

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento”.

Previo a la obtención del Título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:
ELSA JOHANA ECHEVERRÍA LANDETA

SANGOLQUÍ, 2012.

LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO

ELABORADO POR

Srta. Elsa Johana Echeverría Landeta

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco Bravo, MSc

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ELSA JOHANA ECHEVERRÍA LANDETA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Fecha

Dra. María Emilia Medina
DIRECTORA

B.Sc Karina Ponce
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Elsa Johana Echeverría Landeta

Declaro que:

El proyecto de grado denominado (Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento) ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al final de los párrafos correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Lugar y Fecha

Elsa Echeverría

DEDICATORIA

El presente trabajo dedico primeramente a Dios, quien ha guiado mi camino.

A mis padres José y Luisa, quienes con esfuerzo y comprensión me han sabido apoyar en todo momento.

A mi hermana María José y a mi novio Miguel por confiar en mí y por demostrarme su cariño incondicional, a todos ustedes gracias por ser parte fundamental en mi vida.

Elsa Johana Echeverría Landeta

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su apoyo, por brindarme confianza y amor en todo momento. Por estar siempre a mi lado compartiendo triunfos y pesares, teniendo las palabras precisas para darme ánimo y fuerza para culminar con mi carrera. A mi hermana por ser mi apoyo, a Miguel por estar presto ayudarme en la tesis, desde el trabajo en campo hasta los ensayos en laboratorio, sin importar tiempo y lugar siempre dispuesto a colaborar.

A María Emilia por haber confiando en mí, y darme la oportunidad de realizar la tesis en el Laboratorio de Microbiología de Suelos que está bajo su dirección. Por sus palabras de aliento y por estar pendiente no solo del trabajo de la tesis, sino brindarme la confianza para compartir momentos de mi vida, a Kary por brindarme sus conocimientos para llevar adelante el ensayo, por escucharme y aconsejarme cuando lo he necesitado.

A mis profesoras y amigos Alma Koch, Blanca Naranjo, Pedro Romero, Soledad Benítez y Jessica Maisincho que colaboraron con sus críticas constructivas para mejorar el ensayo de investigación, con el préstamo de materiales y equipos para la ejecución del presente trabajo.

A mis amigos queridos que compartieron buenos y malos momentos a lo largo de la carrera: Anita, Danny, Patty, Liz, y en especial un agradecimiento a Tañys y Cris por su apoyo en la elaboración de la tesis, quienes con sus consejos me ayudaron a buscar las mejores opciones para el ensayo. Finalmente les agradezco a mis compañeros del laboratorio: Chabe, Estefy, Caro, Adrián, Danny e Ibeth. A todos ustedes gracias por compartir este trabajo que ahora representa un importante mérito logrado en esta etapa de mi vida.

Elsa Johana Echeverría Landeta

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO | ii |
| CERTIFICACIÓN | iii |
| DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ANEXOS | xii |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Formulación del problema | 1 |
| 1.2 Justificación del problema..... | 1 |
| 1.3 Objetivos de la investigación | 2 |
| 1.3.1 Objetivo general..... | 2 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 3 |
| 1.4 Marco teórico | 3 |
| 1.4.1 Cultivo de tomate de árbol..... | 3 |
| 1.5 Microorganismos rizosféricos | 9 |
| 1.5.1 Hongos micorrícicos | 10 |
| 1.5.2 Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) | 11 |
| 1.5.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)..... | 15 |
| 1.5.4 <i>Pseudomonas</i> sp..... | 15 |
| 1.5.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 16 |
| 1.5.6 Bacterias que ayudan a la micorrización (MHB)..... | 19 |
| 1.6 Sistema de hipótesis | 21 |
| CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 2.1 Participantes | 22 |
| 2.2 Zona de estudio | 22 |
| 2.3 Período de tiempo de investigación..... | 23 |

| | | |
|-----------------------------|---|----|
| 2.4 | Diseño..... | 24 |
| 2.5 | Procedimientos | 25 |
| 2.5.1 | Selección y recolección de muestras de rizósfera..... | 25 |
| 2.5.2 | Procesamiento de muestras para el aislamiento e identificación de HMA .. | 26 |
| 2.5.3 | Conteo de esporas de HMA | 27 |
| 2.5.4 | Porcentaje de colonización de HMA | 27 |
| 2.5.5 | Propagación de esporas de HMA..... | 28 |
| 2.5.6 | Procesamiento de muestras para el aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 29 |
| 2.5.7 | Cálculo de las densidades poblacionales de <i>Pseudomonas</i> sp. en las zonas muestreadas..... | 30 |
| 2.5.8 | Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 30 |
| 2.5.9 | Selección de tres cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> para su aplicación en el ensayo..... | 33 |
| 2.5.10 | Preparación y esterilización del sustrato..... | 34 |
| 2.5.11 | Desarrollo del inóculo bacteriano | 34 |
| 2.5.12 | Aplicación de inóculos de HMA y <i>Pseudomonas fluorescens</i> en las plántulas de tomate de árbol. | 35 |
| 2.5.13 | Mantenimiento del ensayo | 35 |
| 2.5.14 | Evaluación de las plantas al final del ensayo..... | 35 |
| CAPÍTULO 3: RESULTADOS..... | | 37 |
| 3.1 | Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) asociados al cultivo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 37 |
| 3.2 | Densidad poblacional de <i>Pseudomonas</i> sp. en las zonas muestreadas con cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) | 38 |
| 3.3 | Aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 40 |
| 3.4 | Selección de tres cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> para su aplicación en el ensayo | 42 |
| 3.5 | Evaluación del desarrollo y nutrición de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) inoculadas con HMA y <i>P.fluorescens</i> | 43 |
| 3.5.1 | Altura | 45 |
| 3.5.2 | Área foliar | 46 |
| 3.5.3 | Biomasa aérea y radicular..... | 47 |
| 3.5.4 | Conteo de esporas y porcentaje de colonización en las plantas de tomate de árbol..... | 48 |

| | | |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| 3.5.5 | Conteo de la densidad poblacional de <i>P.fluorescens</i> de raíces y rizósfera en las plantas de tomate de árbol | 50 |
| 3.5.6 | Análisis de correlación entre la población de micorrizas y las variables de desarrollo..... | 51 |
| 3.5.7 | Supervivencia de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) | 52 |
| 3.5.8 | Análisis de nutrientes a nivel foliar | 53 |
| 3.5.9 | Análisis de nutrientes en el suelo..... | 56 |
| CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN | | 58 |
| 4.1 | Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) asociados al cultivo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 58 |
| 4.2 | Densidad poblacional de <i>Pseudomonas</i> sp. en las zonas muestreadas con cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) | 59 |
| 4.3 | Selección de cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> para su aplicación en el ensayo... .. | 59 |
| 4.4 | Evaluación del desarrollo de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) inoculadas con HMA y <i>P.fluorescens</i> | 60 |
| 4.4.1 | Conteo de esporas y porcentaje de colonización micorrícica al finalizar el ensayo..... | 61 |
| 4.4.2 | Conteo de la densidad poblacional de <i>P.fluorescens</i> de raíces y rizósfera al finalizar el ensayo | 62 |
| 4.4.3 | Análisis de la correlación entre la población de micorrizas y las variables de crecimiento..... | 64 |
| 4.4.4 | Análisis de nutrientes a nivel foliar y del suelo de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) inoculadas con HMA y <i>P.fluorescens</i> | 65 |
| CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES | | 68 |
| CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES | | 70 |
| CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA | | 71 |
| ANEXOS | | ¡Error! Marcador no definido. |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1 Niveles de fertilización recomendados en base a la interpretación del análisis de suelo..... | 6 |
| Tabla 1.2 Nutrientes óptimos a nivel foliar del cultivo de tomate de árbol en plantas de 15 meses de edad..... | 6 |
| Tabla 2.1 Información geográfica y características de la rizósfera de los cultivos muestreados para el aislamiento e identificación de los microorganismos rizosféricos: HMA y <i>P. fluorescens</i> | 23 |
| Tabla 2.2 Tratamientos aplicados en las plántulas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 25 |
| Tabla 3.1 Características morfológicas y producción de pioverdina de las cepas de <i>P. fluorescens</i> aisladas de los cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 41 |
| Tabla 3.2 Características fenotípicas de las cepas de <i>P. fluorescens</i> aisladas de los cultivos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) en las diferentes zonas de muestreo..... | 41 |
| Tabla 3.3 Selección de las cepas de <i>P. fluorescens</i> solubilizadoras de fosfato inorgánico en el medio Agar Pikovskaya..... | 42 |
| Tabla 3.4 Efecto de la inoculación simple y combinada de los HMA y las cepas de <i>P. fluorescens</i> en concentraciones de 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml sobre el desarrollo del tomate de árbol..... | 43 |
| Tabla 3.5 Efecto de la interacción entre HMA y las cepas de <i>P. fluorescens</i> en el conteo de esporas y porcentaje de colonización de plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 49 |
| Tabla 3.6 Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de respuesta de los microorganismos aplicados y las variables de crecimiento en las plantas de tomate de árbol..... | 52 |
| Tabla 3.7 Efecto de las micorrizas y de la combinación entre HMA y <i>P. fluorescens</i> sobre el porcentaje de P foliar en las plantas de tomate de árbol..... | 53 |
| Tabla 3.8 Efecto de la inoculación simple y combinada de las micorrizas y <i>P. fluorescens</i> sobre el porcentaje de N foliar de plantas de tomate de árbol..... | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Fases de desarrollo de la micorriza arbuscular..... | 12 |
| Figura 1.2 Interacción entre HMA, bacterias (<i>Pseudomonas</i> sp.) y raíces de las plantas..... | 20 |
| Figura 2.1 Recolección de muestras de suelo del cultivo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) en diferentes zonas del país..... | 26 |
| Figura 2.2 Mantenimiento de los cultivos trampa de avena para la propagación de esporas de HMA..... | 29 |
| Figura 3.1 Densidad de esporas de HMA por gramo de suelo presente en las muestras de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 37 |
| Figura 3.2 Estructuras fúngicas en raíces de avena (<i>Avena sativa</i>) procedentes de las macetas de propagación..... | 38 |
| Figura 3.3 Densidad bacteriana de <i>Pseudomonas</i> sp por gramo de suelo (UFC/g suelo) en las muestras de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 39 |
| Figura 3.4 Densidad bacteriana de <i>Pseudomonas</i> sp por gramo de raíces (UFC/g raíces) en las muestras de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 39 |
| Figura 3.5 Presencia de halos de solubilidad de fosfato tricálcico de las cepas de <i>P. fluorescens</i> aplicadas en las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) (7mo día de ensayo)..... | 42 |
| Figura 3.6 Efecto de la aplicación de las cepas de <i>P. fluorescens</i> : Z2P6, Z5P5 y Z5P6 sobre el desarrollo de las plantas de tomate de árbol a los 120 días de ensayo..... | 44 |
| Figura 3.7 Efecto de la interacción simple y combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 de <i>P. fluorescens</i> sobre la altura de las plantas de tomate de árbol..... | 46 |
| Figura 3.8 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre el área foliar..... | 47 |
| Figura 3.9 Efecto de la interacción entre HMA y cepa Z5P6 sobre la biomasa aérea y radical de las plantas de tomate de árbol..... | 48 |
| Figura 3.10 Estructuras fúngicas en raíces de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) luego de cuatro meses de ensayo..... | 50 |
| Figura 3.11 Densidad bacteriana de <i>P. fluorescens</i> por gramo de raíces y suelo de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)..... | 51 |
| Figura 3.12 Supervivencia de las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) durante cuatro meses de ensayo..... | 52 |
| Figura 3.13 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de fósforo en las plantas de tomate de árbol..... | 54 |
| Figura 3.14 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de nitrógeno en las plantas de tomate de árbol..... | 56 |

ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo A. Composición de la solución nutritiva de Hewitt..... | 79 |
| Anexo B. Análisis de nutrientes a nivel foliar en las plantas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) luego de cuatro meses de ensayo..... | 80 |
| Anexo C. Análisis de nutrientes en el suelo de los catorce tratamientos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>) luego de cuatro meses de ensayo..... | 81 |

RESUMEN

El cultivo de tomate de árbol es una especie frutal de gran aceptación en el mercado nacional e internacional, por su calidad organoléptica y sus propiedades medicinales. Por ello, es necesario contribuir a mejorar la nutrición y desarrollo de este cultivo mediante el fortalecimiento de una agricultura sustentable, con el uso de microorganismos benéficos de la rizósfera, considerados biofertilizantes por ayudar a preservar la calidad ambiental y a la vez mejorar la calidad de vida.

Bajo este contexto en la presente investigación se utilizaron dos tipos diferentes de biofertilizantes (microorganismos nativos de tomate de árbol): uno constituido por un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y otro formado por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) *Pseudomonas fluorescens*. Inicialmente se identificaron y propagaron las micorrizas y en un posterior muestreo se aislaron y se seleccionaron tres cepas de *P. fluorescens* por su capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. Se procedió a inocular las plántulas de tomate de árbol de 15 días de edad con 1,09 esporas/g de HMA por maceta, a las que transcurrido un mes se aplicaron diferentes cepas (Z2P6, Z5P5 y Z5P6 en concentraciones de 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) según el diseño experimental establecido. Al finalizar el ensayo (cuatro meses) se observó un mayor desarrollo vegetal en las plantas co-inoculadas con HMA y la cepa Z5P6 (en concentración de 6.0×10^8 UFC/ml) presentando un aumento en la altura de 1 vez, área foliar de 2 veces, biomasa aérea y peso radicular de 3 respecto a las plantas control. Tanto las plantas micorrizadas como las co-inoculadas (con HMA y *P. fluorescens* cepa Z5P6) mostraron una mayor absorción de los nutrientes: fósforo y nitrógeno en comparación con aquellas con inoculación simple de rizobacterias y los controles, probablemente debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

ABSTRACT

The sweet tomato crop is a fruit species of great acceptance in the national and international markets for their organoleptic and medicinal properties. Therefore, it's necessary to contribute to improve nutrition and development of this crop by strengthening sustainable agriculture, with the use of beneficial microorganisms on the rhizosphere considered biofertilizers to help preserve environmental quality while improving the quality of life.

