

Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill)

Beneficial microorganisms as efficient biofertilisers for tomato crops (*Lycopersicon esculentum*, Mill)

*Elein Terry Alfonso**, *Ángel Leyva**, *Annia Hernández***

RESUMEN

En el uso y manejo de biofertilizantes en la agricultura, uno de los principales problemas es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas y en la rizosfera de los cultivos, para su posible utilización eficiente. Desde el punto de vista ecológico, es importante conocer los integrantes de la comunidad bacteriana que favorecen su aplicación como inoculantes y propician un efecto agrobiológico positivo en los cultivos agrícolas. Esta investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la efectividad agrobiológica de *Azospirillum* sp, en el crecimiento, desarrollo y rendimiento en el cultivo del tomate. Para ello, se partió de seleccionar el género microbiano predominante en la rizosfera del cultivo y posteriormente se evaluó el efecto de su inoculación a partir de la respuesta del cultivo. Los resultados demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, forman parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del tomate, en las condiciones estudiadas, y que *Azospirillum* es el género dominante. La inoculación artificial de esta rizobacteria causó un efecto positivo sobre el crecimiento de las plántulas, así como en el estado nutricional de las plantas, con un rendimiento agrícola superior a un 11% con respecto a las plantas testigo. Se obtuvo un alto nivel poblacional en la rizosfera de las plantas inoculadas.

Palabras clave: rizosfera, inoculante, crecimiento, rendimiento.

ABSTRACT

One of the main problems regarding the efficient use and management of biofertilizers in agriculture lies in the unknown species present in agro-ecosystems and crop rhizospheres. From the ecological point of view, it is important to know the members of the bacterial population allowing them to be applied as inoculants and enable a positive agro-biological effect on agricultural crops. This investigation was aimed at evaluating the agro-biological effectiveness of *Azospirillum* sp. on tomato growth, development and yield. The predominating microbial genus in the crop rhizosphere was thus selected and the effect of inoculating it was then evaluated, judging by the crop's response. Results showed that *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* and *Streptomyces* belonged to the microbial population of the tomato rhizosphere under the studied conditions, *Azospirillum* being the most prominent genus. Artificial inoculation of this rhizobacteria caused a positive effect on seedling growth as well as on plant nutritional stage, the agricultural yield being higher in 11% compared to control plants. A high microbial population level was recorded in the rhizosphere of the inoculated plants.

Key words: rhizosphere, inoculant, growth, yield.

* Investigadores, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana, Cuba. Correo electrónico: terry@inca.edu.cu

** Profesor auxiliar, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Recibido: Enero 10 de 2004 Aceptado: Junio 30 de 2005

INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos más valiosos que puede utilizar la agricultura ecológica es el uso de biofertilizantes, lo cual en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad.

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 (Mejía, 1995).

Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Martínez, 2002). La efectividad en el uso de microorganismos se logra cuando se dan las condiciones óptimas para metabolizar los sustratos, como disponibilidad de agua, oxígeno (dependiendo de si son aerobios obligados o anaerobios facultativos), pH y temperatura, así como la disponibilidad de fuentes energéticas.

En el grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), *Azospirillum* sp. es considerado un sistema modelo para el estudio de la asociación entre bacterias y plantas que no nodulan (Bashan y Holguín, 1997). 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 (Burdman, Jurkevitch y Okon, 2000).

Partiendo de que uno de los principales problemas con el uso y manejo de biofertilizantes en la agricultura es el desconocimiento de las especies presentes en los agroecosistemas para su posible

utilización eficiente, el presente trabajo tuvo como objetivo general conocer el género microbiano predominante en la rizosfera del tomate, así como evaluar su efectividad agrobiológica a partir de su efecto en el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento de los microorganismos, se tomaron muestras de la localidad donde se desarrolló el experimento, el cual se ubicó en las áreas experimentales del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), en la provincia de La Habana, San José de las Lajas, donde el tipo de suelo es ferralítico rojo lixiviado que se correlaciona con Udic Rhodustalf, permitiendo aislar las cepas más atraídas por los exudados radicales del cultivo. Se realizaron cinco aislamientos por el método de modelo microcosmo (Kabir y Faure, 1995), a partir de la rizosfera de plantas de tomate con 15 días de germinadas.

