

1/10 = Factor para convertir a porcentaje.



Figura 33. Titulación con la solución de ácido sulfúrico 0.05 N previamente colocado en la microbureta de 10 ml hasta que se presentó el vire de color azul a rosa.

11. La lectura de los micronutrientes se realizó en el espectrómetro de emisión ICP-ES, en el cual una bomba peristáltica succiona la muestra hacia una cámara de atomización que se junta con el gas argón y hace un plasma, lo que el argón hace es excitar los átomos, produciéndose un cambio en el estado energético llevándolos a su nivel más alto y al regreso a su estado basal cada átomo tiene una emisión a una longitud de onda específica en nanómetros, el equipo tiene multidetectores que de acuerdo a una curva de calibración multielementos está leyendo, proporcionando a la vez la magnitud de la emisión y esa magnitud es proporcional a la concentración del elemento, en la

computadora se tiene la hoja de trabajo con el número de lote y con el peso de la muestra con lo que el equipo hace los cálculos (figura 34).



Figura 34. Succión de muestra a la cámara de atomización del ICP-Optical Emission Spectrometer Marca VARIAN Modelo 725-ES.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de las determinaciones del suelo agrícola y del sustrato (mezcla de peat moss + suelo agrícola + perlita), realizado en el Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco” del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo.

Tabla 6. Análisis químico del suelo agrícola y sustrato utilizado en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay.

Determinaciones	Unidades	Suelo agrícola	Clasificación	Sustrato	Clasificación
pH		10,390	Muy fuertemente alcalino	10,350	Muy fuertemente alcalino
CE	dS/m	1,231	No salinos	0,521	No salinos
Densidad aparente	g/cm <sup>3</sup>	1,368		0,926	
CIC	meq/100 g	64,571	Muy alto	65,648	Muy alto
Arcilla	%	22,36		20,36	
Limo	%	28		30	
Arena	%	49,64		49,64	
Clase textural		Franco		Franco	
N	%	0,058	Bajo	0,090	Bajo
P	ppm	38,359	Alto	27,897	Alto
K	meq/100 g	0,502882087	Moderado	0,3822023567	Bajo
Ca	meq/100 g	69,06735872	Muy alto	67,85428498	Muy alto
Mg	meq/100 g	1,255641437	Bajo	2,136036167	Moderado
Na	meq/100 g	0,6562290734	Muy bajo	0,7705787711	Muy bajo

dS = deciSiemens, m = metro, g = gramos, meq = miliequivalentes, % = por ciento, cm<sup>3</sup> = centímetros cúbicos.

La clasificación se realizó de acuerdo con lo propuesto por Villarroel (1988).

#### Análisis estadístico de datos

Con los datos se realizó un análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), usando el sistema estadístico SAS® (Statistical Analysis System) V9 para Windows.

#### Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$i = 1, 2, 3, \dots$  t...tratamientos.

$j = 1, 2, 3, \dots$  n...observaciones.

$Y_{ij}$  = La j-ésima observación del i-ésimo tratamiento.

$\mu$  = Es la media poblacional de estimar a partir de los datos del experimento.

$T_i$  = Efecto del i-ésimo tratamiento a estimar a partir de los datos del experimento.

$\varepsilon_{ij}$  = Efecto aleatorio de variación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 7 se presentan los resultados de la emergencia de las semillas a los seis días después de la siembra, del tratamiento Testigo absoluto emergieron el 88% de un total de 100 sembradas, por otra parte, las del tratamiento de semillas coinoculadas con un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza emergieron el 66% de las 300 sembradas. Resultados similares fueron reportados cuando se evaluó el efecto de la inoculación con nueve cepas de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia* en dos especies de leguminosas y encontraron efectos positivos significativos en la germinación de lenteja (*Lens esculenta*) causados por la inoculación de las cepas, con incrementos de hasta 38,9% (Bashan y Holguin, 1997; Chanway *et al.*, 1993).

Tabla 7. Resultados de la emergencia de las semillas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay

Tratamiento	Emergencia de semillas		
	Cantidad de semillas sembradas	4 dds	6 dds
Testigo	100	0	88
Coinoculadas	300	41	198

dds = días después de la siembra.

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis de varianza y comparación de medias del área foliar de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, se mostraron diferencias estadísticas significativas en el segundo muestreo, para el tratamiento sin coinoculación y con solución nutritiva Steiner completa, que al igual que en el tercer muestreo, obtuvo el valor más alto, no se muestran diferencias estadísticas significativas para ninguno de los tratamientos, únicamente diferencias numéricas, en el tercer muestreo, el tratamiento de coinoculación a la siembra y al trasplante, con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó un valor 18.34% en comparación con el tratamiento Testigo absoluto, aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa. El resultado es similar al reportado en un cultivo de papaya por Sánchez-Espindola *et al.*, (1996), y en un cultivo de maíz por Urive y Dzib (2006) quienes al utilizar una combinación de *Azospirillum* con micorrizas obtubieron plantas con una media de área foliar de 400 cm<sup>2</sup> y estas fueron superiores a las plantas que no recibieron tratamiento.

Tabla 8. Análisis de varianza y comparación de medias del área foliar en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Área Foliar (cm <sup>2</sup> )	Testigo Absoluto	131.79 a ©	116.72 a	187.41 a
	SNS Completa	103.73 a	179.55 a	271.87 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	96.72 a	127.16 a	229.52 a
	SNS -N -P + BF 10 d	91.59 a	101.35 a	202.01 a
	SNS -N -P + BF 20 d	116.25 a	136.83 a	224.71 a
	C.V. (%)	27.21	21.03	23.18
	S.E.	NS	*	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En lo referente al largo de la raíz de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ningún tratamiento, en ninguno de los muestreos se presentó diferencia estadística significativa, únicamente diferencias numéricas, el tratamiento sin coinoculación y con solución nutritiva Steiner completa, obtuvo el valor más alto en el tercer muestreo, el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, mostró el valor más alto con respecto al tratamiento Testigo absoluto, superior en un 14.96% (tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza y comparación de medias del largo de la raíz en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Largo de la Raíz (mm)	Testigo Absoluto	176.98 a	191.85 a	161.09 a
	SNS Completa	137.76 a	239.96 a	175.97 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	115.31 a	180.64 a	177.78 a
	SNS -N -P + BF 10 d	91.76 a	120.27 a	176.05 a
	SNS -N -P + BF 20 d	96.18 a	174.50 a	189.45 a
	C.V. (%)	37.82	36.86	27.15
	S.E.	NS	NS	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de análisis de varianza y comparación de medias del diámetro del tallo de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ninguno de los tratamientos, en ninguno de los muestreos hubo diferencias estadísticas significativas, únicamente diferencias numéricas, del tercer muestreo el tratamiento sin coinoculación y con solución nutritiva Steiner completa fue

el que reportó el valor más alto, y el del tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, el cual fue un 5.29% mayor en comparación con el tratamiento Testigo absoluto, aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa.

Tabla 10. Análisis de varianza y comparación de medias del diámetro del tallo en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Diámetro del Tallo (mm)	Testigo Absoluto	4.59 a	3.37 b	4.29 a
	SNS Completa	3.90 a	5.45 a	4.88 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	4.61 a	4.56 ab	4.19 a
	SNS -N -P + BF 10 d	3.76 a	3.61 ab	4.12 a
	SNS -N -P + BF 20 d	4.49 a	3.66 ab	4.53 a
	C.V. (%)	16.30	20.56	19.67
	S.E.	NS	*	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En la Tabla 11 se presentan los resultados del análisis de varianza y comparación de medias del peso seco de la hoja de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ningún tratamiento en ningún muestreo se presentaron diferencias estadísticas significativas, únicamente diferencias numéricas, el tratamiento sin coinoculación y con solución nutritiva Steiner completa, presentó el valor más alto, para el resultado del tercer muestreo del peso seco de la hoja el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, presentó el resultado más alto, un 20.68% mayor en comparación con el tratamiento Testigo absoluto, aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa.