In this context in the present investigation it was used two different types of biofertilizers (native microorganisms of sweet tomato): one formed by a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and other formed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens*. Initially mycorrhizae were identified and propagated in a subsequent sample were isolated and selected three strains of *P. fluorescens* for their ability to solubilize tricalcium phosphate. The sweet tomato seedlings of 15 days age were inoculated with 1.09 spores/g of AMF per pot, within a month different bacterial strains (Z2P6, Z5P5 and Z5P6 at concentrations of 1.5×10^8 and 6.0×10^8 UFC/ml) were applied according to the experimental design set. At the end of the test (four months) the results showed greater growth for co-inoculated plant with AMF and Z5P6 strain (at a concentration of 6.0×10^8 UFC/ml) showing a increase one time the height, twice the leaf area and three time the aerial biomass and root weight compared to control plants. Both mycorrhizal plants as co-inoculated (AMF and *P. fluorescens* Z5P6 strain) showed a greater absorption of nutrients: phosphorus and nitrogen compared with those with single inoculation of rhizobacteria and control group, probably, these results were due to the ability of microorganisms to decompose organic matter, achieving greater mobility and assimilation of nutrients.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El tomate de árbol, es un frutal exótico reconocido por su calidad organoléptica y sus propiedades medicinales atribuidas al contenido de vitaminas y minerales, por esta razón ha ido en aumento la conquista de nuevos mercados, hasta llegar a tener un reconocimiento internacional. Sin embargo, hasta la presente fecha no ha sido posible consolidar un mercado estable permanente, por falta de tecnificación en el cultivo (manejo de plagas, nutrición, riego, cosecha y postcosecha) y sobre todo por el uso inadecuado de fertilizantes que han ocasionado grandes pérdidas económicas a los fruticultores y graves consecuencias ambientales (Soria, et al., 2008). Los fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos al ser utilizados en exceso, provocan el deterioro de la macro y microfauna del suelo, por consiguiente las especies vegetales no son capaces de obtener los nutrientes de un suelo muerto y erosionado, lo cual las hace dependientes de estos productos sintéticos. En otros casos los contaminantes se difunden hacia cuerpos de agua, alterando la vida acuática de los mismos, se concentran en las cadenas alimentarias y a la vez causan toxicidad en el ser humano (Ramírez, A y Mijangos, A., 2000).

1.2 Justificación del problema

Siendo el tomate de árbol una especie frutal de gran aceptación en el mercado nacional e internacional, es importante contribuir a mejorar la nutrición y desarrollo del cultivo mediante el fortalecimiento de una agricultura sustentable, prestando especial atención al estudio de los microorganismos rizosféricos, cuyos beneficios se ven reflejados en un aumento de la producción, mediante una mayor absorción de agua y nutrientes del suelo a través de la biodegradación acelerada de desechos orgánicos. Estas ventajas redundan en un beneficio directo a los sistemas agrosostenibles, dado que los

biofertilizantes preservan la calidad ambiental y disminuyen el uso de fertilizantes químicos-contaminantes mejorando la calidad de vida.

La actividad de estos microorganismos considerados como “biofertilizantes” se enmarca fundamentalmente, en la rizósfera, "esfera de influencia de la raíz", la cual contiene una población microbiana que se desarrolla dentro y fuera de las raíces de las especies vegetales, y es mediada por la liberación continua de metabolitos proporcionados por las plantas, que son rápidamente utilizados como sustrato para el desarrollo de los mismos, bajo condiciones normales de crecimiento (Arines, et al., 1992).

En referencia a la importancia y proyección que presenta el cultivo de tomate de árbol, es necesario contribuir a su mejora vegetal, aumentando su productividad mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas, dentro de las cuales el establecimiento de asociaciones benéficas entre los hongos mutualistas HMA y bacterias promotoras del crecimiento vegetal tales como *Pseudomonas fluorescens* presentan gran aplicación en la agricultura, confiriéndoles innumerables beneficios a las plantas.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la interacción entre hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* en el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar esporas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en las zonas con cultivos de tomate de árbol orgánicos.
- Propagar los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) asociados al cultivo de tomate de árbol en plantas huésped de avena.
- Aislar, identificar y propagar rizobacterias: *Pseudomonas fluorescens*, asociadas al cultivo de tomate de árbol.
- Establecer las concentraciones adecuadas de HMA y *P. fluorescens* para la aplicación de los inóculos en plantas de tomate de árbol, según el diseño experimental a utilizarse.
- Aplicar los inóculos de hongos micorrícicos arbusculares y de *Pseudomonas fluorescens* en plántulas de tomate de árbol.
- Evaluar la población de esporas, el porcentaje de colonización micorrícica (HMA) y la población bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* en raíces y rizósfera presentes en las plantas de tomate de árbol inoculadas vs. no inoculadas.
- Determinar el porcentaje de supervivencia y el desarrollo de las plantas (altura, diámetro del tallo, área foliar, biomasa aérea y radical)
- Evaluar la nutrición de las plantas mediante la capacidad de absorción de macro y microelementos en todos los tratamientos.
- Determinar el contenido de nutrientes del sustrato utilizado en todos los tratamientos del diseño experimental.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Cultivo de tomate de árbol

1.4.1.1 Descripción botánica

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un frutal proveniente de una planta arbustiva de la familia Solanácea. Su raíz es profunda (puede alcanzar hasta 1m) con bastantes raíces secundarias que se concentran hasta 50cm de profundidad. Su tallo cilíndrico inicialmente es suculento, pero a medida que se desarrolla y ramifica, empieza

a tornarse semileñoso y puede alcanzar hasta 3m de altura. Presenta hojas cordiformes, entre 30-40 cm de largo, su color varía entre verde oscuro y claro de acuerdo al genotipo, con ligera pubescencia en el envés. Su inflorescencia es un racimo, conformada hasta por 40 flores pediceladas, con corola de color rosado. Sus frutos son bayas suspendidas por un pedúnculo largo, de forma generalmente ovalada, epidermis lisa y brillante, de color verde cuando está inmaduro y en su estado de madurez puede variar en amarillo, anaranjado, rojo y púrpura oscuro, la pulpa es jugosa, agridulce, de color anaranjado claro a intenso, el interior contiene entre 200 a 300 semillas circulares y planas, blancas cuando son tiernas y con pigmentos anaranjados, rojizos o morados cuando alcanzan la madurez (INIAP, 2004).

1.4.1.2 Origen y zonas de producción en el país

El tomate de árbol es originario de los Andes, específicamente de Ecuador, Perú, Chile y Bolivia, posteriormente fue naturalizado en: Brasil, Argentina, Colombia y Venezuela. En la actualidad ocupa grandes extensiones de terreno en Nueva Zelanda convirtiéndose en un cultivo intensivo y de exportación (Pilco, 2009).

La producción en el país es de aproximadamente 14.324 hectáreas (ha) en la región andina (MAGAP, 2009) de las cuales, alrededor de 3.782ha se han establecido como monocultivo y la superficie restante corresponde a la producción de tomate de árbol asociada con otros productos agrícolas como maíz y papa. Esta producción da sustento a unas 7000 familias de pequeños y medianos productores de la serranía y oriente ecuatoriano. El cultivo se desarrolla principalmente en las provincias de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Azuay entre las más importantes (Soria, et al., 2008).

1.4.1.3 Rendimiento agrícola

El cultivo tiene una vida útil de tres años, de los cuales solo dos de ellos son de producción comercial. Durante el primer año de cosecha se obtienen entre 40 y 85 toneladas de fruto por ha y en el segundo año entre 20 a 30 (INIAP, 2008).

1.4.1.4 Condiciones climáticas y suelo

El cultivo se desarrolla adecuadamente en lugares con clima templado a frío, con precipitaciones entre 500 a 2500mm, siendo el nivel óptimo 1500mm y su temperatura media anual entre 14°C y 20°C. Cuando las temperaturas son inferiores a 14°C se producen daños fisiológicos y se retarda el crecimiento. El tomate de árbol crece en altitudes de 600-3300m.s.n.m con fotoperíodos neutros (12 horas luz y 12 horas de oscuridad) humedad relativa de 60-80% y requiere de suelos con textura franco arenosa o arcillosa, buen drenaje, alto contenido de materia orgánica (4%-5%) y un pH entre 5-7 (Soria, et al., 2008).

1.4.1.5 Requerimientos nutricionales del cultivo

El tomate de árbol requiere ser nutrido de manera continua, cada tres meses, sin embargo para suplir las necesidades de la planta es necesario realizar análisis de suelo y foliares como referencia para aplicar los nutrientes adecuados (Tabla 1.1 y 1.2). El desconocimiento de los niveles apropiados de fertilización puede provocar la aparición de síntomas de exceso o deficiencia de macro y microelementos en la especie (INIAP, 2004).

Tabla 1.1 Niveles de fertilización recomendados en base a la interpretación del análisis de suelo. (INIAP, 2004).

| NIVEL | Kg/ha/año* | | | |
|-------|------------|-------------------------------|------------------|--------|
| | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | MgO |
| ALTO | 600-800 | 230-280 | 700-900 | 80-100 |
| MEDIO | 400-600 | 180-230 | 500-700 | 60-80 |
| BAJO | 200-400 | 130-180 | 300-500 | 40-60 |

*En el primer año se requiere aplicar el 50% de los niveles recomendados, fraccionando la dosis en 25% al momento del trasplante y el 25% restante para el mantenimiento del cultivo.

Tabla 1.2 Nutrientes óptimos a nivel foliar del cultivo de tomate de árbol en plantas de 15 meses de edad. (INIAP, 2004).

| ELEMENTO | UNIDAD | RANGO |
|----------|--------|-----------|
| N | % | 3.5-4.3 |
| P | % | 0.2-0.3 |
| K | % | 4.0-5.0 |
| Ca | % | 1.2-2 |
| Mg | % | 0.32-0.42 |
| S | % | 0.25-0.35 |
| Mn | ppm | 100-150 |
| Zn | ppm | 25-32 |
| Cu | ppm | 20-25 |
| B | ppm | 20-30 |
| Fe | ppm | 100-150 |

Macronutrientes:

- ✓ **Nitrógeno:** Elemento absorbido por las plantas en forma de nitrato (NO₃⁻) o amonio (NH₄⁺) fundamental para el crecimiento vegetativo, ya que es un

constituyente de los aminoácidos y clorofila, siendo esta última a la que se atribuye el color verde intenso de las hojas (Pilco Carillo J., 2009).

Su deficiencia se refleja en la disminución del desarrollo de la parte aérea de la planta. Produce clorosis venal amarillo-verdoso pálido, en hojas viejas, expandiéndose desde la nervadura central hacia los bordes que se tornan cloróticos, posteriormente las hojas se necrosan y desprenden con facilidad de la planta. En otros casos se presentan hojas jóvenes verdes, pero pequeñas y arrugadas, bordes torcidos hacia el envés. Un exceso del nutriente se traduce en hojas de color verde azulado, retardo en la maduración y menor resistencia de la planta frente a las plagas comunes (INIAP, 2004).

- ✓ **Fósforo:** Es absorbido por las plantas en forma de ácido fosfórico (HPO_4^-) o diácido fosfórico (H_2PO_4^-) aporta energía durante la síntesis y transporte de carbohidratos en el vegetal, interviene en la división celular, que se refleja en un acelerado desarrollo de las raíces y estimula la formación de las semillas (Pilco Carillo J., 2009).

Su deficiencia reduce el crecimiento de la parte aérea y radicular, produciendo clorosis, es decir color amarillo claro desde los bordes hacia el interior de las hojas bajas. Los pecíolos de las hojas intermedias mueren, hay necrosamiento del tejido desde la base hasta el ápice de la hoja, estas se desprenden del tallo, sin marchitarse totalmente (INIAP, 2004).

- ✓ **Potasio:** Su función principal es el transporte de savia dentro de la planta, interviene activamente en el proceso de división celular, en los procesos de absorción de Ca, N y Na. Su deficiencia provoca hojas bajas gruesas y duras con manchas de 2 a 3mm a manera de quemazones, paralelas a la nervadura central y

secundarias. En otras, se presentan lesiones a manera de costras en los pecíolos de las hojas y sobre la superficie de los tallos (Pilco Carillo J., 2009, INIAP, 2004).

- ✓ **Calcio:** Su deficiencia reduce el desarrollo general de la planta, las hojas se tornan frágiles, quebradizas, el envés y la nervadura central presentan lesiones en forma de cortes longitudinales, existe un enrollamiento de los bordes laterales hacia el haz y se presentan manchas amarillo-blanquecino en la base de las hojas. El sistema radicular deja de emitir nuevos brotes, llegando a morir la planta (INIAP, 2004).

- ✓ **Magnesio:** Su deficiencia produce clorosis intervenal verde-amarillento en hojas bajas, existiendo un enrollamiento de los bordes desde el haz hacia el envés en todas las hojas, estas empiezan a necrosarse desde el ápice hacia el centro y se tornan deformes. Sin embargo el sistema radicular sigue creciendo y emitiendo nuevos brotes (INIAP, 2004).

Micronutrientes:

- ✓ **Manganeso:** Su deficiencia produce clorosis a manera de manchas y una ligera deformación en forma de ondas sobre la superficie de las hojas bajas. El resto de hojas mantienen el color verde intenso. El sistema radicular no presenta alteraciones visibles (INIAP, 2004).

- ✓ **Zinc:** Se retarda el crecimiento en altura de la planta, se acorta la distancia internodal, mientras que en la base del tallo se observa un incremento del diámetro. Hay deformación de las hojas jóvenes, las nervaduras se hacen más gruesas y sobresalientes, presentando clorosis en las hojas intermedias y bajas (INIAP, 2004).

- ✓ **Cobre:** Existe clorosis desde los bordes hacia el centro de las hojas bajas, se observa una coloración café verdosa en las hojas intermedias y las hojas totalmente caídas se doblan hacia el haz (INIAP, 2004).

1.5 Microorganismos rizosféricos

Los microorganismos rizosféricos forman parte primordial de un ecosistema microbiano y de su funcionamiento óptimo, ya que son los protagonistas de diversas acciones benéficas para las plantas, destacando su aporte en la nutrición y protección vegetal (Jaizme y Rodríguez, 2008; Ferrera y Alarcón, 2001). Por esta razón se pretende desde el punto de vista agroecológico dar un uso racional de los recursos naturales renovables, precisando el estudio de hongos micorrícicos arbusculares y bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal.

La interacción entre microorganismos y cultivos, en muchos casos puede ser beneficiosa, dependerá en gran medida de la concentración de los exudados de las plantas. Este sinergismo entre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) mejora la colonización en las plantas. Para ello es necesario elegir una cepa bacteriana que sea capaz de influir en el crecimiento del hongo y a su vez las micorrizas pueden servir como vehículo de infección de las rizobacterias en las raíces (Antoun, H. & Prévost D., 2005).

La fundación IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements) a partir de 1972, estableció que la agricultura sostenible debe intensificarse a través de la biofertilidad de los suelos incrementando el reciclaje de los nutrientes y la actividad microbiana. De esta manera en la década de los 90, los biofertilizantes se convirtieron en un punto común de investigación, teniendo en cuenta los serios problemas

ambientales causados por la aplicación irracional de fertilizantes químicos (IFOAM, 2011).

Bajo este contexto, en la presente investigación, se propone utilizar dos tipos diferentes de biofertilizantes (con microorganismos nativos de tomate de árbol): uno constituido por un consorcio de HMA y otro formado por PGPR *Pseudomonas fluorescens*.