La variedad de tomate empleado fue 'Amalia', procedente del Programa de Mejoramiento Genético del INCA. Las atenciones culturales se realizaron según el Instructivo técnico del cultivo (Cuba, Minagri, 1990). La fuente de nitrógeno que se usó fue la urea.

El bioproducto AzoFert[®], elaborado a base de la RPCV *Azospirillum brasilense* cepa Sp-7, el cual fue el género predominante en la rizosfera del cultivo, se inoculó según la tecnología de recubrimiento de las semillas elaborada por Gómez (1995), contando con un título de 10^8 UFC.g⁻¹ de soporte. Los tratamientos estudiados fueron los siguientes:

1. Testigo absoluto (sin inocular y sin fertilizar)
2. Testigo de producción (sin inocular) y 30 kg N.ha⁻¹(semillero) y 120 kg N.ha⁻¹(trasplante)
3. AzoFert + 30 kg N.ha⁻¹(semillero) y 60 kg N.ha⁻¹(trasplante)
4. AzoFert + 25 kg N.ha⁻¹(semillero) y 95 kg N.ha⁻¹(trasplante)

La fase de semillero contó con una superficie de 2 m² por tratamiento y la fase de trasplante se trabajó en una superficie de cálculo de 25 m², sembrado a una distancia de plantación de 1.40 x 0.30 m. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para la

fase de semillero así como bloques al azar con 4 réplicas para la fase de campo.

A los 30 días de germinadas las semillas, a una muestra de 15 plantas por tratamiento se les evaluó el crecimiento considerando variables como la altura y la longitud del sistema radical de las plántulas. En la fase de floración del cultivo se escogió un total de 10 muestras por tratamientos para las evaluaciones del contenido de NPK foliares según la técnica descrita en el manual de técnicas analíticas para laboratorio de suelo y planta (INCA, 1999).

Una vez se finalizó el ciclo biológico del cultivo, se determinó el rendimiento agrícola y algunos de sus componentes, correspondiente al porcentaje de fructificación y la masa promedio de los frutos.

Igualmente se determinó la colonización bacteriana (UFC.g⁻¹) a los 30, 60 y 120 días después de la inoculación, según metodología descrita por Bashan et ál. (1996).

Los procesamientos biométricos empleados fueron: para el análisis de la microbiota total (datos transformados a log UFC.g⁻¹) y la evaluación de crecimiento en plántulas, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y de clasificación doble para las evaluaciones del rendimiento y sus componentes; para docimar diferencias entre tratamientos, se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Se aplicó la prueba de χ^2 para comparar los porcentajes de las poblaciones microbianas obtenidas, así como para la frecuencia de aparición de los géneros microbianos estudiados. En todos los casos se

utilizó el Sistema Statistica versión 5.0, sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Poblaciones bacterianas presentes en la rizosfera

En la tabla 1 se presentan las poblaciones microbianas presentes en la rizosfera de plantas de tomate cultivadas en el suelo estudiado. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en los niveles poblacionales entre los suelos estudiados para $p < 0.05$. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que en este suelo existen condiciones favorables para el crecimiento de los microorganismos.

Al realizar las pruebas micromorfológico-culturales y fisiológico-bioquímicas en los diferentes medios selectivos, se encontraron los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* en la rizosfera del cultivo en las condiciones evaluadas (tabla 2).

Estudios realizados en condiciones climáticas y edáficas diferentes demostraron la presencia abundante de estos géneros microbianos; así se obtuvo en estudios rizosféricos desarrollados en el cultivo del maíz (Hernández, 2003).

Determinación de la frecuencia de aparición de los géneros presentes en la rizosfera

La figura 1 muestra la estructura de la comunidad microbiana presente en la rizosfera del cultivo; se observa que en este tipo de suelo (ferralítico rojo), el género *Azospirillum* se comporta como predominante con relación a los géneros restantes, y existen diferencias significativas entre ellos ($X^2 = 19.36$); este resultado puede deberse a la amplia gama de hormonas vegetales que estas bacterias exudan al medio, lo que les permite adaptarse y colonizar el ambiente rizosférico con mayor facilidad.