Tabla 11. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco de la hoja en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Peso Seco de la Hoja (g)	Testigo Absoluto	0.32 a	0.45 b	0.92 a
	SNS Completa	0.27 a	0.68 a	1.25 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.28 a	0.47ab	1.00 a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.23 a	0.36 b	0.81 a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.32 a	0.51 ab	1.16 a
	C.V. (%)	30.01	28.24	29.08
	S.E.	NS	*	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En la Tabla 12. Se muestran los resultados del análisis de varianza y comparación de medias del peso seco del tallo de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ningún tratamiento en ningún muestreo se presentaron diferencias estadísticas significativas, únicamente diferencias numéricas, en el tercer muestreo, el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante y el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, mostraron valores similares aunque inferiores en un 5.26% con respecto al tratamiento Testigo absoluto que presentó el mayor valor.

Tabla 12. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco del tallo en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Peso Seco del Tallo (g)	Testigo Absoluto	0.01 a	0.04 a	0.19 a
	SNS Completa	0.01 a	0.04 a	0.14 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.01 a	0.03 a	0.18 a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.01 a	0.17 a	0.12 a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.02 a	0.04 a	0.18 a
	C.V. (%)	49.14	197.98	38.07
	S.E.	NS	NS	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En la Tabla 13 se muestran los resultados del análisis de varianza y comparación de medias del peso seco de raíz de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ningún tratamiento en ningún muestreo se presentaron diferencias estadísticas significativas, únicamente diferencias numéricas, en el tercer muestreo del

peso seco de raíz el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante y a los 10 días, reportó el valor más alto, un 46.15% mayor en comparación con el tratamiento Testigo absoluto. Resultados similares reportó Andreeva *et al.*, (1992) en un cultivo de fíjol.

Tabla 13. Análisis de varianza y comparación de medias de peso seco de raíz en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestras		
		1	2	3
Peso Seco de Raíz (g)	Testigo Absoluto	0.13 a	0.12 a	0.07 a
	SNS Completa	0.16 a	0.12 a	0.10 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.12 a	0.10 a	0.12 a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.14 a	0.06 a	0.13 a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.18 a	0.09 a	0.13 a
	C.V. (%)	62.62	61.26	46.83
	S.E.	NS	NS	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

En la Tabla 14 se muestran los resultados del análisis de varianza y comparación de medias del peso seco de raíz de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, para ningún tratamiento en ningún muestreo se presentaron diferencias estadísticas significativas, únicamente diferencias numéricas, de los resultados del tercer muestreo en cuanto al peso seco total, el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días y con riego de solución nutritiva menos N y menos P, reportó el mayor valor, siendo un 19.04% superior en comparación con el tratamiento Testigo absoluto. Resultados semejantes en cacao reportaron Chulan y Martín (1982). Aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa. Kandil *et al.*, (2004) reportaron que el uso de fertilizantes biológicos en caña de azúcar, incrementaron significativamente el peso seco de la planta.

Tabla 14. Análisis de varianza y comparación de medias del peso seco total en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Órgano	Tratamientos	Muestreos		
		1	2	3
Peso Seco Total (g)	Testigo Absoluto	0.46 a	0.61 a	1.19 a
	SNS Completa	0.45 a	0.84 a	1.49 a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.41 a	0.60 a	1.29 a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.38 a	0.59 a	1.07 a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.52 a	0.63 a	1.47 a
	C.V. (%)	38.80	29.85	27.49
	S.E.	NS	NS	NS

C.V.= Coeficiente de Variación, ©= Valores con la misma letra, estadísticamente son iguales. \*= Diferencia significativa, NS=Diferencia No Significativa, S.E. Significancia Estadística.

De acuerdo con los datos obtenidos del análisis de varianza y comparación de medias de los coeficientes de partición de biomasa no se reportaron diferencias estadísticas significativas, pero si diferencias numéricas, del coeficiente de partición de biomasa de hoja (tabla 15), el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó ser mayor en un 1.28% en comparación con el tratamiento Testigo absoluto, aunque por debajo del tratamiento sin coinoculación y con solución nutritiva completa que reportó el valor más alto. Resultados similares en coinoculación de plantas de cacao reportó Aguirre Medina (2007). Aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa.

Tabla 15. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa de hoja en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Variable	Tratamientos	Muestreos					
		1	2	3			
C.P.B. Hoja	Testigo	0.71	a ©	0.73	a	0.77	a
	SNS Completa	0.61	a	0.81	a	0.84	a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.68	a	0.79	a	0.77	a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.61	a	0.68	a	0.77	a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.64	a	0.80	a	0.78	a
	C. V. %	12.6		16.1		5.8	
	S. E.	NS		NS		NS	

C.V. = Coeficiente de Variación, © = Valores con la misma letra estadísticamente son iguales. \* = Diferencia significativa, NS = Diferencia No Significativa, S.E. = Significancia Estadística.

En tanto los resultados para el coeficiente de partición de biomasa del tallo reportó que ningún tratamiento tuvo resultados superiores al tratamiento Testigo absoluto, el cual mostró una diferencia estadística significativa en el tercer muestreo (tabla 16).

Tabla 16. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa de tallo en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Tratamientos	Variable	Muestras			
		1	2	3	
	Variable	02-jul-19	12-jul-19	22-jul-19	
C.P.B. Tallo	Tratamientos				
	Testigo	0.71	a ©	0.73	a
	SNS Completa	0.03	a	0.05	a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.04	a	0.05	a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.04	a	0.20	a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.04	a	0.06	a
	C. V.%	30.8		138.1	26.1
S. E.	NS		NS	*	

C.V. = Coeficiente de Variación, © = Valores con la misma letra estadísticamente son iguales. \* = Diferencia significativa, NS = Diferencia No Significativa, S.E. = Significancia Estadística.

En tanto para el resultado del coeficiente de partición de biomasa de raíz el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante y a los 10 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó el valor más alto, un 45.45% en comparación con el tratamiento Testigo absoluto (tabla 17).

Tabla 17. Análisis de varianza y comparación de medias del Coeficiente de Partición de Biomasa en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratado con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Variable	Tratamientos	Muestras			
		1	2	3	
C.P.B. Raíz	Testigo	0.26	a	0.20	a
	SNS Completa	0.36	a	0.14	a
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.29	a	0.16	a
	SNS -N -P + BF 10 d	0.34	a	0.12	a
	SNS -N -P + BF 20 d	0.31	a	0.14	a
	C. V.%	28.4		60.5	37.9
	S. E.	NS		NS	NS

C.V. = Coeficiente de Variación, © = Valores con la misma letra estadísticamente son iguales. \* = Diferencia significativa, NS = Diferencia No Significativa, S.E. = Significancia Estadística.

En las Tablas 18 y 19 se presentan los resultados de los análisis de varianza y comparación de medias de los índices de crecimiento. Pacovsky (1988) reportó resultados similares en interacción positiva para estimular el crecimiento vegetal con la inoculación de *Azospirillum* y *Glomus*. Se observó que el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó la mayor tasa de crecimiento relativo en un 48.22 % con respecto al tratamiento Testigo absoluto a los 55 días después de la siembra. Así mismo en para la tasa de asimilación neta el mismo tratamiento presentó el mayor valor, superior en un 33.55% con respecto al tratamiento Testigo absoluto.

Tabla 18. Índices de crecimiento de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Índices	Tratamientos	Muestreos	
		35-45 (dds)	45-55 (dds)
TCR g g <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	Testigo	-0.4106	0.2231
	SNS Completa	-0.0911	0.2231
	SNS -N -P + BF al trasplante	-0.4188	0.3082
	SNS -N -P + BF 10 d	-0.4377	0.1021
	SNS -N -P + BF 20 d	-0.3905	0.4309
TAN g cm <sup>2</sup> día <sup>-1</sup>	Testigo	0.077	0.297
	SNS Completa	0.202	0.359
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.083	0.372
	SNS -N -P + BF 10 d	0.085	0.254
	SNS -N -P + BF 20 d	0.051	0.447

dds = días después de la siembra, g = gramos, cm<sup>2</sup> centímetros cuadrados.

El comportamiento típico de la TCR presenta valores altos al principio debido al crecimiento acelerado y a la división celular que se presenta en esta etapa, a medida que transcurre el tiempo y el cultivo se acerca al final del ciclo, la TCR decrece llegando a cero. El tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante y a los 10 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó el valor más alto para el área foliar específica siendo un 13.47 superior al tratamiento Testigo absoluto.