1.5.1 Hongos micorrícicos

La micorriza es la simbiosis entre las raíces de las plantas y hongos específicos del suelo. El nombre se deriva del griego ‘mycos’ que significa hongo y ‘rhyza’ que significa raíz. Se pueden distinguir tres categorías básicas según la estructura de la micorriza formada: **Ectomicorrizas** cuya superficie de las raíces de la planta está cubierta por un manto fúngico (manto externo); **Endomicorrizas**, presentan colonización intracelular del hongo, se subdividen en Ericoides, Orquidoides y Arbusculares. Finalmente **Ectendomicorrizas** poseen características intermedias entre las Ectomicorrizas y Endomicorrizas subdividiéndose en Arbutoides y Monotropoides (Smith & Read, 1997).

Dentro de esta investigación uno de los microorganismos, objetivo de estudio serán las micorrizas arbusculares aplicadas al cultivo de tomate de árbol, que se describen a continuación.

1.5.2 Hongos micorrícicos arbusculares (HMA)

Entre los diferentes tipos de micorrizas, la arbuscular es la de mayor propagación en el reino vegetal, constituye el tipo más común de asociación simbiótica mutualista entre las raíces de las plantas vasculares y hongos específicos del suelo, Phylum Glomeromycota. Esta simbiosis se manifiesta aproximadamente en el 90% de todas las especies vegetales terrestres (Brundrett, 2002).

La micorriza arbuscular está formada por los siguientes componentes: micelio intracelular (en las raíces de las plantas que coloniza) y micelio externo (en el suelo). El micelio intracelular está formado por estructuras fúngicas como los arbuscúlos, que se ramifican dicotómicamente fuera del citoplasma celular y sirven como órganos de transferencia de nutrientes entre la célula vegetal y el huésped. También forman estructuras vesiculares, que son ensanchamientos de las hifas en donde se almacenan lípidos y grasas dentro de las células de las raíces. El micelio extrarradical está formado por una red de hifas que se extienden a través del suelo, son generalmente aseptadas (es decir que no contienen septos) y multinucleadas, además se encuentran esporas individuales o agrupadas formando esporocarpos (Smith & Read, 1997).

1.5.2.1 Desarrollo y colonización

La colonización del hongo micorrícico arbuscular en la raíz de la planta huésped puede darse mediante tres fuentes de inoculación: esporas, fragmentos de raíces infectadas y micelio externo. Este proceso puede iniciar con el desarrollo de hifas de alguna de las fuentes de inoculación mencionadas anteriormente (Smith & Read, 1997).

El desarrollo de la micorriza arbuscular consta de dos fases: presimbiótica y simbiótica, como se indica en la figura adjunta.

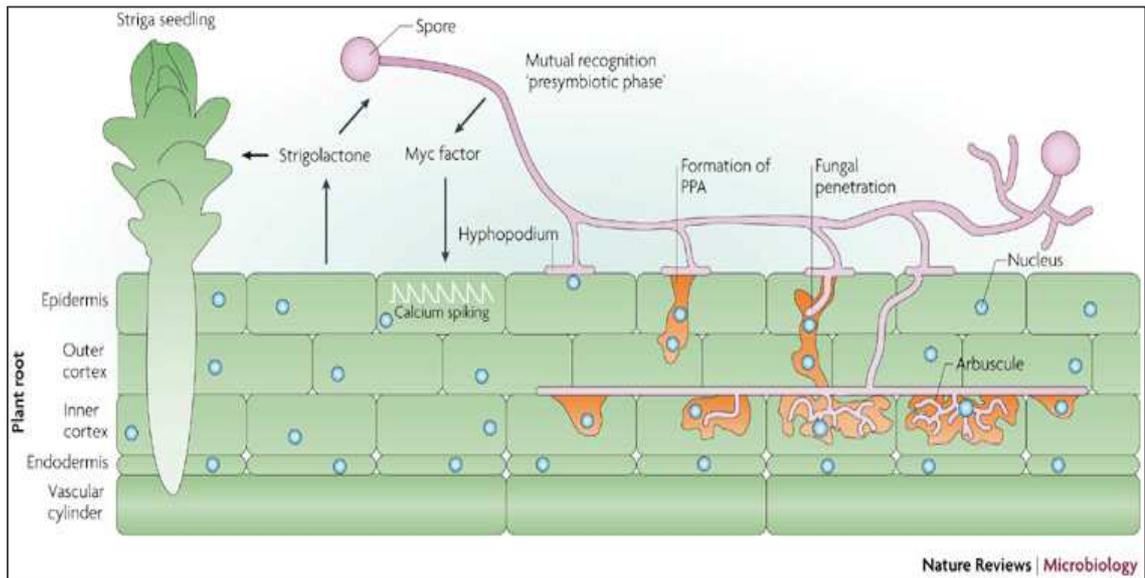


Figura 1.1 Fases de desarrollo de la micorriza arbuscular. Obtenido de Parniske, 2008.

✓ Fase presimbiótica

Una vez que el HMA ha encontrado una raíz susceptible a ser colonizada, es estimulado mediante moléculas de señalización en la rizósfera, que pueden ser fitohormonas como estrigolactonas (exudados radicales) para su continuo crecimiento y ramificación hifal. Las moléculas de señal fúngica que inducen respuestas específicas de simbiosis en las raíces de las plantas, se denominan “factores Myc” de los HMA, cuya producción es estimulada por las estrigolactonas, aunque no se conoce todavía como funciona este mecanismo claramente (Parniske, 2008).

✓ Fase simbiótica

Posterior a la fase presimbiótica, las hifas forman apresorios adyacentes a las paredes de las células epidérmicas de la raíz. Por su parte, y luego de que el apresorio toma contacto con la superficie radical, las células de la planta producen una estructura subcelular conocida como aparato de pre-penetración (PPA) el cual forma un túnel

transcelular que permite el ingreso de las hifas del hongo hacia el córtex, donde se ramifican y forman estructuras denominadas arbusculos, que tienen un tiempo de vida corto aproximadamente de 8.5 días en las células huésped. En este proceso, el hongo no penetra el citoplasma de la célula, debido a que la membrana plasmática desarrolla invaginaciones que rodean al arbusculo, formando la membrana periarbuscular. Esta estructura incrementa el área de contacto entre el hongo y las células corticales permitiendo el intercambio de nutrientes y señales entre la planta y las micorrizas. En el mismo proceso puede producirse un abultamiento de ciertas hifas originando células de reserva de fosfolípidos, conocidas como vesículas cuando se forman en el interior o células auxiliares si están presentes en el exterior de las células radicales (Rivera, R., 2003; Parniske, 2008).

Por su parte los HMA suplementarán a la planta de agua y nutrientes y la especie vegetal le proveerá de carbohidratos, aportando aproximadamente el 20% de los productos fotosintéticos para los simbioses. El hongo crecerá lateralmente a lo largo de la raíz, formando el micelio intracelular y extrarradical, que se extenderá en el suelo creando nuevos puntos de entrada para colonizarla en su totalidad y alcanzar otras raíces a través de puentes hifales. (Parniske, 2008).

1.5.2.2 Mecanismos de acción de los HMA

✓ Absorción de nutrientes

Cuando se ha establecido la simbiosis micorrícica entre el hongo y la planta huésped, la extensión de las hifas extrarradicales de la micorriza a través del suelo, aumentan el volumen y área de absorción, lo que permite a la especie vegetal alcanzar zonas ricas en nutrientes, que en muchos casos no están fácilmente disponibles. Un caso particular es el fósforo (P) que constituye un mineral limitante debido a su baja

solubilidad en estado natural. En ese sentido el HMA crece hacia zonas de agotamiento de P inorgánico y lo toma en forma de iones ortofosfatos (PO_4^{\equiv}) presentes en el suelo, que son transportados a través de las hifas en forma de polifosfatos, y se hidrolizan mediante ciertas fosfatasas alcalinas liberándose hacia la raíz (Aguilera L. et al., 2008; García, S. 2006).

Otro nutriente esencial que puede incorporarse a las plantas con ayuda de los HMA es el nitrógeno (N), ya que a través del micelio extrarradical absorbe del suelo iones de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-). El HMA también es capaz de transferir micronutrientes a la especie vegetal tales como zinc (Zn) y cobre (Cu) mediante su capacidad tamponadora sobre los metales pesados en la planta huésped. Este efecto, se revela en un aumento de suministro de micronutrientes a la planta cuando crece en suelos deficientes de estos (García, S., 2006).

✓ **Resistencia al estrés hídrico y a la salinidad**

Los HMA incrementan la tolerancia de la planta frente a factores ambientales extremos, en condiciones de estrés hídrico evitan la sequía mediante una mayor absorción de agua por medio del micelio extrarradical, aumentando el intercambio gaseoso y la tasa fotosintética, ya que realizan un ajuste osmótico y producen cambios en la elasticidad de la pared celular (Quilambo, O., 2003).

✓ **Protección frente a patógenos**

Entre los diferentes mecanismos para la protección de las plantas frente a patógenos radicales está el mejoramiento del estado nutricional de las plantas micorrizadas, que a la vez las hace más resistentes al ataque de fitopatógenos. Los tejidos de las raíces son más lignificados y de mayor tamaño, características que impiden la

invasión de microorganismos. Los hongos pueden inducir la activación de resistencia en las plantas mediante la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos que son liberados con mayor rapidez al momento de la agresión microbiana (Kothamasi, D., et al., 2001).

1.5.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Kloepper en 1994, define a las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) en base a tres características: “1) capacidad para colonizar la raíz, 2) sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados a la superficie radical en competencia con la microbiota nativa, al menos con tiempo para expresar su actividad promotora de crecimiento y 3) poseer capacidad para promover dicho desarrollo” (Jaizme y Rodríguez, 2008).

Estos microorganismos del suelo son capaces de producir efectos beneficiosos en estadios tempranos de las especies vegetales, mejorando el desarrollo de la biomasa de las raíces y brotes de la plantas, aumentando la germinación de plántulas, vigor, altura, contenido de nutrientes, presencia de clorofila, acelerando el tiempo de floración y brindando protección frente a fitopatógenos radicales. Entre los géneros bacterianos que han sido descritos como PGPR se encuentran *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Saharan, B.S. & Nehra, V., 2011).

1.5.4 *Pseudomonas* sp.

Estas bacterias pertenecen al Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae y Género: *Pseudomonas*. Sus

especies pueden dividirse en dos grandes grupos: fluorescentes y no fluorescentes. Dentro de la primera clasificación podemos encontrar a *P. fluorescens*, *P. flavences*, *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. lundensi*, *P. monteilii*, *P. rhodeciae*, *P. veronni*, *P. syringae* y *P. cichorri*. (Palleroni, N. J. 2005; Goldman, E. & Green, L.H., 2008). En este trabajo se estudiará el efecto de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* sobre el cultivo de tomate de árbol, que se detalla a continuación.

1.5.5 *Pseudomonas fluorescens*

Dentro de los microorganismos rizosféricos promotores del crecimiento vegetal se encuentran *Pseudomonas fluorescens* que son bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, cuyas dimensiones están entre 0.5-1.0 x 1.5-5µm, presentan movilidad gracias a que poseen varios flagelos polares, no producen esporas, tienen un metabolismo energético estrictamente aerobio y una nutrición quimiorganótrofa que no requiere factores de crecimiento. Sintetizan gránulos de polihidroxiálcanoatos que sirven de reserva de material celular. Producen pioverdina, que es un pigmento soluble en agua, presenta fluorescencia bajo luz ultravioleta, su producción es estimulada cuando el hierro es limitante en el medio, lo que ayuda a sintetizar sideróforos (Palleroni, N. J., 2005).

Las condiciones para su crecimiento óptimo son una temperatura entre 25 y 30°C y pH neutro. Su hábitat generalmente es el suelo y agua, sin embargo pueden estar asociados con alimentos putrefactos (carnes curadas, pescado, leche y huevos) (Palleroni, N. J., 2005).

1.5.5.1 Colonización

Se sabe que *Pseudomonas fluorescens* se adapta fácilmente al suelo para sobrevivir y colonizar el sistema radicular de las plantas. Este mecanismo inicia con el movimiento flagelar, a mayor motilidad habrá mejor colonización y el grado de infección dependerá de la especie vegetal a la que se asocia y de las condiciones de crecimiento (Bowers and Parkea, 1993). A la vez se presume que la movilidad de los flagelos en la rizósfera es influenciada por los exudados radicales (iones, oxígeno libre, agua, enzimas, aminoácidos, mucílago, compuestos fenólicos, entre otros) esta interacción conocida como quimiotaxis permitirá a las bacterias adherirse a la superficie radical, formar microcolonias o biofilms discontinuos entre los surcos de las células de la epidermis. Por otra parte ciertas cepas tienen la capacidad de colonizar endofíticamente, es decir desplazarse entre los espacios intercelulares de las células epidérmicas y de la corteza (Bais, H., et al., 2006; Couillerot, O. et al., 2008).

1.5.5.2 Mecanismos de acción de *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens se destacan por su alta frecuencia de aparición en la rizósfera de las plantas y entre sus mecanismos de acción se encuentran:

✓ Inducción de resistencia sistémica (IRS)

Pueden inducir diferentes mecanismos en las plantas como:

- Inducción de genes de defensa en las plantas colonizadas.
- Acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR-1, PR-2, PR-3) y compuestos fenólicos que contiene grupos o-hydroxi.
- Producción de fitoalexinas.
- Incremento de la actividad peroxidasa, lisozima, fenilalanina ammonio liasa (PAL) y ácido salicílico.

- La presencia de lipopolisacáridos en las paredes de las células bacterianas que actúan como elicitores e inducen la resistencia frente a ciertas enfermedades (Vidhyasekaran, P., 2004).

✓ **Producción de reguladores de crecimiento vegetal**

P. fluorescens tiene la capacidad de sintetizar o cambiar la concentración de ciertas sustancias promotoras del crecimiento vegetal, tales como ácido indolacético (AIA), ácido giberélico, citoquininas y etileno que pueden facilitar la absorción de nutrientes presentes en la solución del suelo (Vidhyasekaran, P., 2004).

✓ **Control biológico**

La promoción indirecta del crecimiento de las plantas ocurre cuando las PGPR previenen efectos nocivos de uno o más microorganismos fitopatógenos. Este proceso puede darse por antibiosis, en base a la producción de metabolitos de naturaleza antibiótica como pioluteorina, pirrolnitrina, 2,4 diacetil-floroglucinol, ácido fenazina-carboxílico y ácido antranílico que son efectivos contra patógenos del suelo. Además la producción de ácido cianhídrico muestra una importante actividad de biocontrol (Vidhyasekaran, P., 2004).

Las *Pseudomonas* en condiciones limitadas de hierro en el medio, tienen la capacidad de producir sideróforos (pigmentos extracelulares) que secuestran al metal formando un complejo que se adhiere a la membrana plasmática mediante receptores proteicos específicos. Posteriormente atravesará la misma por un sistema de transportadores activos, y cuando se encuentre en el citoplasma bacteriano mediante hidrólisis el Fe^{3+} será liberado e incorporado en su metabolismo, quedando restringido

para el crecimiento de microorganismos patógenos en la rizósfera que no posean mecanismos efectivos para la adquisición de hierro (Hernández, Annia., et al., 2006).