Tabla 1. Número de bacterias presentes en la rizosfera del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill)

Tipo de suelo	Microbiota total (UFC.g ⁻¹)	Log UFC.g ⁻¹
Ferralítico rojo lixiviado	1.65 x 10 ⁷	7.01

Tabla 2. Géneros microbianos presentes en la rizosfera (UFC.g⁻¹)

Tipo de suelo	<i>Pseudomonas</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
Ferralítico rojo lixiviado	5.7 x 10 ⁶	6.8 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶

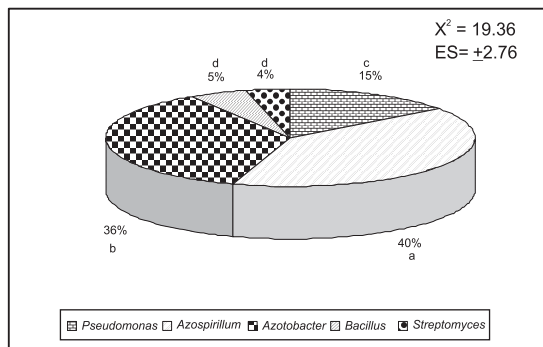


Figura 1. Frecuencia de aparición de los géneros microbianos en estudio.

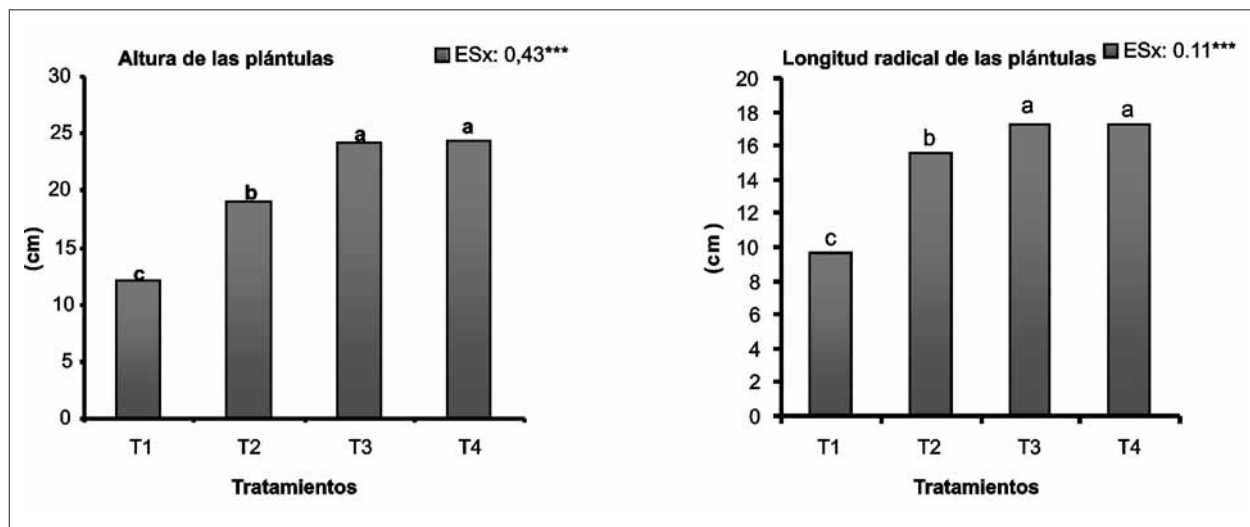
Con relación al género *Azotobacter*, que es el que continúa con mayor frecuencia de aparición, Martínez (1998) ha obtenido un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate que se siembra en suelo ferralítico rojo, demostrándose la importancia de establecer altas poblaciones de esta bacteria en la rizosfera de las plantas a través de la aplicación de productos de origen bacteriano con el fin de obtener un mayor efecto agrobiológico positivo.

Muy baja frecuencia de aparición se obtuvo para los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, lo que representaría una alta inoculación artificial para lograr un efecto positivo en las plantas inoculadas con estos géneros microbianos.

Influencia de *Azospirillum* sp. en el crecimiento de plántulas de tomate

En la figura 2 se muestra el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las posturas, obteniéndose las plántulas más vigorosas en cuanto a la altura y la longitud de las raíces en los tratamientos donde se inoculó el biofertilizante AzoFert® combinado con dosis de 30 y 25 kg N.ha⁻¹ respectivamente, difiriendo estadísticamente del testigo absoluto y del testigo de producción. Este resultado pone de manifiesto la eficiencia de la rizobacteria al permitir disminuir la dosis de fertilizante nitrogenado sin afectar la calidad de las plantas. Se demuestra, por otra parte, lo esencial del macronutriente nitrógeno en su efecto sobre el crecimiento de las plantas, ya que la no aplicación del mismo (testigo absoluto) produjo un efecto negativo en las variables evaluadas.