En lo referente a la relación de peso foliar el tratamiento de coinoculación a la siembra, al trasplante, a los 10 y 20 días con riego de solución nutritiva Steiner menos N y menos P, reportó un nivel de 4.82% por encima del tratamiento Testigo absoluto, aunque no fue superior al tratamiento con riego de solución nutritiva Steiner completa.

Tabla 19. Área foliar específica (AFE), y relación de peso foliar (RPF) de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza.

Índices	Tratamientos	Muestras	
		35-45 (dds)	45-55 (dds)
AFE cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	Testigo	334.84	230.17
	SNS Completa	321.28	240.24
	SNS -N -P + BF al trasplante	307.91	249.23
	SNS -N -P + BF 10 d	341.52	266.03
	SNS -N -P + BF 20 d	318.37	231.47
RPF cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	Testigo	0.7147	0.7571
	SNS Completa	0.7101	0.8244
	SNS -N -P + BF al trasplante	0.7293	0.7789
	SNS -N -P + BF 10 d	0.6064	0.6851
	SNS -N -P + BF 20 d	0.7022	0.7955

dds = días después de la siembra, g = gramos, cm<sup>2</sup> centímetros cuadrados.

Con los rangos de suficiencia mostrados en las tablas 20 y 21, se compararon los resultados de las determinaciones de concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P (tabla 22).

Tabla 20. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para macronutrientes en hojas de espinaca.

				%					
Cultivo	Parte de la planta	Tiempo de muestreo	Estatus	N	P	K	Ca	Mg	S
Espinaca	Hojas	Cosecha	Deficiente	<3.0	0.3	2.5	0.6	1	
			Rango de adecuado	3	0.3	2.5	0.6	1	
			alto	4	0.5	3.5	1	1.6	
				>4.0	0.5	4	1	1.6	

% = porcentaje, < = menor que, > = mayor que. (Fuente: Plant Tissue Analysis and Interpretation for Vegetable Crops in Florida. University of Florida, 2015).

Tabla 21. Valores críticos (deficiencia, rangos adecuados, valores altos, y valores de toxicidad para micronutrientes en hojas de espinaca.

Cultivo	Parte de la planta	Tiempo de muestreo	Estatus	ppm					
				Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo
Espinaca	Hojas	30dds	Deficiente	<-	30	50	20	5	0.1
			Rango de adecuado		30	50	20	5	0.1
			alto	>-	80	70	40	7	1

ppm = partes por millón, dds = días después de la siembra <- = menor que, >- mayor que. Fuente: Plant Tissue Analysis and Interpretation for Vegetable Crops in Florida. University of Florida (2015).

Tabla 22. Valores de concentración de de macro y micro nutrientes obtenidos de los análisis varianza y comparación de medias de tejido vegetal (hojas) de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea*) var. Viroflay.

Tratamiento	Concentración				
	N	P	K	Ca	Mg
Testigo	28	3	80	12	5
SNS Completa	39	4	74	11	8
SNS -N -P + BF al trasplante	27	3	69	11	5
SNS -N -P + BF 10 ddt	32	3	56	11	5
SNS -N -P + BF 20 ddt	28	3	51	12	4

SNS = Solución nutritiva Steiner, -N = menos Nitrógeno, -P = menos Fósforo, BF = biofertilizante, ddt = días después del tratamiento. Color rojo = deficiente, color verde = adecuado, color amarillo = alto.

La Figura 35 muestra del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 días después del trasplante alcanzó el rango de suficiencia adecuado para concentración de N, al igual que el tratamiento con riego de solución Steiner completa, en comparación con el tratamiento Testigo absoluto.

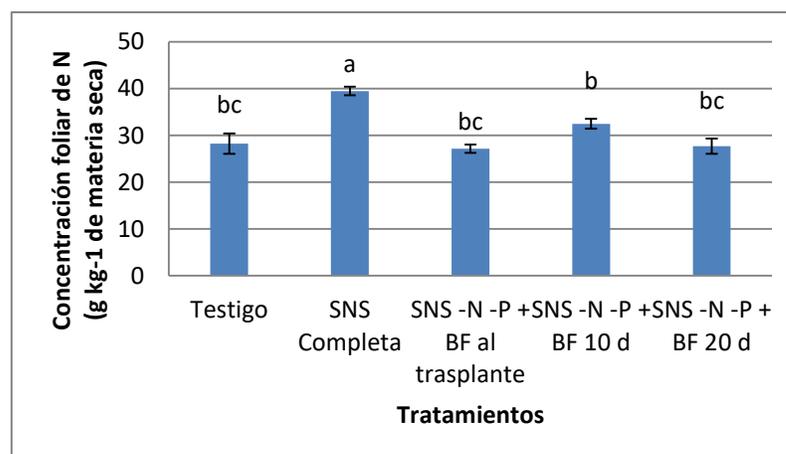


Figura 35. Comparación de concentración de N en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

También se comparó a la acumulación foliar de N, el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación de N, en tanto que de manera particular, el tratamiento con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó una acumulación de N hasta del 20.66% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 36), estudios similares sobre evaluación del efecto de inoculación de *Azospirillum* sp. de cultivo de maíz, muestran que las plantas presentaron un porcentaje de absorción de nitrógeno en el tejido foliar del 2.92% según lo reportado por Ortíz (2010).

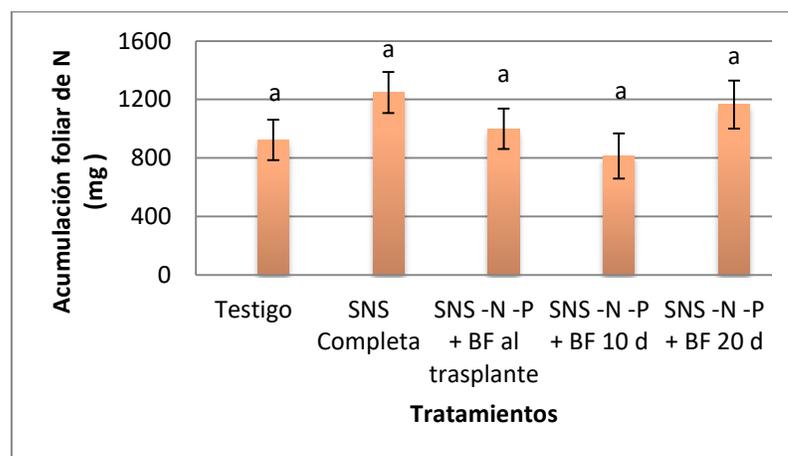


Figura 36. Comparación de acumulación de N en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P (Tabla 22), se observó que la muestra del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 días después del trasplante alcanzó el rango de suficiencia adecuado para concentración de P, al igual que el tratamiento con riego de solución Steiner completa, en comparación con el tratamiento Testigo absoluto (figura 37).

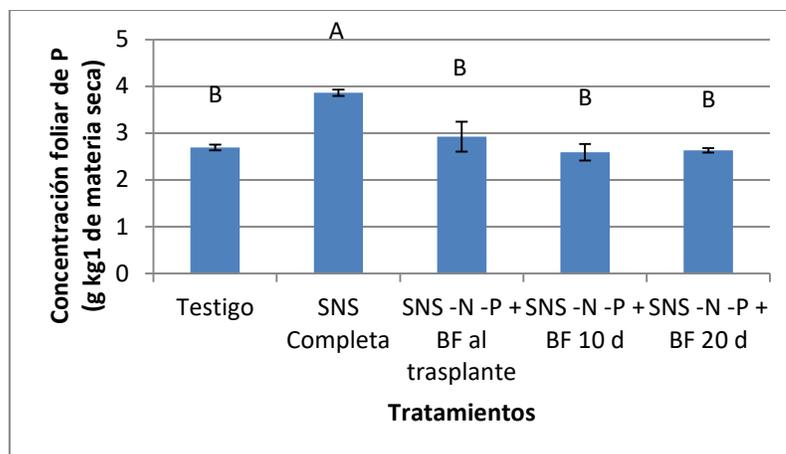


Figura 37. Comparación de concentración de P en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

En relación a la acumulación foliar de P el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante, la materia seca presentó una acumulación de P hasta del 19.69% con respecto a las plantas tratamiento Testigo absoluto que sin coinocular (figura 38), estudios similares sobre evaluación del efecto de inoculación de *Azospirillum* sp. de cultivo de maíz, muestran que las plantas presentaron un porcentaje de absorción de P en el tejido foliar del 1.39% según lo reportado por Sangoquiza *et al.*, (2017).