✓ **Capacidad de solubilizar fósforo**

El P constituye el segundo elemento esencial para las plantas, sin embargo éste es limitante ya que en la mayoría de los suelos ácidos se encuentra formando complejos insolubles como fosfato de aluminio, hierro o manganeso y en los suelos básicos como fosfato de magnesio y calcio (Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D., 2010). De aquí la importancia de las *Pseudomonas* porque son capaces de solubilizar tanto fosfato orgánico como inorgánico, siendo estos mineralizados por enzimas fosfatasas y acción de ácidos orgánicos sintetizados en la solución del suelo. El mecanismo de solubilización de fosfatos por *Pseudomonas fluorescens* es la producción de ácidos orgánicos como el ácido acético, oxálico y succínico que al tener carga negativa forman complejos metálicos, liberando los aniones fosfatos en el suelo que serán fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas (Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D., 2010).

1.5.6 Bacterias que ayudan a la micorrización (MHB)

Entre los habitantes microscópicos del suelo, los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) junto con las bacterias fijadoras de nitrógeno y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, están los microorganismos rizosféricos claves para garantizar la sostenibilidad del sistema suelo-planta. De las evidencias encontradas sobre las bacterias que ayudan a la micorrización MHB (mycorrhization helper bacteria) se ha descrito que alrededor del 80% de las *Pseudomonas* fluorescentes, juegan un efecto positivo significativo en el establecimiento de las micorrizas, mientras que el 20% tienen un efecto neutral o inhibitorio (Garbaye J, 2007).

1.5.6.1 Posible mecanismo que utiliza *P. fluorescens* como MHB

Las *Pseudomonas* sp., podrían degradar las paredes celulares y la laminilla media entre las células de la corteza de la raíz produciendo enzimas específicas (como endoglucanasa, celobiosa hidrolasa, peptato liasa y xilanasa) que faciliten la penetración del hongo micorrícico arbuscular para establecer la simbiosis, Figura 1.2 (Garbaye J, 2007).

Se ha descrito que ciertas *Pseudomonas* fluorescentes tienen la capacidad de promover la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo y la ramificación de los HMA. En este proceso se produce una modificación de la arquitectura y fisiología de las raíces bajo la influencia de una gran cantidad de exudados radicales que intensifican consecuentemente la diversidad y actividad de la flora bacteriana dentro de la micorrizósfera (Varma, A., 2008).

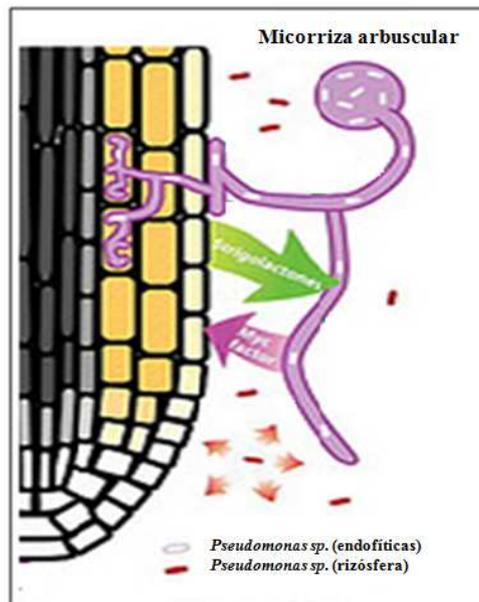


Figura 1.2 Interacción entre HMA, bacterias (*Pseudomonas* sp.) y raíces de las plantas. Modificado de Bonfante, P. & Anca L., 2009.

1.6 Sistema de hipótesis

Las interacciones entre los hongos micorrícicos arbusculares y las rizobacterias *Pseudomonas fluorescens* mejoran la nutrición (absorción de macro y microelementos) y desarrollo de las plantas de tomate de árbol (tamaño, crecimiento foliar, biomasa aérea y radical).

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación se realizó con la colaboración de la Directora y Codirectora asignadas para dirigir la tesis, Dra. María Emilia Medina y B.Sc. Karina Ponce, respectivamente. Además por el personal de la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

La tesis fue financiada por el Vicerrectorado de Investigación y Vinculación con la Colectividad de la Escuela Politécnica del Ejército, a través del Programa de Investigación Científica Proyectos 2010, con prórroga 2011.

2.2 Zona de estudio

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE) localizado en el Valle de los Chillos de Sangolquí a una latitud: S 0° 20' / S 0° 10' y Longitud: W 78° 30' / W 78° 15' a 2280 msnm (IGM).

Los muestreos se realizaron en suelos de cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en diferentes zonas del país, que se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Información geográfica y características de la rizósfera de los cultivos muestreados para el aislamiento e identificación de los microorganismos rizosféricos: HMA y *P. fluorescens*.

| PROVINCIA | CANTÓN | SECTOR | COORDENADAS GEOGRÁFICAS | EDAD DEL CULTIVO | RIZÓSFERA | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------------------|------------------|---|--------------|-----|-----------|
| | | | | | Tipo de abono | T prom. (°C) | pH | % Humedad |
| Cotopaxi | Salcedo | Panzaleo | Este = 767440 | 10 meses | Orgánico: estiércol de ganado vacuno | 18 | 7.0 | 17.4 |
| | | | Norte = 9881936 | | | | | |
| | | | Cota = 2683m | | | | | |
| Cotopaxi | San Jorge | Cunchibamba | Este = 768121 | 7 meses | Orgánico: estiércol de ganado vacuno, ovino y cuy | 17 | 7.6 | 35.8 |
| | | | Norte = 9874871 | | | | | |
| | | | Cota = 2674 m | | | | | |
| Tungurahua | Ambato | El Rosal | Este = 765283 | 12 meses | Orgánico; estiércol de ganado vacuno | 17.2 | 7.2 | 25.8 |
| | | | Norte = 9863612 | | | | | |
| | | | Cota = 2500m | | | | | |
| Pichincha | El Quinche | Cusubamba | Este = 802393 | 18 meses | Químico-orgánico | 14.5 | 5.5 | 22.7 |
| | | | Norte = 9995184 | | | | | |
| | | | Cota = 2600m | | | | | |
| Tungurahua | Vía Píllaro | San Jorge | Este = 764731 | 18 meses | Químico-orgánico | 16.7 | 6.7 | 28.7 |
| | | | Norte = 9863965 | | | | | |
| | | | Cota = 2525m | | | | | |

2.3 Período de tiempo de investigación

La investigación se realizó en un período de dieciocho meses, iniciándose el trabajo en el mes de julio del 2010 y finalizándose en el mes de diciembre del 2011.

2.4 Diseño

En el presente trabajo de investigación se estableció un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial de 2×7 , cuyos factores a evaluar fueron:

- Factor 1: dosis de inóculo de micorrizas, en dos niveles:
M0: Control 0g de inóculo (0 esporas de HMA)
M1: 180g de inóculo (655 esporas de HMA)

- Factor 2: dosis de inóculo de *Pseudomonas fluorescens*, en tres niveles:
B0: Control sin inóculo bacteriano (0 UFC/ml)
B1.1: Cepa 1 en una concentración recomendada (1.5×10^8 UFC/ml)
B1.2: Cepa 1 en una concentración alta (6.0×10^8 UFC/ml)
B2.1: Cepa 2 en una concentración recomendada (1.5×10^8 UFC/ml)
B2.2: Cepa 2 en una concentración alta (6.0×10^8 UFC/ml)
B3.1: Cepa 3 en una concentración recomendada (1.5×10^8 UFC/ml)
B3.2: Cepa 3 en una concentración alta (6.0×10^8 UFC/ml)

La interacción entre cada uno de los factores dio lugar a catorce tratamientos, con diez repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una planta de tomate de árbol y en total, el diseño experimental se realizó con 140 plantas (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Tratamientos aplicados en las plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

| No. | TRATAMIENTOS |
|-----|--|
| 1 | 0 esporas de HMA × 0 UFC/ml de <i>P. fluorescens</i> |
| 2 | 0 esporas de HMA × 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 1 de <i>P. fluorescens</i> |
| 3 | 0 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 1 de <i>P. fluorescens</i> |
| 4 | 0 esporas de HMA × 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 2 de <i>P. fluorescens</i> |
| 5 | 0 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 2 de <i>P. fluorescens</i> |
| 6 | 0 esporas de HMA x 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 3 de <i>P. fluorescens</i> |
| 7 | 0 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 3 de <i>P. fluorescens</i> |
| 8 | 655 esporas de HMA × 0 UFC/ml de <i>P. fluorescens</i> |
| 9 | 655 esporas de HMA × 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 1 de <i>P. fluorescens</i> |
| 10 | 655 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 1 de <i>P. fluorescens</i> |
| 11 | 655 esporas de HMA × 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 2 de <i>P. fluorescens</i> |
| 12 | 655 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 2 de <i>P. fluorescens</i> |
| 13 | 655 esporas de HMA x 1.5x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 3 de <i>P. fluorescens</i> |
| 14 | 655 esporas de HMA × 6.0 x10 ⁸ UFC/ml de la Cepa 3 de <i>P. fluorescens</i> |

Las variables evaluadas en las plantas fueron: altura, diámetro del tallo, área foliar, biomasa aérea y radical, absorción foliar de macro y microelementos. Se evaluó el contenido de nutrientes del sustrato utilizado en todos los tratamientos del diseño experimental.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Selección y recolección de muestras de rizósfera

Se seleccionaron cultivos semiorgánicos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en diferentes zonas del país, tanto para el aislamiento de HMA como para *Pseudomonas fluorescens*.

El muestreo se realizó en forma de zig-zag, alrededor de las raíces de la planta, a una profundidad de 15 a 20cm. Posteriormente se procedió a recoger 500g de suelo con raíces adheridas en diez puntos del terreno, las cuales fueron agrupadas en cinco muestras (cada muestra contenía dos puntos del terreno) que fueron homogenizadas y procesadas en el laboratorio de Microbiología de Suelos, CEINCI-ESPE.



Figura 2.1. Recolección de muestras de suelo del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en diferentes zonas del país.

2.5.2 Procesamiento de muestras para el aislamiento e identificación de HMA

Para el procesamiento de las muestras se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdeman y Nicholson, 1963, modificada por Herrera *et al.*, 2004.

Inicialmente las muestras de suelo recolectado se dejaron secar al ambiente, posteriormente se pesaron 100g de cada una y se colocaron en un tamiz (con poros de 2mm). El tamizado se colocó en un vaso de precipitación con una solución de peróxido de hidrógeno al 1%, durante una hora, para ser desagregado químicamente. A continuación, se hizo pasar por tres tamices ubicados en orden descendente, con poros de 500 μ m, 150 μ m y 45 μ m de diámetro respectivamente.

Se generaron 3 fracciones, una de cada tamiz y se enjuagó el suelo para eliminar el peróxido. La primera fracción (A) $>500\mu\text{m}$ se secó mediante una bomba de vacío. Posteriormente se realizó una desagregación física de la segunda fracción (B) $>150\mu\text{m}$ en licuadora a revolución alta durante 30 segundos y la mezcla se colocó atravesando los dos tamices restantes. Se desagregó la tercera fracción (C) $> 45\mu\text{m}$ en la licuadora a revolución media durante 1 minuto y la mezcla se colocó atravesando el último tamiz. Finalmente la segunda y tercera fracción se secaron mediante una bomba de vacío.

2.5.3 Conteo de esporas de HMA

Se tomó una alícuota del 5% del peso de la fracción C y otra correspondiente al 10% del peso de la fracción B, las cuales fueron conservadas en refrigeración luego del procesamiento del suelo, anteriormente explicado. Estas alícuotas se colocaron en tubos Falcon de 50ml, se centrifugaron en un gradiente diferencial de sacarosa al 45% a 2500rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue tamizado y se recogió la muestra en cajas Petri cuadrículadas para realizar el conteo de las esporas en el estereoscopio (OLYMPUS).

Finalmente se calculó el número total de esporas por 100g de suelo, multiplicando el número de esporas encontradas en la fracción B por un factor 10 más el número de esporas de la fracción C por un factor de 20.

2.5.4 Porcentaje de colonización de HMA

Para determinar la capacidad infectiva de los inóculos de HMA, se realizó la tinción de raíces de las muestras de tomate de árbol de acuerdo a la técnica estandarizada por Phillips & Hayman, 1970.

Las raíces almacenadas en fundas de papel kraft se lavaron y cortaron en pedazos de aproximadamente 1cm de largo y se colocaron en los cassetes de tinción. Se precalentó agua en un vaso de precipitación hasta que alcanzó 90°C y se colocaron los cassetes con raíces sumergidas en una solución de KOH al 10% a manera de baño maría, durante 20 minutos. Trascurrido este tiempo se eliminó la solución básica y se añadió peróxido de hidrógeno al 2%, dejándolo a exposición de calor por un período de 10 minutos, posteriormente se lavaron las raíces. Luego se colocaron las raíces en una solución de HCl al 1% durante 15 minutos, sin realizar un lavado de raíces, se eliminó el ácido, se añadió azul de tripano al 0.05% en lacto glicerol y se sometió al calor durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de tinción se dejaron las raíces en lactoglicerol 1:1 durante 24 horas para retirar el exceso de colorante.

Una vez teñidas las raíces, se colocaron los segmentos en portaobjetos, se cubrieron y analizaron en microscopio (OLYMPUS) con 100X de aumento. Se evaluó la presencia de estructuras micorrícicas (hifas, arbusculos, vesículas) en cada campo observado y luego se estimó el porcentaje de colonización mediante la siguiente ecuación:

$$\%colonización = \frac{NSC}{NTSO} \times 100$$

Donde:

NSC = Número de segmentos colonizados

NTSO = Número total de segmentos observados

2.5.5 Propagación de esporas de HMA

Se seleccionó el sitio de muestreo con mayor número de esporas, para la posterior multiplicación del inóculo de HMA en plantas de avena (*Avena sativa*) como cultivos trampa, para lo cual se mezclaron 40% del suelo con HMA, 20% tierra negra estéril, 20% arena estéril y acidificada y 20% de turba. Estos sustratos fueron distribuidos en 42

macetas con 2g de semillas previamente desinfectadas en cada una. Los cultivos fueron mantenidos durante tres meses para su propagación.



Figura 2.2 Mantenimiento de los cultivos trampa de avena para la propagación de esporas de HMA.

2.5.6 Procesamiento de muestras para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*

Se estandarizó la técnica para aislar e identificar las rizobacterias en estudio. Inicialmente las muestras recolectadas atravesaron un tamiz de 2mm de poro, a fin de separar las raíces adheridas de la rizósfera. Se realizaron dos procesamientos: el primero de raíces y el segundo de la rizósfera del cultivo de tomate de árbol. Para el primer procesamiento, se realizó un lavado superficial de las raíces con agua destilada estéril, posteriormente se pesaron 10g y se colocaron en un frasco con 90ml de agua peptona al 0.1% estéril. Para el segundo procesamiento se pesaron 10g de rizósfera y se colocaron en un frasco con 90ml de agua peptona al 0.1% estéril, ambas muestras se colocaron en agitación mecánica entre 15-20min.