Con relación al efecto de diferentes rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, en Cuba varios autores obtuvieron resultados positivos; en este sentido pueden citarse los trabajos realizados por Dibut (2000) y Pulido (2002) con la utilización de *Azotobacter chroococcum* en el cultivo de la cebolla y también Martínez (2002) con aplicaciones de este microorganismo en el cultivo del tomate.



Tratamientos: T1: Testigo absoluto. T2: Testigo de producción. T3: AzoFert®+30 kg N.ha⁻¹. T4: AzoFert®+25 kg N.ha⁻¹.

Figura 2. Influencia de *Azospirillum* en el crecimiento de plántulas de tomate.

En la figura 3 se corrobora el efecto encontrado en la evaluación del crecimiento, donde se destaca la influencia positiva de la inoculación con *Azospirillum* que originó un mayor vigor de las plántulas.



Figura 3. Influencia de *Azospirillum* (AzoFert®) en el vigor de plántulas de tomate.

Bashan y Levanony (1990) atribuyen el efecto de estas rizobacterias a lo que ellos denominan “hipótesis aditiva” en la que más de un mecanismo está involucrado en la asociación planta-rizobacteria, los cuales operan simultáneamente o en asociación.

En cuanto al mecanismo de acción mediante el cual *Azospirillum* sp. promueve el crecimiento vegetal, Bashan (1999) plantea que posiblemente más de un mecanismo de acción esté involucrado en la asociación y que estos operan simultáneamente o en sucesión; la suma de los diferentes mecanismos

refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son inducidos bajo condiciones ambientales propicias. Entre estos mecanismos se encuentra la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal, los cuales inducen un incremento en el número y longitud de los pelos radicales (Bacilio-Jiménez, 2001), a lo que se suma las contribuciones al aumento de la masa seca de las plantas, a través de la enzima nitrato reductasa, para una mejor asimilación de los nitratos presentes en el suelo, o por los aportados a través de la fertilización inorgánica (Fallik et ál., 1994).

Diferentes autores encontraron respuesta positiva en el crecimiento de las plantas al inocular *Azospirillum* sp.; en la literatura existen trabajos publicados por Bashan (1989) que en experimentos realizados con *A. brasilense* Cd obtuvieron un incremento de la masa fresca y seca de plántulas de tomate y en la elongación de las raíces en otros cultivos. Este resultado expresa la especificidad entre los exudados radicales de este cultivo y la rizobacteria *A. brasilense* (cepa Sp-7) a partir del estímulo provocado sobre el crecimiento de las plántulas, lo cual constituye un importante resultado desde el punto de vista práctico para el manejo agronómico de este cultivo.

Influencia de los tratamientos en los contenidos de N, P, K foliar

En la tabla 3 se indican los contenidos foliares de nitrógeno, fósforo y potasio presentes en las plantas inoculadas con *Azospirillum brasilense* y suplementada su nutrición con fertilización nitrogenada, respecto al testigo de producción. El análisis estadístico arrojó diferencias altamente significativas entre los tratamientos para cada uno de los macroelementos

Tabla 3. Contenidos de N, P, K foliar de plantas de tomate

Tratamientos	N (%)	P (%)	K (%)
Testigo absoluto	1.26 c	0.36 c	1.18 c
Testigo de producción	2.57 b	0.43 b	1.92 b
AzoFert® + 90 kg N.ha ⁻¹	3.37 a	0.51 a	2.05 a
AzoFert® + 120 kg N.ha ⁻¹	3.41 a	0.52 a	2.06 a
ES	0.41 ***	0.05***	0.17***

Medias con letras comunes no difieren significativamente para p<0.001.

determinados; los porcentajes de NPK fueron superiores en las plantas inoculadas en la siembra con respecto al testigo de producción. Se demuestra la eficiencia de *Azospirillum* al no existir diferencias entre las dosis de 90 y 120 kg N.ha⁻¹.

Con este resultado se demuestra que las plantas inoculadas con algún microorganismo que estimule su crecimiento y desarrollo, presentan una mayor capacidad para absorber más eficientemente el agua y los nutrientes del suelo a través del estímulo provocado en el sistema radical, que se evidencia en el estado nutricional de las plantas.

Según Bashan (1998), *Azospirillum* sp. provoca una absorción más efectiva de los nutrientes, lo que explica la acumulación de compuestos nitrogenados en las plantas sin existir una aparente fijación biológica de nitrógeno.