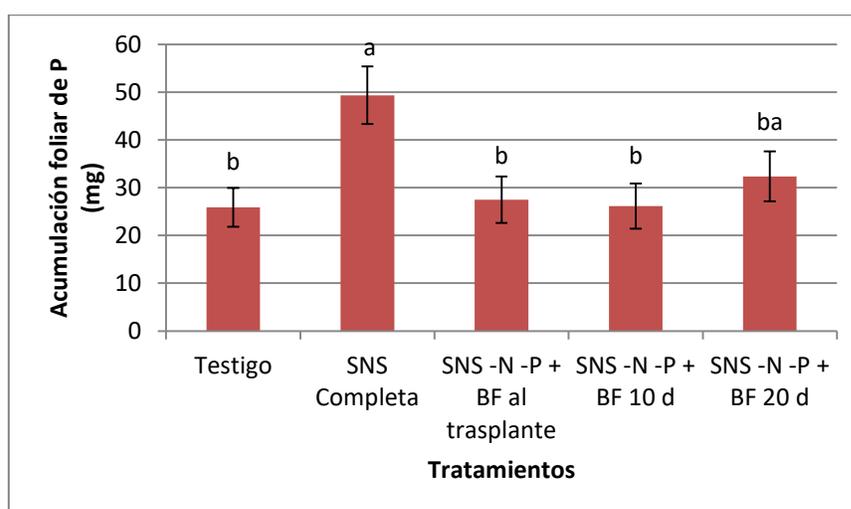


Figura 38. Comparación de acumulación de P en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P (Tabla 22), se observó que la muestra del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular presentó el mayor nivel de K, seguido del tratamiento con solución nutritiva Steiner completa, alcanzando el rango de suficiencia alto para concentración de K, al igual que los demás tratamientos con riego de solución Steiner menos N y menos P y con coinoculación aunque ninguno fue mayor en comparación con el tratamiento Testigo absoluto (figura 39). Y en cuanto a la acumulación foliar de K, el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó una acumulación de K de hasta un 18.83% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 40), estudios similares sobre evaluación del efecto de inoculación de *Azospirillum* sp. de cultivo de maíz, muestran que las plantas presentaron un porcentaje de absorción de K 6.35% en el tejido foliar según lo reportado por Sangoquiza et al., (2017).

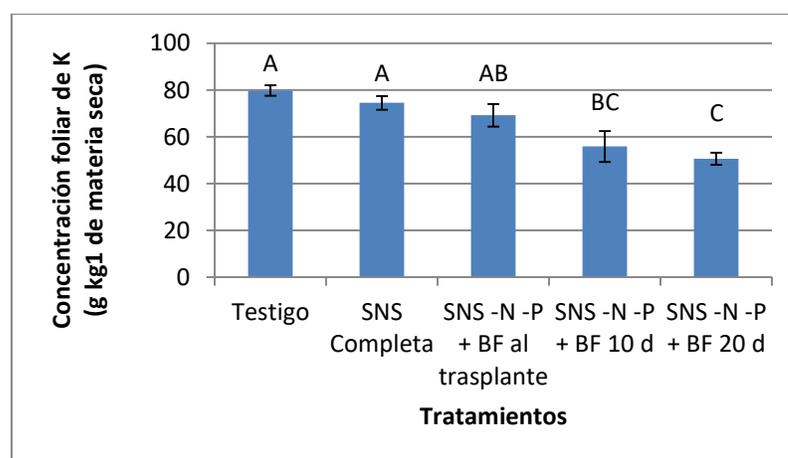


Figura 39. Comparación de concentración de K en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

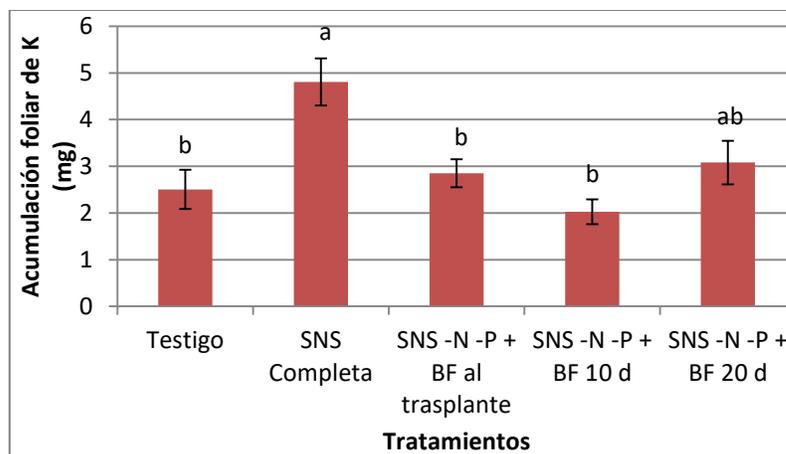


Figura 40. Comparación de acumulación de K en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P (Tabla 22), se observó que las muestras del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante alcanzaron el rango de suficiencia alto para concentración de Ca, al igual que el los demás tratamientos y superior en una 5.78% en comparación con el tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 41).

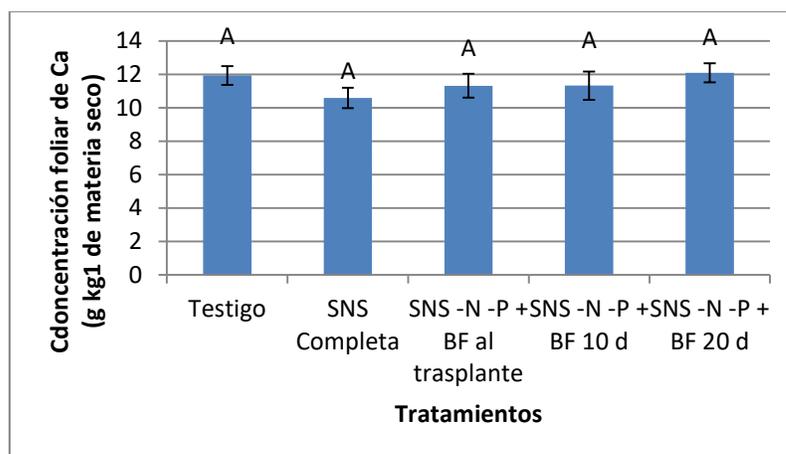


Figura 41. Comparación de concentración de Ca en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

En lo que respecta a la acumulación foliar de Ca, el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que ninguno de los tratamientos con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante presentaron una mayor acumulación de Ca, con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 42), estudios similares sobre evaluación del efecto de inoculación de *Azospirillum* sp. de cultivo de maíz, muestran que las plantas presentaron un porcentaje de absorción de Ca en el tejido foliar del 0.89% según lo reportado por Aguirre- Medina et al., (2007), Sangoquiza *et al.*, (2017), reportó resultados semejantes en cultivo de cacao.

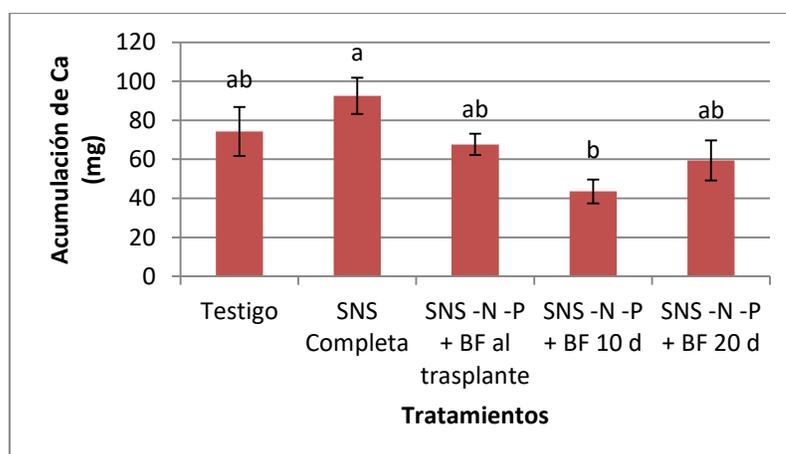


Figura 42. Comparación de acumulación de Ca en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que las muestras de todos los tratamientos, con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante, presentaron el rango de suficiencia deficiente para concentración de Mg, al igual que el tratamiento con riego de solución Steiner completa y el tratamiento Testigo absoluto (figura 43).