A continuación, con ayuda de una pipeta automática y puntas estériles se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución de 10^{-5} . De cada una de las diluciones se tomaron 100µl de inóculo para sembrarlo por duplicado en superficie con un asa de digralski sobre cajas Petri que contenían el medio de cultivo *Pseudomonas Isolation Agar* (Difco). Y se incubaron a 28°C durante 24h.

2.5.7 Cálculo de las densidades poblacionales de *Pseudomonas* sp. en las zonas muestreadas

A las 24 horas de incubación, se procedió a contar el número de colonias por caja para obtener una referencia de la densidad poblacional de posibles *Pseudomonas* sp. (UFC/g) tanto del procesamiento de raíces como de la rizósfera. Para ello se aplicó la fórmula de Frioni, 2006:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{gss}} = \frac{\text{UFC}}{\text{gsf}} * h \quad h = \frac{100+H\%}{100}$$

Donde:

UFC = unidades formadoras de colonias

gss = gramos de suelo seco

gsf = gramos de suelo fresco

h = factor de corrección de humedad

H% = Porcentaje de humedad

2.5.8 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*

Se aislaron colonias de posibles *Pseudomonas* sp desde el medio de cultivo *Pseudomonas Isolation Agar* (Difco) y se inocularon por duplicado en cajas Petri con medio *Agar Pseudomonas F* (Himedia). Se observó uno de cada duplicado de los cultivos bacterianos bajo una lámpara de luz UV (254nm) y se seleccionaron aquellas que presentaron fluorescencia. El otro duplicado se purificó en agar TSA (*Trypticase Soy Agar*) a fin de realizar la tinción Gram y una serie de pruebas bioquímicas según el

Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 2005, para identificar posibles ejemplares de la especie en estudio *P. fluorescens*:

Prueba para confirmar la no fermentación de azúcares

- **Agar-hierro-triple azúcar (TSI):** Medio universalmente empleado para la seleccionar enterobacterias de aquellas bacterias que no lo son (entre estos géneros se encuentran *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, etc.). Esta selección se realiza en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y producción de ácido sulfhídrico (Mac Faddin, J, 2003).

Pruebas positivas para la especie

- **Oxidasa:** Es una enzima que cataliza una reacción de óxido /reducción empleando oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones, en este proceso se oxida el citocromo C, que a la vez es reducido por el O₂ que produce agua o peróxido de hidrógeno en la parte final de la cadena de transporte de electrones, según la especie bacteriana. Se presentan en los organismos aerobios (*Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros) (Mac Faddin, J, 2003).
- **Catalasa:** La producción de esta enzima va ligada a la oxidasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno, que es el producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. Se presenta en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo (Mac Faddin, J, 2003).
- **Licuefacción de la gelatina:** Esta prueba determina la capacidad de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de gelatinasas (Mac Faddin, J, 2003).

- **Crecimiento a 4°C:** Se utiliza para demostrar que las *Pseudomonas fluorescens* poseen un rango de temperatura extremo para su crecimiento, entre 4 y 41°C, por lo tanto hay multiplicación bacteriana en este rango, aunque con dificultad.
- **Asimilación del sustrato L-Arginina:** La utilización de este compuesto se da por la acción de arginina dehidrolasa que produce L-citrulina y amoníaco. La citrulina es descompuesta a continuación en ornitina, y ésta, a su vez por una decarboxilasa, convertida en putresceína y CO₂. Este sistema catabólico se da en las *Pseudomonas* fluorescentes, pero es inhibido bajo condiciones aerobias (Mac Faddin, J, 2003).

Pruebas negativas para la especie

- **Crecimiento a 42°C:** Se utiliza esta prueba para demostrar que *P.fluorescens* no posee la capacidad de crecer a dicha temperatura, debido a que está fuera del rango para su desarrollo (4-41°C).
- **Asimilación del sustrato Acetamida:** Se utiliza para diferenciar bacterias Gram negativas no fermentativas, en especial *P.aeruginosa* que tienen la capacidad de desaminar la acetamida que produce amoníaco, aumenta el pH cambiando el medio de cultivo de color amarillo naranja a rojo violáceo (Forbes B., et. al, 2004)

Prueba de reacción variable para la especie

- **Reducción de nitratos:** Mediante esta prueba se detecta una respiración anaerobia: la que utiliza nitrato como aceptor final de electrones. Los nitratos se reducen a nitritos y algunas bacterias reducen los nitritos a productos gaseosos (N₂ y N₂O). Las enzimas responsables de ambas reducciones se denominan nitrato y nitrito reductasa, respectivamente (Mac Faddin, J, 2003).

Adicionalmente se utilizó un kit de pruebas API 20 NE (BIOMERIEUX), que es un sistema de identificación de bacilos Gram negativos (no enterobacterias) que contienen 20 microtubos con sustratos deshidratados, para confirmar las rizobacterias en estudio.

2.5.9 Selección de tres cepas de *Pseudomonas fluorescens* para su aplicación en el ensayo

De los aislados identificados como *Pseudomonas fluorescens*, se seleccionaron tres cepas según su capacidad de solubilizar fosfato inorgánico (fosfato tricálcico), mediante una prueba cualitativa según el protocolo de Arvind G., *et al.*, 2007.

Con ayuda de un palillo de dientes estéril se tomó una colonia del medio TSA (Becton, Dickinson & Co.) y se realizó una punción en el centro de la caja Petri que contenía el medio de cultivo Agar Pikovskaya (Difco) y se realizaron tres repeticiones por cada cepa bacteriana. Posteriormente se incubaron a 28°C durante siete días, se tomaron los datos del diámetro de la colonia y la zona del halo al tercero, quinto y séptimo día para determinar el índice de solubilización de P, para lo cual se aplicó la fórmula de Edi-Premono *et al.*, 1996, que se describe a continuación:

Donde:
$$IS = \frac{Dc + Dh}{Dc}$$

Dc: diámetro de la colonia

Dh: diámetro de la zona del halo

2.5.10 Preparación y esterilización del sustrato

Para la preparación de los sustratos se calculó el porcentaje que tendrían las macetas (peso final 600g c/u) para los tratamientos del ensayo, quedando definidos de la siguiente forma:

- Sustrato con inóculo de micorrizas: 10% de tierra negra, 20% de turba, 40% de pomina y 30% de inóculo de HMA.
- Sustrato sin inóculo de micorrizas: 40% de tierra negra, 40% de pomina y 20% de turba.

En un autoclave (All america) se esterilizó por separado la tierra negra y pomina en saquillos de tela a 121°C y 15 lb de presión durante 2 horas, posteriormente se secaron en una estufa (Ecuatherm) a 90°C. Se utilizó turba PRO-MIX “PGX” (esterilizado de fábrica). Una vez que los sustratos estuvieron secos, se realizaron las mezclas correspondientes en proporción peso: peso.

2.5.11 Desarrollo del inóculo bacteriano

Para desarrollar el inóculo se sembraron las bacterias en caldo Infusión Cerebro Corazón (Himedia) a partir de cultivos puros y se incubaron a 28°C con agitación mecánica por 24h. Transcurrido este tiempo se prepararon las siguientes dosis: 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml de las tres cepas en estudio. Para cada dosis se colocaron 2ml y 4ml de la suspensión bacteriana respectivamente, disolviéndose en 220ml de solución salina 0.85% cada una. Posteriormente se midieron en el espectrofotómetro (JENWAY) a una longitud de onda de 546nm y las absorbancias resultantes se compararon con la escala Mc Farland respectivamente. Para ambas dosis se ajustaron los volúmenes a fin de obtener una

densidad óptica igual en todos los tratamientos según el diseño experimental establecido. En cada planta de tomate de árbol se inoculó un volumen de 20ml del preparado.

2.5.12 Aplicación de inóculos de HMA y *Pseudomonas fluorescens* en las plántulas de tomate de árbol.

En primera instancia, se aplicó un inóculo con 655 esporas de HMA nativas en 180g de suelo en plantas de tomate de árbol de 15 días de edad, según el diseño experimental planteado para la presente investigación. Después de 30 días a partir de la inoculación, se realizó la aplicación de 20ml de inóculo por planta, de las tres cepas de *Pseudomonas fluorescens* seleccionadas previamente por su capacidad de solubilizar fosfato, en dos concentraciones: 1.5×10^8 UFC/ml y 6.0×10^8 UFC/ml.

2.5.13 Mantenimiento del ensayo

Las plantas se mantuvieron durante cuatro meses en una estantería de policarbonato de tres niveles con puertas corredizas de malla plástica. Durante el primer mes se regó con una solución nutritiva de Hewitt aproximadamente 20ml en cada maceta (Anexo A) y los siguientes meses se regaron con agua destilada, de acuerdo a los requerimientos de las plantas.

2.5.14 Evaluación de las plantas al final del ensayo

Durante los cuatro meses de ensayo, mensualmente se midieron: altura, perímetro y área foliar. Al finalizar el ensayo se evaluó la biomasa aérea y radicular de las plantas. Los parámetros mencionados se describen a continuación:

- ✓ Altura: se midió desde la base del tallo hasta el nudo de la hoja nueva.
- ✓ Perímetro del tallo: se midió el contorno del tallo.
- ✓ Área foliar: se midió utilizando una malla de puntos de 1cm x 1cm.
- ✓ Biomasa aérea: se pesó en una balanza electrónica (Ohaus) la parte aérea de la planta (desde la base del tallo hasta el ápice).
- ✓ Biomasa radical: se pesó en una balanza electrónica la parte radicular de la planta.
- ✓ Absorción de macro y microelementos: el análisis en suelo y hojas se realizó en los Laboratorios de Agrobiolab Cía Ltda.

Para la evaluación del inóculo de HMA se realizaron las siguientes estimaciones:

- ✓ Número de esporas de HMA en el sustrato de cada planta

Se realizó el conteo de la población de esporas de HMA de cada tratamiento por triplicado mediante la técnica descrita anteriormente.

- ✓ Porcentaje de colonización de HMA

Para determinar la capacidad infectiva del inóculo colocado en las plantas de tomate de árbol, se realizó la tinción de raíces de acuerdo a la técnica estandarizada por Phillips & Hayman, 1970, obteniendo tres ejemplares por tratamiento.

Para la evaluación del inóculo de *Pseudomonas fluorescens* se realizaron las siguientes estimaciones:

- ✓ Conteo de UFC por gramo de raíces y suelo

Esta cuantificación se realizó según se describe en el procedimiento 2.5.6 y 2.5.7.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

A partir del muestreo realizado en las Provincias de Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua, los resultados obtenidos de la población de esporas de HMA se muestran en la Figura 3.1, los cuales presentan una baja población de esporas, debido a que se trata de suelos de uso agrícola, donde el uso extensivo de plaguicidas ha deteriorado la calidad del suelo disminuyendo drásticamente la población microbiana nativa. Para preparar el inóculo de micorrizas se utilizó el suelo proveniente de Panzaleo (Cotopaxi) con mayor número de esporas 0,87 esporas/g, ya que los suelos de Cusubamba (Pichincha) y San Jorge (Tungurahua) contenían una menor población de 0,49 y 0,35 esporas/g respectivamente.

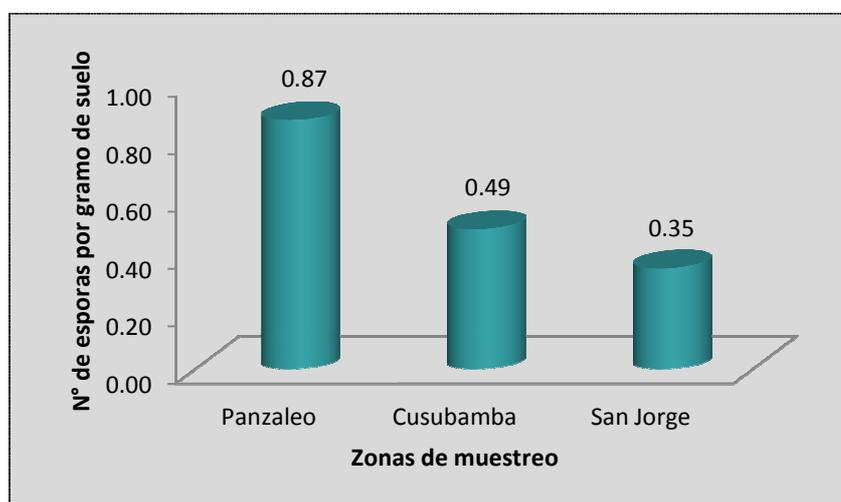


Figura 3.1. Densidad de esporas de HMA por gramo de suelo presente en las muestras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

El inóculo de Panzaleo se mezcló con el sustrato descrito en el Capítulo 2 (ver Materiales y Métodos, sección 2.5.5) utilizando como especies vegetales trampa, plantas de avena (*Avena sativa*) para su propagación durante tres meses. Transcurrido este tiempo se analizó la población micorrícica dando como resultado un inóculo con 3,64 esporas/g de suelo y con un porcentaje de colonización del 48%. En la Figura 3.2 se muestran las raíces de avena teñidas con azul de tripano, provenientes de las macetas de propagación donde se observan estructuras fúngicas de los HMA.

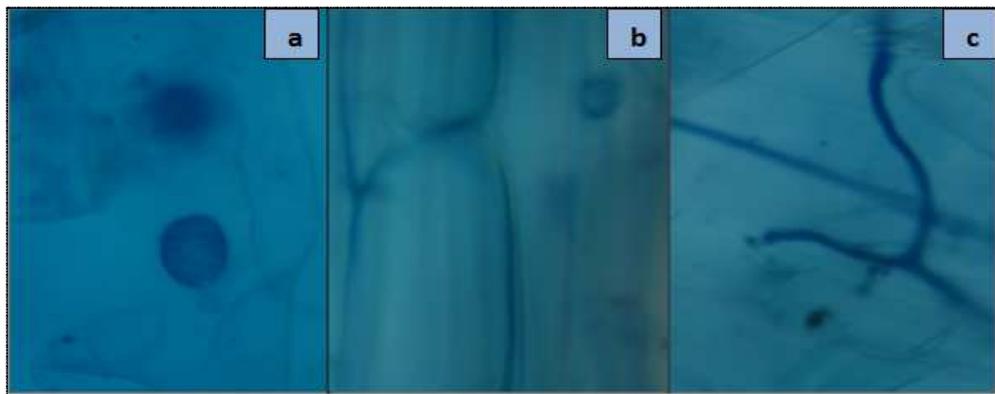


Figura 3.2 Estructuras fúngicas en raíces de avena (*Avena sativa*) procedentes de las macetas de propagación, teñidas con azul de tripano. **a.** espora **b.** vesícula **c.** hifa

3.2 Densidad poblacional de *Pseudomonas* sp. en las zonas muestreadas con cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Para realizar la identificación y el aislamiento de las rizobacterias *Pseudomonas fluorescens*, se efectuó un muestreo en cinco zonas del país con cultivos de tomate de árbol, las que presentaron una densidad bacteriana variable entre 10^4 y 10^5 UFC/g de raíces y suelo seco (Figura 3.3 y 3.4).