Efectos de los tratamientos en el rendimiento agrícola y sus componentes

En la tabla 4 se muestra el efecto de los tratamientos en el rendimiento agrícola y algunos de sus componentes; se aprecia que en el tratamiento 4, en el cual se inoculó el producto AzoFert, combinado con 120 kg de nitrógeno, se produjo un estímulo positivo en cada uno de los indicadores evaluados. Este resultado permite además la disminución de 30 kg de N.ha⁻¹ en el cultivo, demostrándose así la eficiencia de esta rizobacteria, a partir de una sustitución del fertilizante, que representa un 20%

menos de la cantidad que se aplica según la norma técnica del cultivo.

El efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp. sobre el rendimiento total aumenta generalmente con el crecimiento de las plantas y está en un rango de 10-30% (Bashan y Vázquez, 2000). En este estudio se produjo un incremento del rendimiento con respecto al testigo de producción en un 11%.

Dos variables básicas que contribuyen a la respuesta del rendimiento a la inoculación son los cultivos –los cuales muestran respuestas diferentes a la inoculación– y al nivel de fertilización nitrogenada; por lo tanto, la inoculación de *Azospirillum* sp. puede considerarse un sustituto parcial de la fertilización nitrogenada (Schloter y Hartmann, 1998).

La posibilidad de utilizar microorganismos del suelo que favorezcan la nutrición y desarrollo de las plantas ofrece nuevas alternativas para incrementar el rendimiento y mejorar la eficiencia del uso de los fertilizantes minerales; algunos de estos microorganismos se vinculan con la fijación biológica de nitrógeno e incorporan al suelo cantidades variables de nitrógeno.

Efectos en la colonización rizosférica de plantas de tomate

En la figura 4 se puede apreciar la dinámica poblacional de esta rizobacteria en la evaluación realizada en el momento del trasplante (ODDT); se muestra

Tabla 4. Efectos de los tratamientos en el rendimiento y sus componentes

Tratamientos	Flores/planta (No.)	Frutos/planta (No.)	Masa promedio/ frutos (g)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Testigo absoluto	11.3 c	7.5 c	86.5 c	17.41 c
Testigo producción	16.4 b	11.6 b	93.3 a	31.53 b
AzoFert® + 90 kg N.ha ⁻¹	19.3 a	13.4 a	90.8 b	35.12 a
AzoFert® + 120 kg N.ha ⁻¹	15.5 b	10.8 b	93.4 a	30.64 b
ES	0.12***	0.10***	0.21***	0.19***

Medias con letras comunes no difieren significativamente para p<0.001.

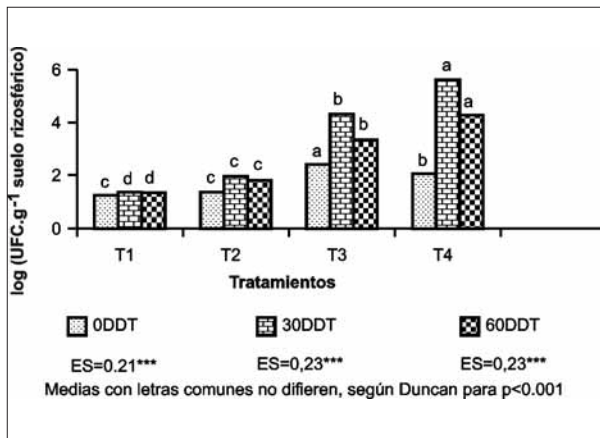


Figura 4. Influencia de la inoculación con *Azospirillum* en la colonización rizosférica (DDT: días después del trasplante).

que la mayor colonización se obtuvo en los tratamientos inoculados y suplementados con 30 kg N.ha⁻¹, lo que difirió estadísticamente ($p < 0.001$) de los tratamientos donde se encuentra la población nativa del suelo (T1 y T2). A partir de los 30 DDT, y correspondiendo con la etapa de floración-fructificación del cultivo, se obtuvo que la inoculación con esta especie suplementada con 120 kg N.ha⁻¹ (T4) fue la que mostró mayor colonización radical, con diferencias altamente significativas de los restantes tratamientos, alcanzando una población de 10^7 UFC.g⁻¹ de suelo, lo cual puede considerarse un valor óptimo, en un momento importante del desarrollo del cultivo en que son altas las necesidades nutricionales de las plantas para la formación de la producción final.