En lo referente a la acumulación foliar de nitrógeno el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento son solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó la mayor acumulación de Mg, hasta del 21.11% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 44), estudios similares sobre evaluación del efecto de inoculación de *Azospirillum* sp. de cultivo de maíz, muestran que las plantas presentaron un porcentaje de absorción de Mg en el tejido foliar del 0.82% según lo reportado por Sangoquiza *et al.* (2017).

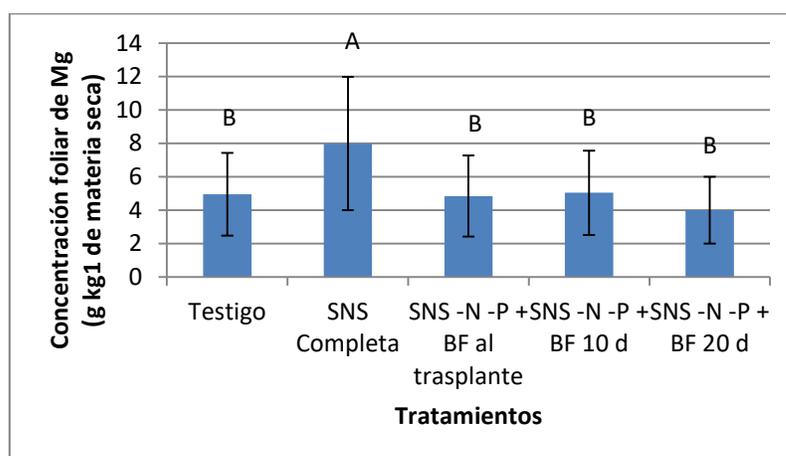


Figura 43. Comparación de concentración de Mg en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

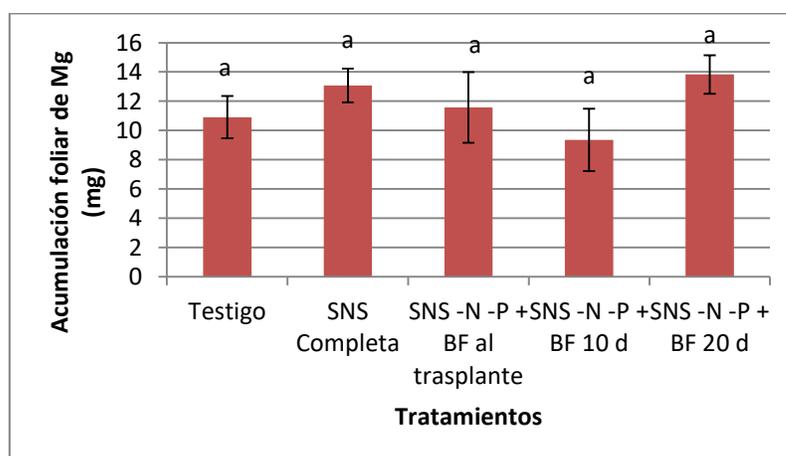


Figura 44. Comparación de acumulación de Mg en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca

(*Spinacia olearcea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P , y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que la muestra del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante alcanzó el rango de suficiencia adecuado para concentración de Fe, mayor en un 2.92% en comparación con el tratamiento Testigo absoluto (figura 45).

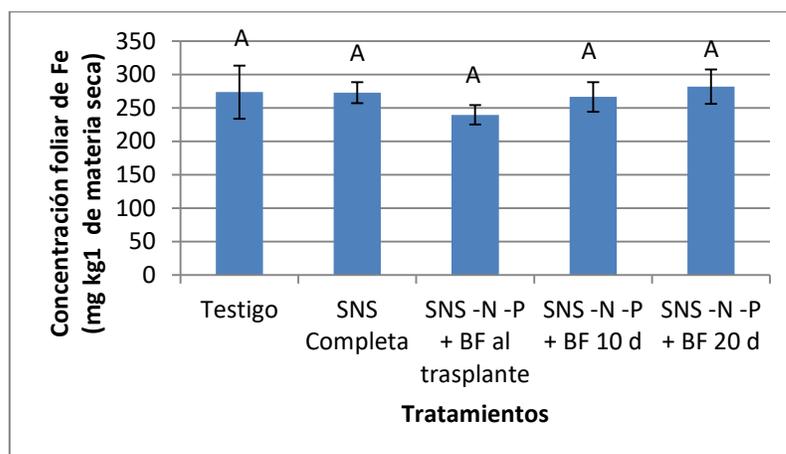


Figura 45. Comparación de concentración de Fe en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

En cuanto a la acumulación foliar de Fe, el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación al trasplante presentó una mayor acumulación de Fe, de un 17.96% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 46).

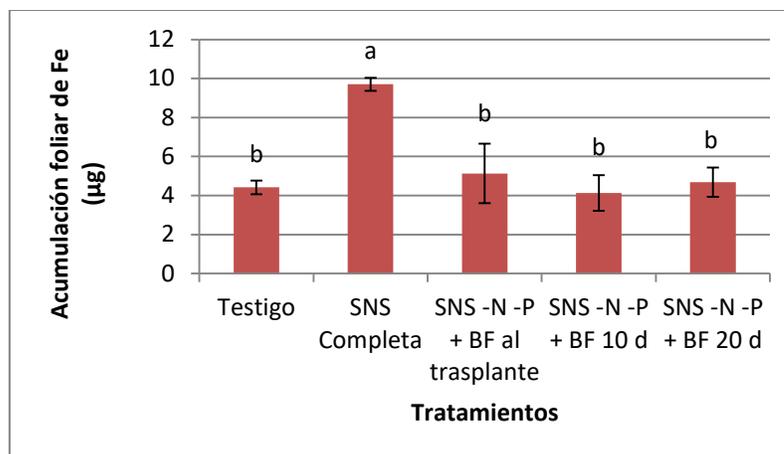


Figura 46. Comparación de acumulación de Fe en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que la muestra del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación al trasplante alcanzó el rango de suficiencia alto para concentración de Cu, al igual que el tratamiento Testigo absoluto (figura 47).

Por otra parte en lo que se refiere a la acumulación foliar de nitrógeno el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó la mayor acumulación de Cu, un 26.33% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto que sin coinocular (figura 48).

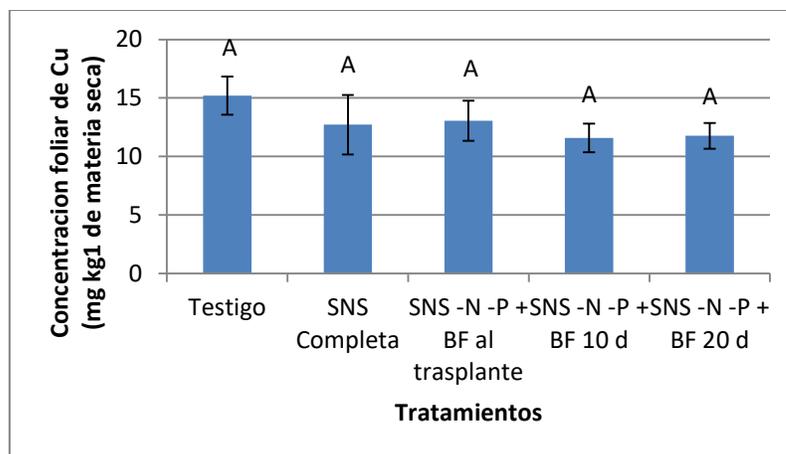


Figura 47. Comparación de concentración de Cu en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

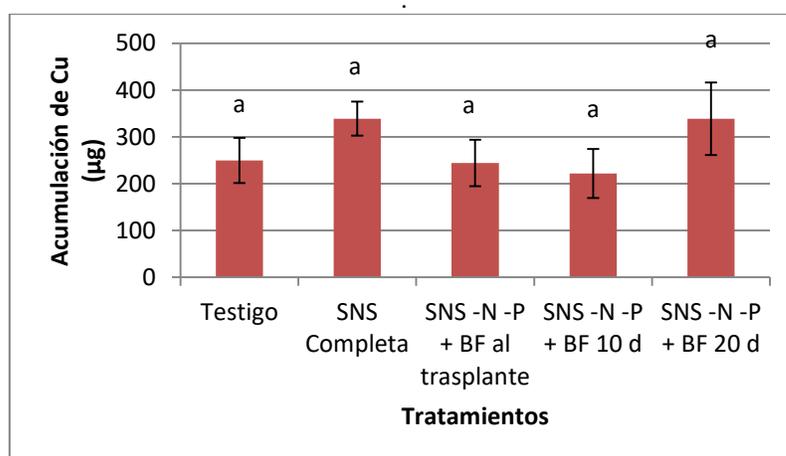


Figura 48. Comparación de acumulación de Cu en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que la muestra del tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante alcanzó el rango de suficiencia alto para concentración de Zn, mayor en un 51.88% en comparación con las plantas del tratamiento Testigo absoluto (figura 49).