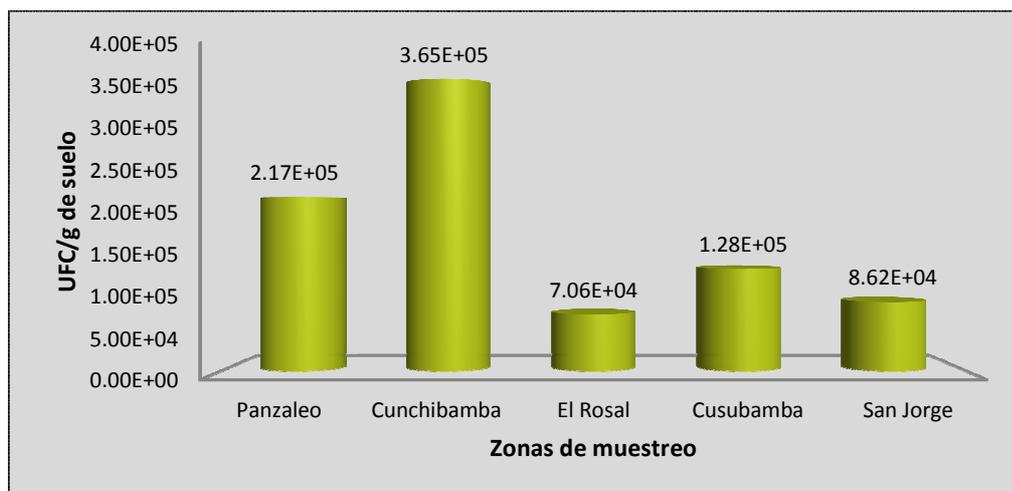


Figura 3.3 Densidad bacteriana de *Pseudomonas* sp. por gramo de suelo (UFC/g suelo) en las muestras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

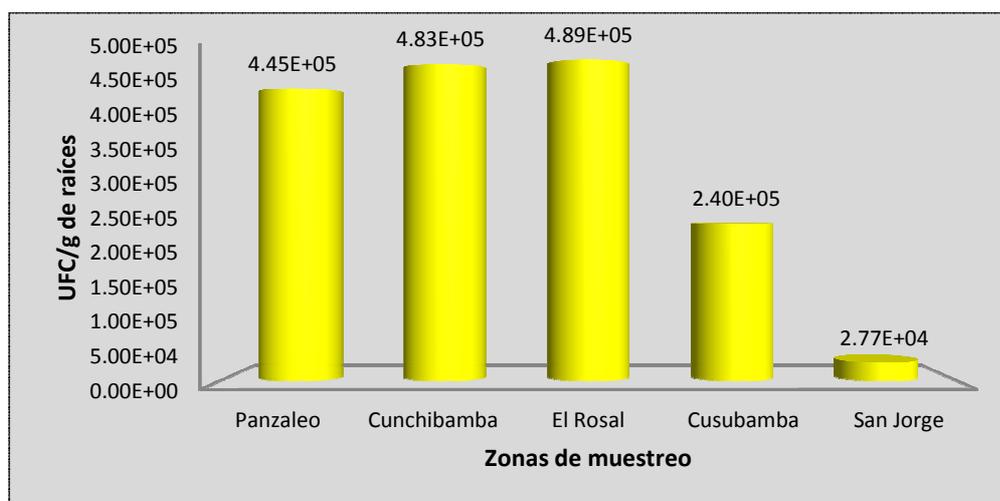


Figura 3.4 Densidad bacteriana de *Pseudomonas* sp. por gramo de raíces (UFC/g raíces) en las muestras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

La mayor densidad bacteriana de *Pseudomonas* sp. se encontró en raíces de las zonas muestreadas en Panzaleo, Cunchibamba, El Rosal y Cusubamba en comparación con las poblaciones de bacterias aisladas de rizósfera. Sin embargo se obtuvieron

resultados contrarios en la zona de San Jorge (Provincia de Tungurahua) donde la densidad bacteriana fue mayor en la rizósfera que en las raíces del cultivo de tomate de árbol (Figura 3.3 y 3.4).

3.3 Aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Morfología de *P. fluorescens*

Se observaron células bacterianas Gram negativas y con forma de bacilos ligeramente curvados mediante la técnica de Tinción Gram, característica del género *Pseudomonas* sp según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (2005).

Se aislaron colonias con la siguiente morfología:

- a) Grandes, circulares, convexas, de color crema con centro mucoso y halo amarillo verdoso
- b) Medianas, circulares, planas, translucidas y halo amarillo verdoso, ver Tablas 3.1.

Identificación bioquímica de *P. fluorescens*

Se obtuvieron veinte aislados de posibles *Pseudomonas* fluorescentes por Tinción Gram, morfología de las colonias, y producción del pigmento pioverdina, de las cuales se seleccionaron ocho cepas identificadas como *P. fluorescens* mediante pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey 2005, ver Tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1 Características morfológicas y producción de pioverdina de las cepas de *P.fluorescens* aisladas de los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

| CEPA | Morfología celular | Morfología de la colonia | Producción de pioverdina |
|-------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Z2P6 | Bacilos Gram - | A | +++ |
| Z3P1 | Bacilos Gram - | A | +++ |
| Z4P1 | Bacilos Gram - | A | ++ |
| Z5P1 | Bacilos Gram - | B | ++ |
| Z5P5 | Bacilos Gram - | B | + |
| Z5P6 | Bacilos Gram - | A | +++ |
| Z4P1R | Bacilos Gram - | A | ++ |
| Z5P7R | Bacilos Gram - | B | + |

* Ver morfología descrita en sección 3.3

(+++), (++) (+): Mayor, mediana y poca producción del pigmento.

Tabla 3.2 Características fenotípicas de las cepas de *P. fluorescens* aisladas de los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en las diferentes zonas de muestreo.

| CEPA | TSI | OX | CAT | GEL | Crec. a 4°C | Crec. a 42°C | NIT | ADH | m- inositol | Acetamida | API 20NE (%ID) |
|-------|-----|----|-----|-----|-------------|--------------|-----|-----|-------------|-----------|----------------|
| Z2P6 | K/K | + | + | + | + | - | + | + | + | - | 99,9 |
| Z3P1 | K/K | + | + | + | + | - | + | + | + | - | 99,8 |
| Z4P1 | K/K | + | + | + | + | - | + | + | + | - | 98,9 |
| Z5P1 | K/K | + | + | + | + | - | - | + | + | - | 99,9 |
| Z5P5 | K/K | + | + | + | + | - | + | + | + | - | 99,9 |
| Z5P6 | K/K | + | + | + | + | - | + | + | + | - | 99,9 |
| Z4P1R | K/K | + | + | + | + | - | - | + | + | - | 99,9 |
| Z5P7R | K/K | + | + | + | + | - | - | + | + | - | 99,9 |

OXI: oxidasa, CAT: catalasa, GEL: licuefacción de gelatina, NIT: reducción de nitratos, ADH: Arginina dehidrolasa. Fundamento de las pruebas ver Sección 2.5.8.

3.4 Selección de tres cepas de *Pseudomonas fluorescens* para su aplicación en el ensayo

De los ocho aislados de *Pseudomonas fluorescens*, se seleccionaron tres cepas que presentaron el mayor índice de solubilidad de fosfato inorgánico (IS) como se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Selección de las cepas de *P. fluorescens* solubilizadoras de fosfato inorgánico en el medio Agar Pikovskaya.

| CEPA <i>P. fluorescens</i> | IS (3er día) | IS (5to día) | IS (7mo día) | Solubilización |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| Z5P6 | 4,8 a | 6,6 a | 6,97 a | ++ |
| Z5P5 | 4,5 a | 4,7 ab | 6,5 a | ++ |
| Z2P6 | 3,53 ab | 3,77 bc | 4,47 ab | ++ |
| Z5P7R | 2,93 b | 2,97 bc | 3,33 b | + |
| Z4P1 | 2,9 b | 2,33 c | 2,4 b | + |
| Z3P1 | 2,6 b | 3,13 bc | 3,2 b | + |
| Z5P1 | 2,3 b | 2,67 bc | 3 b | + |
| Z4P1R | 2,3 b | 2,8 bc | 4,47 ab | ++ |

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Las cepas seleccionadas: Z5P6, Z5P5 y Z2P6 presentaron los mayores rangos de significancia estadística según la prueba de Tukey al 5% como se puede observar en la Figura 3.5 las que solubilizaron el fosfato en mayor proporción formaron halos más grandes alrededor de las colonias.

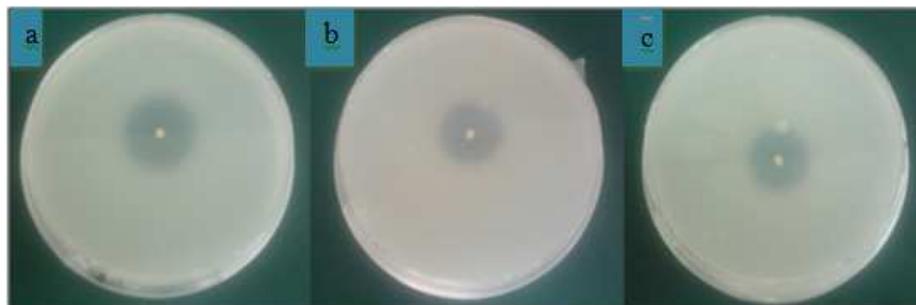


Figura 3.5 Presencia de halos de solubilidad de fosfato tricálcico de las cepas de *P. fluorescens* aplicadas en las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) (7mo día de ensayo).

a. Cepa Z5P6 b. Cepa Z5P5 c. Cepa Z2P6.

3.5 Evaluación del desarrollo y nutrición de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con HMA y *P.fluorescens*

El ensayo se desarrolló en un período de cuatro meses, inicialmente las plantas de tomate de árbol fueron infectadas con 180g de inóculo (que contenía 655 esporas de HMA) quedando una disolución final de 1,09 esporas por gramo de suelo en cada maceta. Después de 30 días se colocaron tres cepas de *P. fluorescens*: Z2P6, Z5P5 y Z5P6 en dos concentraciones 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml, según el diseño experimental descrito en la sección 2.4.

Tabla 3.4 Efecto de la inoculación simple y combinada de los HMA y las cepas de *P.fluorescens* en concentraciones de 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml sobre el desarrollo del tomate de árbol.

| Tratamientos | Altura (cm) | Área foliar (cm ²) | Biomasa aérea fresca (g) | Biomasa radical fresca (g) |
|--------------|-------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| M1_B3.2 | 18,70 a | 65,88 a | 12,07 a | 8,93 a |
| M1_B3.1 | 18,41 ab | 63,10 a | 11,42 a | 8,75 a |
| M1_B2.2 | 17,83 abc | 56,90 a | 11,00 a | 8,52 a |
| M1_B2.1 | 17,14 abc | 64,30 a | 10,99 a | 8,26 a |
| M1_B1.2 | 16,30 abc | 61,26 a | 10,92 ab | 7,78 ab |
| M1_B1.1 | 15,46 c | 57,40 a | 10,34 ab | 7,36 ab |
| M1_B0 | 16,10 bc | 60,22 a | 11,12 a | 8,59 a |
| M0_B3.2 | 10,22 de | 32,89 bc | 6,71 c | 4,20 cd |
| M0_B3.1 | 11,33 d | 40,89 b | 8,42 bc | 5,69 bc |
| M0_B2.2 | 9,54 de | 27,33 bc | 6,14 c | 4,30 c |
| M0_B2.1 | 10,31 de | 28,67 bc | 6,07 c | 4,38 c |
| M0_B1.2 | 10,42 de | 25,56 c | 6,97 c | 4,24 c |
| M0_B1.1 | 10,33 de | 28,67 bc | 6,73 c | 4,52 c |
| M0_B0 | 8,57 e | 19,42 c | 3,32 d | 1,99 d |

M0= sin HMA, B0= sin bacterias, M1= con 1.09 esporas/g

B1.1= *P. fluorescens* Z2P6 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, B1.2= *P. fluorescens* Z2P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml, B2.1= *P. fluorescens* Z5P5 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, B2.2= *P. fluorescens* Z5P5 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml, B3.1= *P. fluorescens* Z5P6 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, B3.2= *P. fluorescens* Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml.

Dentro de cada columna, letras idénticas son estadísticamente iguales según el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Los resultados de las variables de crecimiento: altura, perímetro, área foliar, biomasa aérea y radical fueron analizados mediante ANOVA, utilizando una prueba de Tukey al 5% para la comparación de los promedios, a los 120 días del ensayo. De manera general se observa que los tratamientos en combinación de HMA y *P.fluorescens* (concentraciones de: 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) y aquellos inoculados solamente con micorrizas presentan los mayores rangos de significancia, seguidos por los tratamientos con inoculación simple de rizobacterias que superan a las plantas control (plantas sanas). (Tabla 3.4).

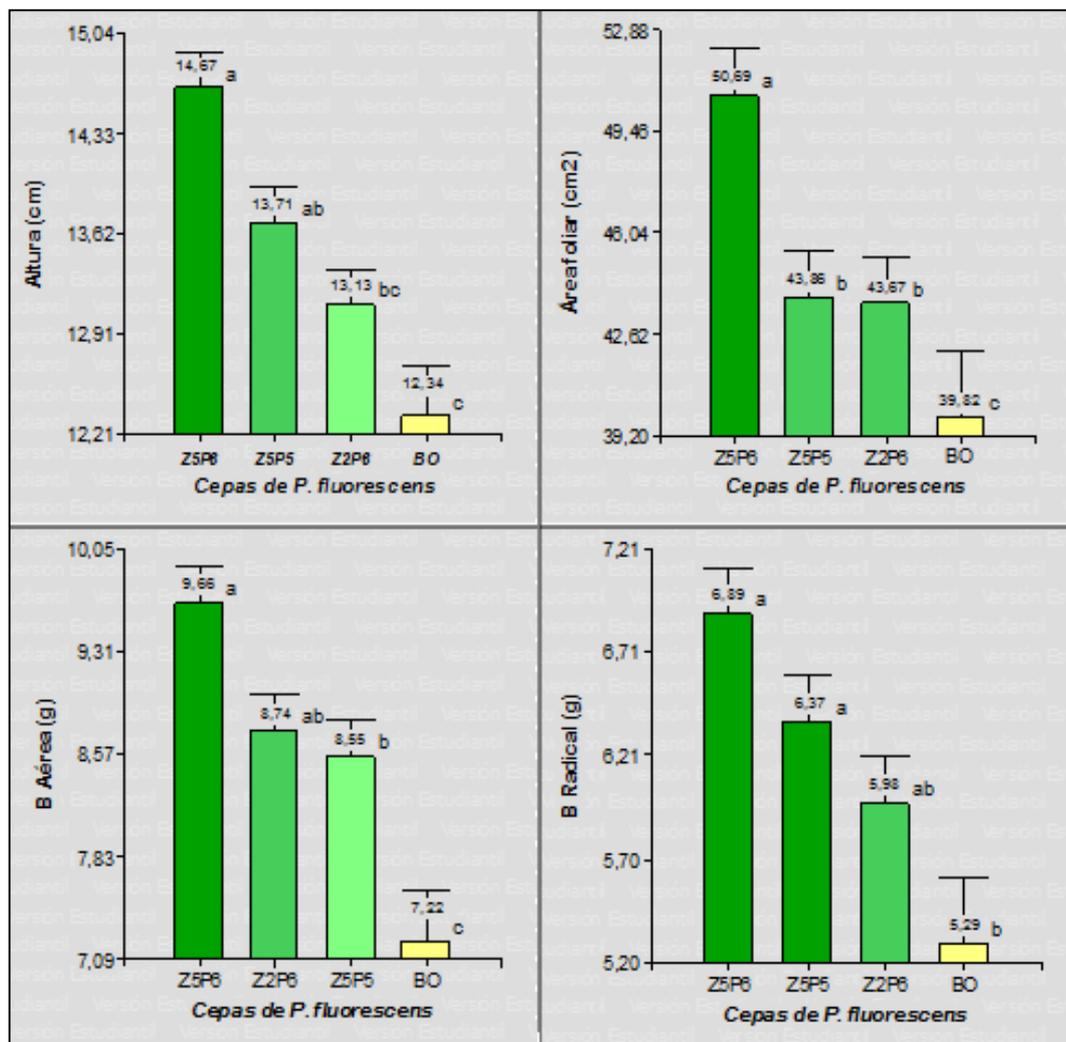


Figura 3.6 Efecto de la aplicación de las cepas de *P.fluorescens*: Z2P6, Z5P5 y Z5P6 sobre el desarrollo de las plantas de tomate de árbol a los 120 días de ensayo.