En la evaluación realizada a los 60 días (DDT) la población de esta rizobacteria comienza a declinar, coincidiendo con la muerte de las plantas y de su sistema radical, el cual constantemente le aporta a estas bacterias gran número de sustancias orgánicas (azúcares y aminoácidos) en forma de exudados necesarios para su metabolismo. La alta población encontrada (10^7) indica el grado positivo de quimiotaxis entre los exudados radicales y la bacteria. Al respecto, Velazco (2001) plantea que la presencia o no en la rizosfera de un cultivo conformando un ecosistema dado, está influida por diferentes factores abióticos como son el tipo de suelo, el grado de humedad, la fertilización aplicada y la temperatura. También influyen marcadamente la composición del hábitat como una unidad biológica de las relaciones microbianas que se establecen, ya que puede existir afinidad o no, y, dependiendo de los exudados

radicales, existirá quimiotaxis positiva o negativa de las RPCV. Se demuestra la eficiencia de *Azospirillum brasilense* como rizobacteria que estimula positivamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento en el cultivo del tomate a partir de una alta colonización. Este resultado apoya el criterio de selección de esta especie como una alternativa eficiente para la producción del cultivo del tomate.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

El género *Azospirillum* se destacó por ser el de mayor frecuencia de aparición en la rizosfera del cultivo del tomate.

Se demuestra la efectividad agrobiológica de *Azospirillum brasilense* a partir del estímulo positivo ejercido en el crecimiento y estado nutricional de las plantas así como en el rendimiento agrícola del cultivo; y se establece con un alto nivel poblacional en la rizosfera de las plantas inoculadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bacilio-Jiménez, F. J. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33(2):167-172.
- Bashan, Y. 1989. Nonespecific responses in plant growth, yield and root colonization of noncereal crops plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany*. 67(5): 1317-1324.
- Bashan, Y.; Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* (36): 591-608.
- Bashan, Y.; Holguín, G.; Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra*. 14(2): 195-209
- Bashan, Y.; Holguín, G. 1997. *Azospirillum* - plant relationship: environmental and physiological advances. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 103-121.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth - promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
- Bashan, Y. 1999. Interaction of *Azospirillum* spp. in soil: a review. *Biol. Fert. Soil*. 29: 246-256
- Bashan, Y.; Vázquez, P. 2000. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. *Biol. Fert. Soil*. 30: 450-459.
- 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.
- Cuba, Minagri. 1990. Instructivo técnico para el cultivo del tomate. Folleto. 48.
- Dibut, B. 2000. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa*, L). Tesis de Doctorado. INIFAT. La Habana. Cuba. 100.
- Fallik, E. K; Sarg, S, F.; Okon, Y. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum* in wheat. In: *Azospirillum plant association*. Okon, Y. (ed.). Boca Ratón: CRC Press, pp. 77-85.
- Gómez, R. 1995. Tecnología para peletizar semillas con biofertilizantes, una nueva opción para sustituir o reducir los insumos químicos para lograr una agricultura más ecológica y sostenible. En: II Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. Libro resúmenes. La Habana, Cuba.
- Hernández, A. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays*) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 5 No. 1: 45-55.
- Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 1999. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. La Habana. 53.
- Kabir, M.; Faure, D. 1995. Identification of *Azospirillum* by oligonucleotide probes after isolation from soil and *Sorghum rizoplan* contaminated or not by the parasitic plant: *Striga*. *Advances in Applied Microbiology*. 35: 195-253.
- Martínez, V. R. 1998. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre los cultivos de tomate y cebolla en suelos ferralíticos rojos. INIFAT. La Habana. 6.
- Martínez, V. R. 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. XIII Congreso Científico del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.
- Mejía, G. 1995. *Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química*. Cali, Colombia: Feriva, 252.
- Pulido, L. 2002. Manejo integrado de biofertilizantes para la producción de posturas de alta calidad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y cebolla (*Allium cepa*, L) sobre suelos ferralíticos rojos de Ciego de Ávila. Tesis presentada en opción al grado científico de Dr. en Ciencias Agrícolas. La Habana. 97.
- Schlöter, M.; Hatmann, A. 1998. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. *Symbiosis*. 25(1-3): 159-179
- Velazco, A. 2001. Utilización de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oriza sativa* L) sobre un suelo hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río. Tesis presentada en opción al grado científico de Dr. en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana. 100.