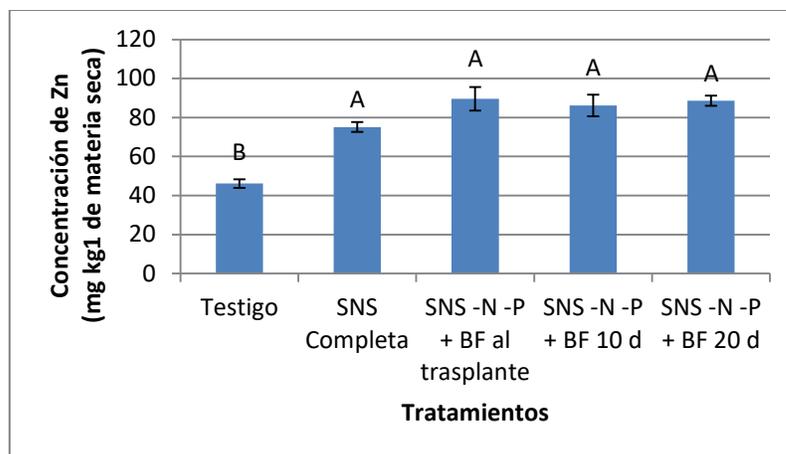


Figura 49. Comparación de concentración de Zn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

En cuanto a la acumulación foliar de Zn el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento son solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó una acumulación de Zn un 0.71% mayor con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 50).

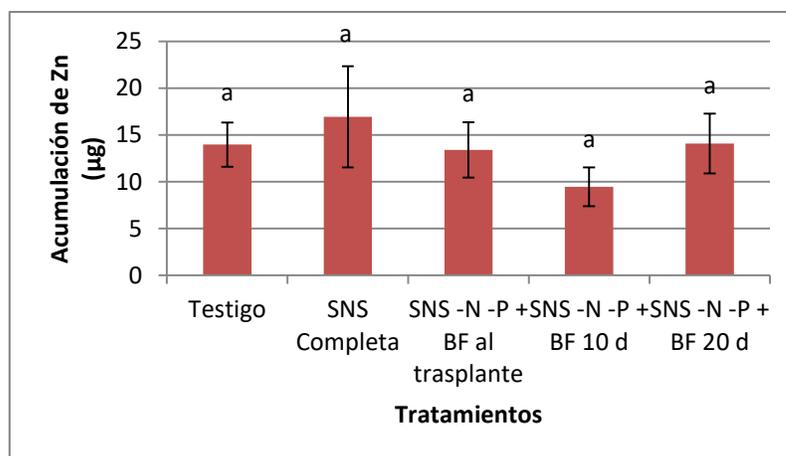


Figura 50. Comparación de acumulación de Zn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y

menos P, y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que las muestras de los tratamientos con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante alcanzaron el rango de suficiencia adecuado para concentración de Mn, a excepción del tratamiento con riego de solución Steiner completa, en tanto que el tratamiento con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante tuvo una concentración de Mn un 12.15% mayor en comparación con las plantas del tratamiento Testigo absoluto (figura 51).

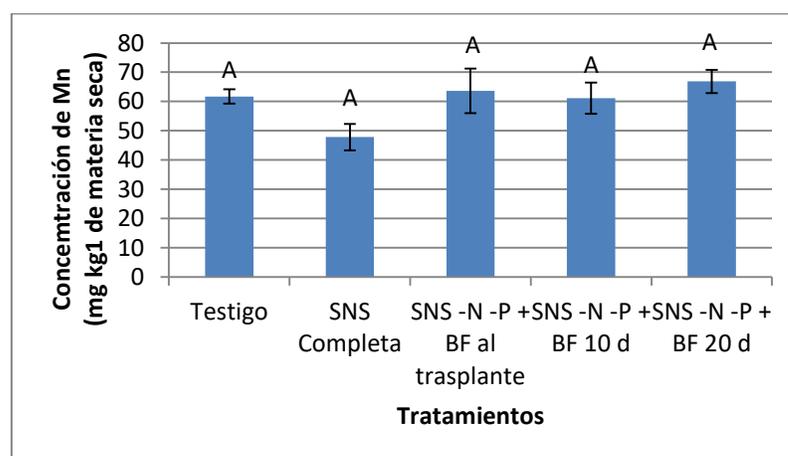


Figura 51. Comparación de concentración de Mn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

Con respecto a la acumulación foliar de Mn, el tratamiento de solución nutritiva Steiner completa obtuvo la mayor acumulación, en tanto que de manera particular, el tratamiento son solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10 y 20 días después del trasplante presentó la más alta acumulación de Mn hasta del 57.81% mayor con respecto a las plantas testigo absoluto sin coinocular (figura 58).

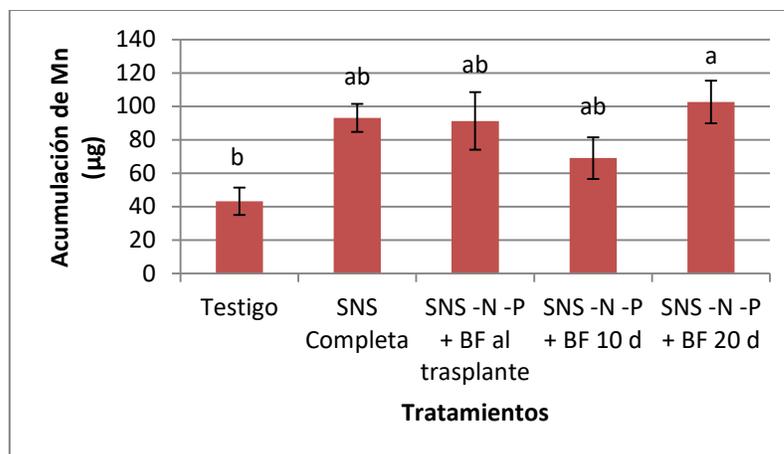


Figura 52. Comparación de acumulación de Mn en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis químicos realizados para determinar las concentraciones y acumulaciones minerales en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, cultivada en maceta y bajo condiciones de invernadero coinoculadas con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, y con riego terciado con solución nutritiva Steiner menos N y menos P, y al realizar las comparaciones con los rangos de suficiencia, se observó que todas las muestras de los tratamientos con riego de solución Steiner menos N y menos P, y coinoculación a los 10, 20 y 30 días después del trasplante alcanzaron el rango de suficiencia adecuado para concentración de B, siendo las plantas del tratamiento Testigo absoluto las que presentaron un rango de suficiencia alto para B (figura 53).

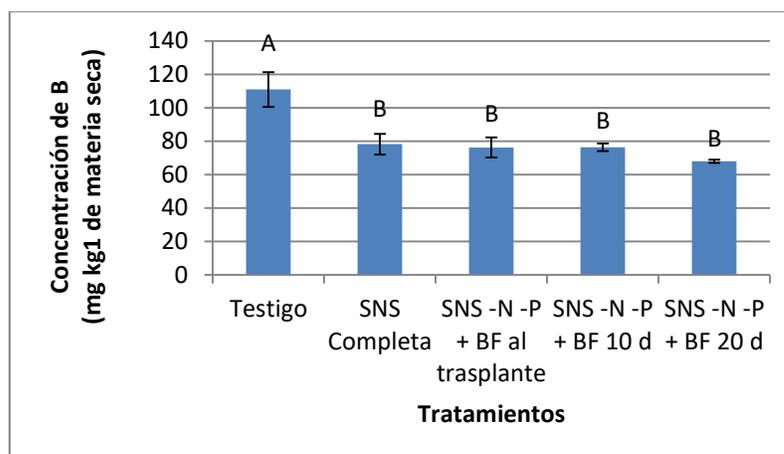


Figura 53. Comparación de concentración de B en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

En relación a la acumulación foliar de B el tratamiento de solución nutritiva Steiner menos N y menos P presentó la mayor acumulación de B, un 25.53% con respecto a las plantas del tratamiento Testigo absoluto sin coinocular (figura 54).