En la Figura 3.6 se muestra el efecto de las diferentes cepas aplicadas en las plantas, según el análisis ANOVA, donde la cepa Z5P6 mostró la mejor respuesta en las variables de crecimiento: altura, área foliar, biomasa aérea y radical en relación a las cepas: Z2P6 y Z5P5, las cuales superan en todos los casos a las plantas control. Sin embargo el comportamiento de las rizobacterias difiere sobre el perímetro de las plantas, debido a que los datos fueron tomados utilizando un sistema de medición poco preciso. Por lo tanto, existe un error considerable en la unidad de medida, que varía en todos los tratamientos del ensayo (datos no mostrados).

Como se muestra en la Tabla 3.4, la cepa Z5P6 aplicada en interacción con los HMA sugiere un posible sinergismo en todas las variables de desarrollo, los valores más altos se presentaron cuando las bacterias *P.fluorescens* fueron aplicadas en una concentración de 6.0×10^8 UFC/ml en comparación con la dosis de 1.5×10^8 UFC/ml. Por estas razones, a continuación se analizará el efecto de las variables de crecimiento en las plantas con la aplicación simple y combinada con micorrizas y la cepa Z5P6 en la dosis más alta.

3.5.1 Altura

En la Tabla 3.4 se muestra que los tratamientos en combinación con micorrizas y rizobacterias presentan las mayores medias poblacionales, destacándose el tratamiento M1_B3.2 que presenta la media muestral mayor en altura (18,70cm), siendo este último estadísticamente significativo con respecto a todos los tratamientos con inoculación simple tanto de HMA, como de *P.fluorescens* y de las plantas control.

En la Figura 3.7, se ilustra un gráfico donde se presentan las plantas co-inoculadas con HMA y la cepa Z5P6 mostrando la mayor altura en relación a los otros tratamientos, con diferencias significativas en todos los casos.

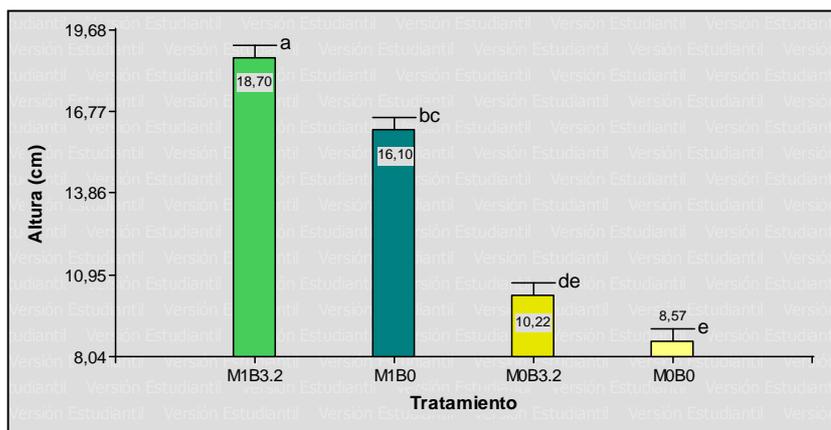


Figura 3.7 Efecto de la interacción simple y combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* sobre la altura de las plantas de tomate de árbol.

M1B3.2= Inóculo combinado (M1: micorrizas y B3.2: *P.fluorescens* Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml).

M1B0= Inóculo simple (M1: micorrizas y B0: sin cepa bacteriana)

M0B3.2= Inóculo simple (M0: sin micorrizas y B3.2: Cepa Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml).

M0B0= Sin inóculo de microorganismos (plantas sanas).

3.5.2 Área foliar

En la Tabla 3.4 se observa que los tratamientos con HMA en interacción con las cepas de *P.fluorescens* y el tratamiento con micorrizas difieren estadísticamente de los no micorrizados en relación al área foliar. Dentro de este grupo, el tratamiento M1_B3.2 ocupa el mayor rango de significancia, presentando la media muestral más alta ($65,88\text{cm}^2$).

En la Figura 3.8 se observa que tanto la inoculación simple como la combinada entre los HMA y la cepa Z5P6 incrementan el área foliar en relación a las plantas control. Sin embargo, la respuesta a la inoculación simple con HMA y a la interacción entre los microorganismos no muestra diferencias significativas, no obstante, la co-inoculación mejora el desarrollo de las hojas.

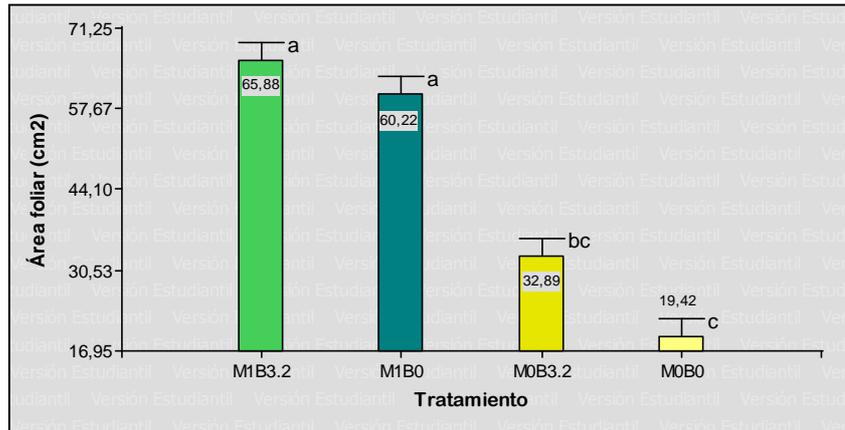


Figura 3.8 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre el área foliar

M1B3.2= Inóculo combinado (M1: micorrizas y B3.2: *P.fluorescens* Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml).

M1B0= Inóculo simple (M1: micorrizas y B0: sin cepa bacteriana)

M0B3.2= Inóculo simple (M0: sin micorrizas y B3.2: Cepa Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml).

M0B0= Sin inóculo de microorganismos (plantas sanas).

3.5.3 Biomasa aérea y radicular

En la Tabla 3.4 se muestra que tanto para la biomasa aérea como radical, los tratamientos combinados con micorrizas y cepas bacterianas, como el con HMA, difieren significativamente en relación a los que no fueron micorrizados. Dentro de este grupo el que ocupa el mayor rango de significancia, es M1_B3.2 presentando la media muestral más alta para la biomasa aérea fresca (12,07 g) y radical (8,93 g).

En la Figura 3.9 se observa que todas las inoculaciones tanto simples como combinadas de HMA y la cepa Z5P6 aumentan la biomasa aérea y radical en relación a las plantas control. En respuesta a estos tratamientos con HMA y en interacción con las rizobacterias no hay diferencias significativas, sin embargo, la co-inoculación provee un incremento en el crecimiento aéreo y radical de las plantas de tomate de árbol.

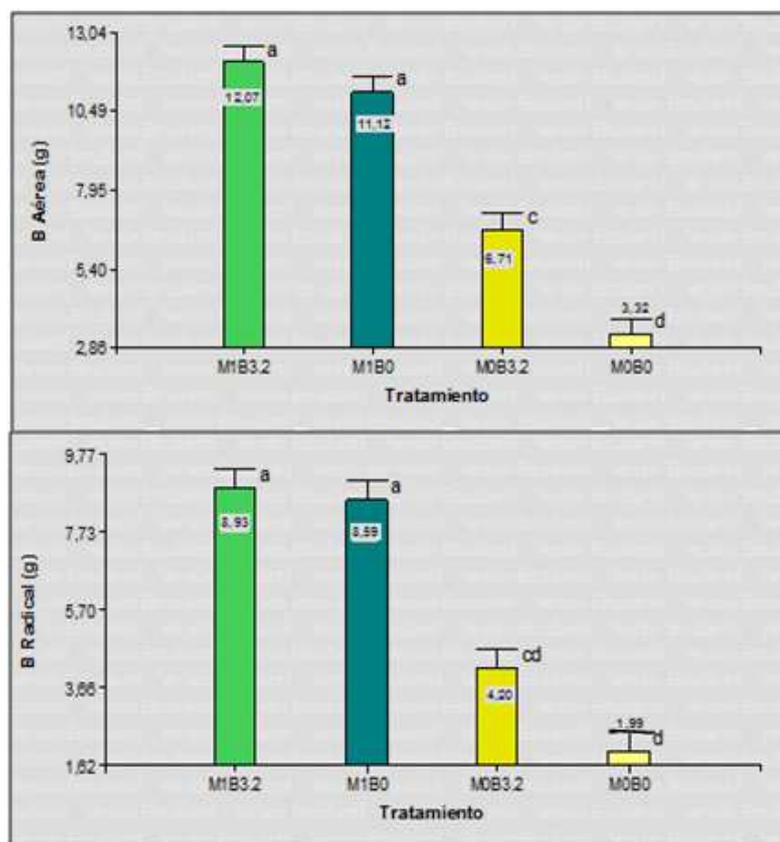


Figura 3.9 Efecto de la interacción entre HMA y cepa Z5P6 sobre la biomasa aérea y radical de las plantas de tomate de árbol.

3.5.4 Conteo de esporas y porcentaje de colonización en las plantas de tomate de árbol

La Tabla 3.5 presenta la evaluación de los HMA mediante el conteo de esporas y porcentaje de colonización de los tratamientos con aplicación simple y combinada de micorrizas con las cepas de *P. fluorescens* (en concentraciones: 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) en plantas de tomate de árbol, luego de cuatro meses de ensayo.

Tabla 3.5 Efecto de la interacción entre HMA y las cepas de *P.fluorescens* en el conteo de esporas y porcentaje de colonización de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

| Tratamiento | Esporas/g de suelo | % de Colonización |
|-------------|--------------------|-------------------|
| M1_B0 | 17,63 a | 61,33 a |
| M1_B3.1 | 14,20 b | 60,67 a |
| M1_B3.2 | 9,63 d | 56,00 ab |
| M1_B2.1 | 10,23 cd | 52,33 c |
| M1_B2.2 | 9,50 d | 41,67 cd |
| M1_B1.1 | 10,40 c | 45,67 c |
| M1_B1.2 | 8,33 e | 36,00 d |
| M0_B3.1 | 0,07 f | 0,33 e |
| M0_B3.2 | 0 f | 0 e |
| M0_B2.1 | 0,07 f | 0 e |
| M0_B2.2 | 0,03 f | 0 e |
| M0_B1.1 | 0,07 f | 0 e |
| M0_B1.2 | 0 f | 0 e |
| M0_B0 | 0 f | 0 e |

M0= sin HMA, **B0**= sin bacterias, **M1**= con 1.09 esporas/g
B1.1= *P. fluorescens* Z2P6 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, **B1.2**= *P. fluorescens* Z2P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml,
B2.1= *P. fluorescens* Z5P5 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, **B2.2**= *P. fluorescens* Z5P5 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml,
B3.1= *P. fluorescens* Z5P6 en conc. 1.5×10^8 UFC/ml, **B3.2**= *P. fluorescens* Z5P6 en conc. 6.0×10^8 UFC/ml.

Dentro de cada columna, letras idénticas son estadísticamente iguales según el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

El número de esporas de HMA por gramo de suelo presentó el mayor valor (prueba de Tukey al 5%) en el tratamiento de las plantas inoculadas solamente con micorrizas, seguidas de los tratamientos de interacción entre HMA y rizobacterias en concentración de 1.5×10^8 UFC/ml. Los valores disminuyeron en las plantas con micorrizas y con mayor concentración de las cepas (inoculadas con 6.0×10^8 UFC/ml) mientras que los menores valores (cerca de 0) se obtuvieron en los tratamientos no micorrizados y en el control (Tabla 3.5).

Respecto a la colonización micorrícica se puede apreciar que las plantas con inoculación simple de HMA y en combinación con la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* muestran valores estadísticamente iguales de infección en las plantas de tomate de árbol, seguidas por los tratamientos con la combinación de micorrizas y las cepas Z5P5 y Z2P6, los cuales son estadísticamente diferentes de los tratamientos con inoculación simple de *Pseudomonas fluorescens* y del control (Tabla 3.5).

En la Figura 3.10 se presentan fotografías de las raíces de las plantas de tomate de árbol teñidas con azul de tripano, y observadas en el microscopio óptico en un aumento de 100x, donde se pueden apreciar estructuras fúngicas de los HMA.

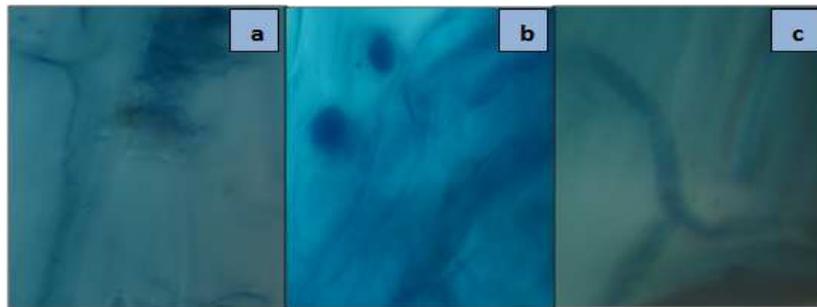


Figura 3.10 Estructuras fúngicas en raíces de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) luego de cuatro meses de ensayo, teñidas con azul de tripano y observadas al microscopio en un aumento de 100x. **a.** arbusculos **b.** vesículas **c.** hifa.