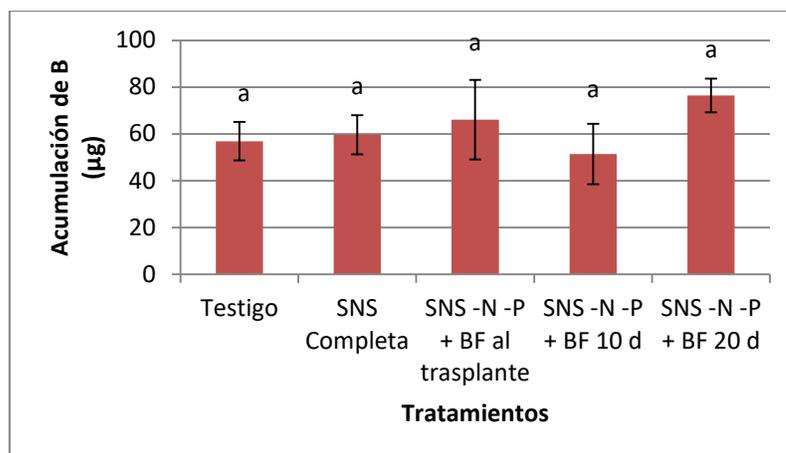


Figura 54. Comparación de acumulación de B en muestras de hojas de un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay tratada con diferentes dosis de un biofertilizante a base de *A. brasilense* y micorriza, a los 55 días después de la siembra.

## CONCLUSIONES

El uso de diferentes dosis de un biofertilizante a base de *Azospirillum brasilense* y micorriza, con coinoculación a la siembra, al trasplante, a los diez y 20 días después del trasplante, mostró capacidad para incrementar el crecimiento en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) var. Viroflay, además de contribuir a alcanzar un rango adecuado en el nivel de suficiencia de nutrimentos tales como el N y P.

Es importante incentivar al uso de biotecnologías para una producción agrícola sustentable, que permita la restauración de los ecosistemas.

Los análisis químicos de suelos previos a la implementación de los cultivos significan un ahorro de recursos económicos además de contribuir en la disminución de acumulación de sales en los suelos agrícolas.

## REFERENCIAS

- Aguirre-Medina, J. F., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2007). Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith. *Interciencia*, 32(8), 541-546.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan ms. (2006). Screening of Free-living Rhizospheric Bacteria for their Multiple Plant Growth Promoting Activities. *Microbiol res* 36:1-9.
- Ahn, I. P., Lee, S. W., & Suh, S. C. (2007). Rhizobacteria-Induced Priming in Arabidopsis is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 759-768. Recuperado de: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-20-7-0759>
- Alcántar, G. G. y M. Sandoval V. (1999) Manual de Técnicas del Laboratorio de Nutrición Vegetal pp 43-46 Publicación especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, Estado de México, México.
- Alexander, M. (1981). Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor S.A. Capítulo 20 355-371 p. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Alfonso, E. T., & Galán, A. L. (2006). Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense*.
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M., & Treseder, K. K. (2003). Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 271-303.
- Arias, L., Espinosa, L., Fuentes, L., Garzón, C., Niño, N., Jiménez, J., Gil, R. (2010). El cultivo de la espinaca y su manejo fitosanitario en Colombia. Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Audenaert, K.; Pattery, T.; Cornelis, T.; Hofte, M. (2002). Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Role of Salicylic Acid, Pyochelin and Pyocyanin. *MPMI* 15(11): 1147-1156. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)

- Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V. L., Goi, S. R., & Döbereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 911-922.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J. A., & Azcón, R. (1991). Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. Fijación y movilización biológica de nutrientes, 2, 149-173.
- Bashan, Y., Holguin, G., & Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, 14(2), 195-210. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Juan\\_Sanchez-Yanez/publication/330532673\\_Efecto\\_de\\_la\\_inoculacion\\_endomicorriza\\_y\\_rizobacteria\\_sobre\\_la\\_produccion\\_de\\_trigo\\_Triticum\\_aestivum\\_L\\_en\\_suelo\\_calcareo/links/5c4679eea6fdccd6b5bf1d22/Efecto-de-la-inoculacion-endomicorriza-y-rizobacteria-sobre-la-produccion-de-trigo-Triticum-aestivum-L-en-suelo-calcareo.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan_Sanchez-Yanez/publication/330532673_Efecto_de_la_inoculacion_endomicorriza_y_rizobacteria_sobre_la_produccion_de_trigo_Triticum_aestivum_L_en_suelo_calcareo/links/5c4679eea6fdccd6b5bf1d22/Efecto-de-la-inoculacion-endomicorriza-y-rizobacteria-sobre-la-produccion-de-trigo-Triticum-aestivum-L-en-suelo-calcareo.pdf)
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1997). *Azospirillum*–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43(2), 103-121.
- Bhattacharjee, R., & Dey, U. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(24), 2332-2343.
- Blakeslee J. J, s Peer W. A., Murphy A. S. (2005). MDR/PGP Auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant cell monogr* 1:159-176.
- Blanco, A. F. y Salas, A. E. (1997) Micorrizas en la Agricultura: contexto mundial de investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, vol. 21, no. 1, p 55-59.
- Bottini R, Cassan F, Piccoli P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl microbiol biotechnol* 65:497-503.
- Bohn, H. L., McNeal, B. L., O'Connor, G. A., & Orozco, M. S. (1993). *Química del suelo* (Vol. 1, pp. 123-153). México: Limusa.
- Bouillant, M. L., Miché, L., Ouedraogo, O., Alexandre, G., Jacoud, C., Sallé, G., & Bally, R. (1997). Inhibition of *Striga* seed germination associated with *Sorghum* growth promotion by soil bacteria. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 320(2), 159-162.
- Bradstreet, R. B. (1965). *The Kjeldahl method for organic nitrogen*. New York & London.
- Brown, J. R., Lambeth, V. N., & Blevins, D. G. (1969). Nutrient interaction effects on yield and chemical composition of spinach and green beans. Recuperado de: <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/53153/age000963.pdf?sequence=1>

- Burdman, S.; Jurkevitch, E.; Okon, Y. (2000). Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: Subba Rao N. S.; and Y. R. Dommergues (eds.). Microbial interactions in agriculture and forestry, pp. 229-250
- Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Ciencia y tecnología agropecuaria, 12(2), 159-166. Recuperado de: [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q+=mecanismos+de+accion+de+las+bacterias+2011&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q+=mecanismos+de+accion+de+las+bacterias+2011&btnG=)
- Campbell, C. R. (2000). Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States. Spinach, Greenhouse. pp 77.
- Carreño, Â. S. Esta publicación cuenta con la cofinanciación de Fedepalma-Fondo de Fomento Palmero. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Carvajal, J. & Mera, A. C. (2010). Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. Producción + Limpia. 5 (2):77. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942013000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942013000100003)
- Costacurta A. (1995). Genetic studies on the auxin hypothesis in the *Azospirillum*/plant inoculation. disertaciones de agricultura 275: 34-39.
- Chanway, C. P., & Holl, F. B. (1993). First year field performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 39(11), 1084-1088.
- Didonet, A. D., & Magalhães, A. C. (1997). Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. Soil Biology and Biochemistry, 29(11-12), 1743-1746.
- Epstein, E (1972) Mineral Nutrition of Plants. Principles and perspectives. Johon Wiley and Sons, Inc.
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. (2005). Bacterial fertilizers. en: Siddiqui ZA, editor. PGPr: biocontrol and biofertilization. Dordrecht, Springer. pp. 143-172.
- García de Salamone I, Hynes r, Nelson L. (2005). Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. en: Siddiqui ZA, editor. PGPr: biocontrol and biofertilization. Dordrecht, Springer. pp 173-195.
- Gianinazzi-Pearson T. P. (1982) Relation between the critical concentration of nitrogen, phosphorus, and potassium in 17 different vegetable crops a duration of growth. J. Sci. food. Agric. 31 (12): 1342-1353. Recuperado de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6832/6519>

- Guerrero García, A. (1990). El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos.
- Hernández M. I. (2000) Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosfericas como complemento de la nutrición mineral del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) Tesis de Maestría. INCA, La Habana. 86 p. Recuperado de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6832/6519>
- Hochmuth, G., Maynard, D., Vavrina, C., Hanlon, E., & Simonne, E. (2004). Plant tissue analysis and interpretation for vegetable crops in Florida. Recuperado de: [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Plant+Tissue+Analysis+and+interpretation+for+vegetable&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Plant+Tissue+Analysis+and+interpretation+for+vegetable&btnG=)
- Hunt, R. (1982). Plant growth curves. The Functional Approach. Recuperado de: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/te3267.pdf>
- Hunt, R. (1990). Basic growth analysis. Plant growth analysis for beginners. Acad. Div. Recuperado de: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/te3267.pdf>
- Iglesias M., González S., Suárez T. (2000). Utilización de inoculante mixto en trigo. Universidad Nacional de Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Argentina. 34 p. Recuperado de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6832/6519>
- INIFAP (2010). Recuperado de: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1674/Guia%20tecnica%20para%20el%20area%20de%20influencia%20del%20campo%20experimental%20valle%20de%20mexicali.pdf?sequence=1>
- Jetiyanon, K., & Kloepper, J. W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological control, 24(3), 285-291. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfd6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfd6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Jones, J. B. Jr. Wolf, B. and Mills, H. A. (1991) Plant Analysis Handbook pp 30-34 Micro Macro Publishing, In. Georgia, USA.
- Jones, J. B., Steyn, W. J. A., Walsh, L. M., & Beaton, J. D. (1973). Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. Soil testing and plant analysis, 2, 249-270.
- Kandil, A., Badawi, M. A., El-Mursy, S. A., & Abdou, U. M. A. (2004). Effect of planting dates, nitrogen levels and bio-fertilization treatments on 1: Growth attributes of Sugar Beet (*Beta vulgaris*, L.). Scientific Journal of King Faisal University (Basic Appl. Sci.), 5(2), 227-236. Recuperado de: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/9702697/b5292.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEffect\\_of\\_Planting\\_Dates\\_Nitrogen\\_Levels.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/9702697/b5292.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DEffect_of_Planting_Dates_Nitrogen_Levels.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-)

Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191215%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4\_request&X-Amz-Date=20191215T113935Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=89575ae44a2dd4fdb5c9f06c2fef8f202fc69ed4f108fb1e4daf6e933a27e818

- Kucey Rmn; Janzen Hh; Leggett Me, (1989). Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *ADv. Agron.* 42 199-228. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Leisinger T, Margraff R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev* 43(3):422-442.
- Lui, J; Maldonado-Mendoza, L.; Lopez-Meyer, M.; Cheung, F., Town, C.; Harrison, M. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50 (3). 529-544. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Morries, P. (1983). A century of Kjeldahl (1883-1983). *Journal of the Association of Public Analysts*, 21(JUN), 21:53-58.
- Nacamulli, C., Bevivino, A., Dalmastrri, C., Tabacchioni, S., & Chiarini, L. (1997). Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(3), 183-193.
- Ojeda, L. J. (1998). Efecto de micorrizas vesículo arbusculares del género *Glomus* en la producción de leguminosas forrajeras promisorias de la cuenca pecuaria El Tablón. Trabajo de Diploma. Villa Clara. Cuba.
- Ortíz Bustos, G. M. (2010). Evaluación del efecto de cuatro métodos de inoculación de dos cepas de *Azospirillum* spp., en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), variedades iniap 122 y 102, en las provincias de Imbabura y Pichincha (Bachelor's thesis).
- Pacovsky RS (1988) Influence of inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Glomus fasciculatum* on *Sorghum* nutrition. *Plant Soil* 110: 275-282.
- Pérez-Moreno, J., & Ferrera-Cerrato, R. (Eds.). (1996). Nuevos horizontes en agricultura: agroecología y desarrollo sostenible. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Piccoli, P., Masciarelli, O., & Bottini, R. (1999). Gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultured in chemically-defined medium as affected by oxygen availability and water status. *Symbiosis*, 27(2), 135-145.

- Pulido L. (2002). Hongos micorrizicos arbusculares y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: alternativas para la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y cebolla (*Allium cepa* L.) Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 98 p. Recuperado de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6832/6519>
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 20(1), 1-11.
- Rasul, G., Mirza, M. S., Latif, F., & Malik, K. A. (1998). Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass. In *Nitrogen fixation with non-legumes* (pp. 25-37). Springer, Dordrecht.
- Read, D. J. (1999). Mycorrhiza – State of the art. En Varma, a Hock, B. (Eds) 1999. *Mycorrhiza structure, Function, Molecular Biology and biotechnology*. Segunda Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 3-34 p. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Rivera, R., & Fernández, K. (2003). Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados. Rivera, R. /et al. /. *El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible*. Estudio de caso: El Caribe. La Habana, 49-94.
- Rodríguez, H.; Fraga, R. (1999) Phosphate bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17. 319-339. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Hernan\\_Romero3/publication/257792316\\_Soil\\_microbiology\\_an\\_element\\_to\\_increase\\_sustainability\\_of\\_oil\\_palm\\_plantations\\_in\\_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hernan_Romero3/publication/257792316_Soil_microbiology_an_element_to_increase_sustainability_of_oil_palm_plantations_in_Colombia/links/58b43bfda6fdcc6f03fe368a/Soil-microbiology-an-element-to-increase-sustainability-of-oil-palm-plantations-in-Colombia.pdf)
- Sánchez-Espindola M E, González Chávez M C, Ferrera-Cerrato R. (1996) Manejo de micorriza arbuscular en plantas de papaya. En Pérez-Moreno J, FerreraCerrato R (Eds.) *Agroecología y Desarrollo Sostenible*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp. 405-407.
- Sangoquiza Caiza, C. A., Yáñez, G., Cartagena Ayala, Y. E., & Borges, M. (2017). Respuesta del complejo *Azospirillum-Pseudomonas* en la extracción de nitrógeno y fósforo en la variedad de maíz INIAP-101.
- Sivori, M. E.; Montaldi, R. E.; Caso H.,O. (1980). *Fisiología vegetal*. Ed. Hemisferio sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 681 p. Recuperado de: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/te3267.pdf>

- Soroa M. R. (2000). Producción alternativa de *Gerbera jamesonii* para la floricultura urbana. Tesis de Maestría. UNAH. La Habana. 85 p. Recuperado de: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6832/6519>
- Tsavkelova E. A, Klimova S. Y, Cherdyntseva T. A, Netrusov A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42(2):117-126.
- Terry, E., Núñez, M., Pino, M. D. L. A., & Medina, N. (2001). Efectividad de la combinación biofertilizantes-análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos tropicales*, 22(2).
- Tien, T. M.; Gaskins, M. H. and Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37(5):1016-1024. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n1/2007-0934-remexca-7-01-00059.pdf>
- Torrente, D, (2010). Aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales*. 31 (1):19. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942013000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942013000100003)
- Uribe Valle, G., & Dzib Echeverría, R. (2006). Micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*), *Azospirillum brasilense* y Brassinoesteroide en la producción de maíz en suelo luvisol. *Agricultura técnica en México*, 32(1), 67-76.
- Valdivia-Urdiales, B., Sánchez-Yáñez, J. M., & Fernández-Brondo, J. M. EFECTO DE LA COINOCULACION ENDOMICORRIZA Y RIZOBACTERIA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN SUELO CALCÁREO. (1999). IV Simposio internacional y V Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: Usos del suelo, biota y energía, con fines de reconversión agrícola, como respuesta al incremento demográfico y cambio climático. México.
- Villarreal, J. (1988). Manual práctico para la interpretación de análisis de suelos en laboratorio.
- Warren, S. L., Campbell, C. R., & Skroch, W. A. (1990). Nutrient concentrations and their seasonal patterns in Fraser fir and Norway spruce grown in seven vegetation management programs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(1), 62-67. Recuperado de: <https://journals.ashs.org/jashs/abstract/journals/jashs/115/1/article-p62.xml>
- Whippis J. (2001). Microbial interactions ADN biocontrol in the rizosphere. *J Exp Bot* 52:487-511.