3.5.5 Conteo de la densidad poblacional de *P.fluorescens* de raíces y rizósfera en las plantas de tomate de árbol

En la Figura 3.11.a, se pueden observar las densidades poblacionales entre 10^4 y 10^5 UFC/g tanto en raíces como en el suelo, en las plantas que fueron inoculadas de forma simple con las cepas de *Pseudomonas fluorescens* en una dosis de 6.0×10^8 UFC/ml, en aquellos tratamientos combinados con rizobacterias y micorrizas, y en los controles

(M1B0 y M0B0) que no presentaron infección bacteriana. Las plantas con *P.fluorescens* en una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml aplicadas en forma simple y en combinación con los HMA muestran valores de 10^5 UFC/g en raíces y de 10^4 UFC/g en suelo. Sin embargo, respecto a los controles, el tratamiento M1B0 presentó una densidad de 10^3 UFC/ml, sin contaminación alguna en el control absoluto (M0B0) (ver Fig 3.11.b).

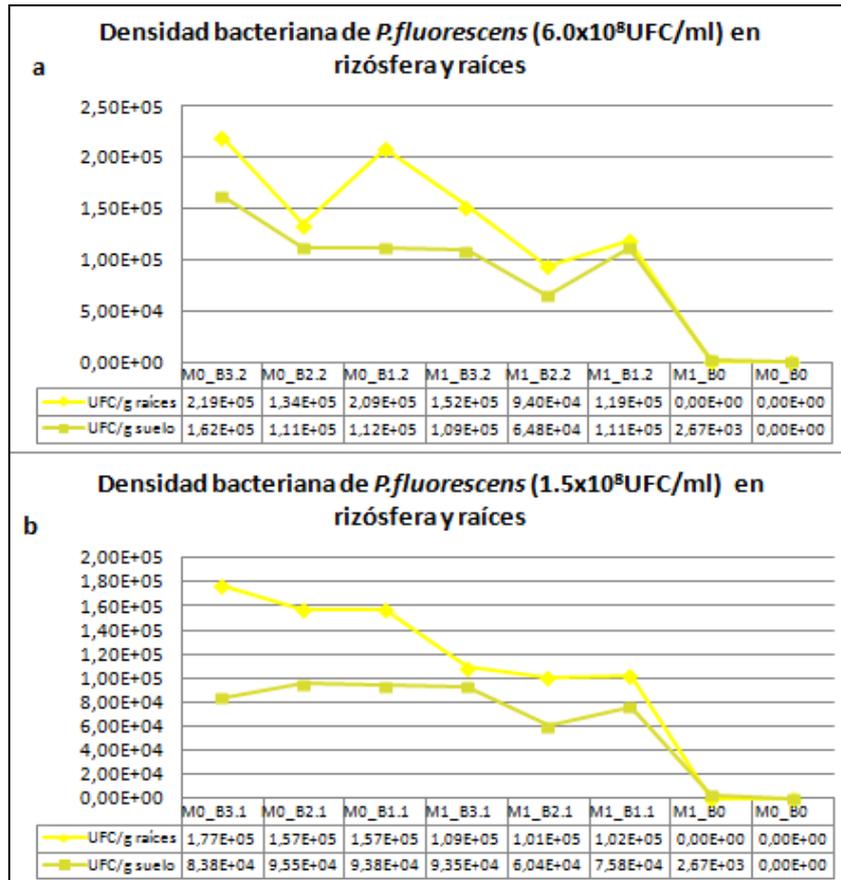


Figura 3.11 Densidad bacteriana de *P.fluorescens* por gramo de raíces y suelo de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

3.5.6 Análisis de correlación entre la población de micorrizas y las variables de desarrollo

En la Tabla 3.6 se muestra una correlación positiva altamente significativa entre el número de esporas/g de suelo y el porcentaje de colonización micorrícica respecto a la

altura de las plantas. En referencia a las variables de desarrollo: área foliar, biomasa aérea y radical, existe una correlación moderada con respecto a las variables de respuesta de las micorrizas (a los 120 días del ensayo).

Tabla 3.6 Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de respuesta de los microorganismos aplicados y las variables de crecimiento en las plantas de tomate de árbol.

| VARIABLES | ALTURA | ÁREA FOLIAR | BIOMASA AÉREA | BIOMASA RADICAL |
|-------------------|--------|-------------|---------------|-----------------|
| N° esporas/g | 0,82 | 0,77 | 0,71 | 0,73 |
| % de colonización | 0,87 | 0,80 | 0,74 | 0,76 |

Se consideran correlaciones significativas con un $P \leq 0.05$

3.5.7 Supervivencia de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

En la Figura 3.12 se puede observar que hubo un 90% de plántulas de tomate de árbol vivas (126) y un 10% de muertas (14) de estas últimas 6 fueron plantas con bacterias, 1 con micorrizas, 4 co-inoculadas y 3 controles. La evidencia sugiere que se debe a factores externos al experimento (plagas de hongos y pulgones).

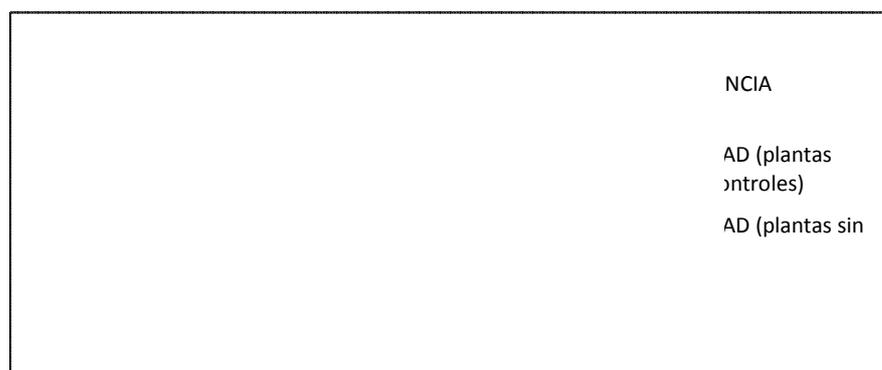


Figura 3.12 Supervivencia de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) durante cuatro meses de ensayo.

3.5.8 Análisis de nutrientes a nivel foliar

3.5.8.1 Fósforo (P) foliar

En la Tabla 3.7 se presenta el efecto simple y combinado de las micorrizas y las cepas de *P.fluorescens* (aplicadas en 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) sobre el porcentaje de absorción de fósforo de las plantas de tomate de árbol. Se muestra que las plantas control (sin inóculos) y aquellas inoculadas con diferentes cepas de *P.fluorescens* presentaron niveles de fósforo foliar deficientes, a diferencia de todas las plantas micorrizadas que mostraron niveles normales (entre 0,151 y 0,401%). Las plantas que absorbieron mayor proporción de dicho macroelemento fueron aquellas con HMA y bacterias.

Tabla 3.7 Efecto de las micorrizas y de la combinación entre HMA y *P.fluorescens* sobre el porcentaje de P foliar en las plantas de tomate de árbol.

| Tratamiento | P (%) |
|-------------|--------|
| M0_B0 | 0,08 D |
| M0_B1.1 | 0,08 D |
| M0_B1.2 | 0,10 D |
| M0_B2.1 | 0,09 D |
| M0_B2.2 | 0,10 D |
| M0_B3.1 | 0,09 D |
| M0_B3.2 | 0,08 D |
| M1_B0 | 0,19 B |
| M1_B1.1 | 0,22 S |
| M1_B1.2 | 0,22 S |
| M1_B2.1 | 0,23 S |
| M1_B2.2 | 0,18 B |
| M1_B3.1 | 0,24 S |
| M1_B3.2 | 0,22 S |

Los símbolos de D: deficiente, B: bajo y S: suficiente, tienen como significado clasificar los valores de los diferentes parámetros analizados con un nivel de confianza 95% **AGROBIOLAB 2011.**

En la Figura 3.13 se muestra la absorción de fósforo en las plantas inoculadas en forma simple y combinada con HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens*. Al finalizar el ensayo (120 días) el valor más alto (0,22%) se presentó en las plantas co-inoculadas.

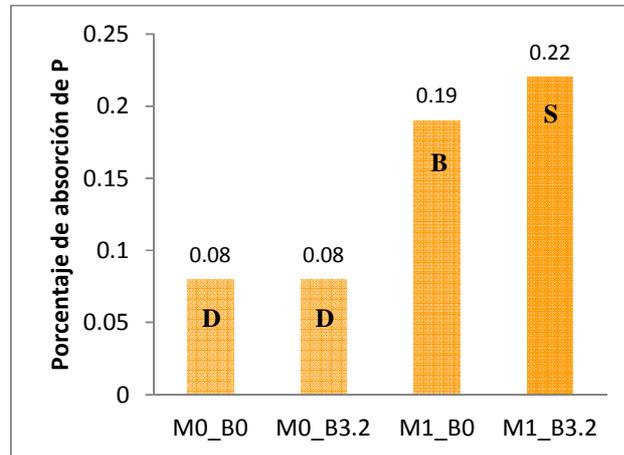


Figura 3.13 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de fósforo en las plantas de tomate de árbol.

3.5.8.2 Nitrógeno (N) foliar

En la Tabla 3.8 se presenta el efecto de las micorrizas y de la combinación con *P.fluorescens* (aplicada en 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) sobre la absorción de nitrógeno foliar en las plantas de tomate de árbol. Se muestra que las plantas control y aquellas inoculadas con bacterias presentaron niveles de nitrógeno deficientes, a diferencia de las plantas inoculadas con HMA y las co-inoculadas (con micorrizas y rizobacterias) que presentaron niveles normales de absorción de N (entre 2,501 y 6,001%) siendo el valor máximo en las plantas de inoculación doble.

Tabla 3.8 Efecto de la inoculación simple y combinada de las micorrizas y *P.fluorescens* sobre el porcentaje de N foliar de plantas de tomate de árbol.

| Tratamiento | N (%) |
|--------------------|--------------|
| M0_B0 | 1,05 D |
| M0_B1.1 | 1,95 D |
| M0_B1.2 | 2,20 D |
| M0_B2.1 | 1,78 D |
| M0_B2.2 | 1,89 D |
| M0_B3.1 | 1,98 D |
| M0_B3.2 | 2,09 D |
| M1_B0 | 2,91 S |
| M1_B1.1 | 3,48 S |
| M1_B1.2 | 2,97 S |
| M1_B2.1 | 3,25 S |
| M1_B2.2 | 2,98 S |
| M1_B3.1 | 3,54 S |
| M1_B3.2 | 3,50 S |

Los símbolos D: deficiente y S: suficiente, tienen como significado clasificar los valores de los diferentes parámetros analizados con un nivel de confianza 95% **AGROBIOLAB 2011**.

En la Figura 3.14 se muestra la absorción de nitrógeno en las plantas inoculadas en forma simple y combinada (con HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens*) a los 120 días de ensayo, presentando el valor más alto (3,50%) las plantas co-inoculadas.

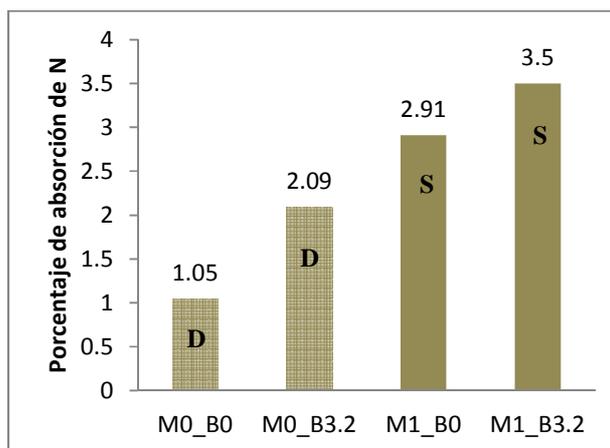


Figura 3.14 Efecto de la interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 sobre la absorción de nitrógeno en las plantas de tomate de árbol.

El análisis de los macro y microelementos restantes, se adjunta en el Anexo B, pudiendo observarse que no hay diferencias significativas entre los tratamientos del ensayo y que la mayoría de nutrientes se encuentran dentro de los parámetros normales para el desarrollo del cultivo.

3.5.9 Análisis de nutrientes en el suelo

En el Anexo C, se muestra el análisis de macro y microelementos del suelo de los catorce tratamientos del ensayo. Los valores de pH fueron similares en todos los tratamientos, variando en un rango de 6,2 y 6,9, ubicándose en neutro.

Los porcentajes de materia orgánica en el sustrato de los tratamientos variaron entre 5,48 y 14,98%, encontrándose dentro del rango normal (de 2 a 40%) para el cultivo de tomate de árbol. Sin embargo, los valores más altos se presentaron en los tratamientos no micorrizados y en el control (entre 10,96 y 14,98%) siendo menores en las plantas con HMA y co-inoculadas (entre 5,48 y 8,04%).

El análisis del contenido de fósforo en el sustrato con los diferentes tratamientos, se observaron que las plantas micorrizadas y aquellas con interacción de HMA y *P.fluorescens* alcanzaron niveles normales (entre 47-66ppm) en comparación con las plantas inoculadas con rizobacterias y las control que presentaron valores deficientes (entre 2,1 y 4,3ppm) (ver Anexo C).

Respecto al nitrógeno, se presenta una mayor cantidad de NO_3 en el suelo de las plantas control y en aquellas con inoculación simple de *P.fluorescens*. Sin embargo los valores encontrados en todos los tratamientos fueron deficientes para el cultivo en estudio (Ver Anexo C).

Por otra parte en el Anexo C, se muestra una mayor cantidad de magnesio en el suelo de los tratamientos micorrizados en comparación con la inoculación simple de *P.fluorescens* y del control. En todos los casos se presentan valores dentro del rango adecuado para el desarrollo del cultivo de tomate de árbol.

La cantidad de SO_4 encontrada en el suelo fue excesiva en las plantas con inoculación simple de HMA y en los tratamientos con micorrizas y *P. fluorescens*, comparada con el suelo de las plantas control y con inoculación simple de rizobacterias, que presentaron valores dentro del rango normal para el desarrollo de la especie. (Ver Anexo C).

Finalmente el Anexo C muestra que los microelementos: cobre, zinc y boro están dentro de los rangos óptimos para el desarrollo del tomate de árbol, sin embargo, los valores más altos se presentaron en los sustratos de las plantas micorrizadas y co-inoculadas.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Propagación de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) asociados al cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

Los hongos micorrícicos arbusculares presentan diferentes ventajas sobre las plantas, principalmente como agentes biorreguladores del crecimiento y sobre el control de patógenos radicales. Por estas razones cada día tienen mayor aplicación en los cultivos de interés comercial, permitiendo obtener especies vegetales de vigor y calidad superior en el menor tiempo posible, reducir costos de producción e incorporar el manejo de productos orgánicos, que a la vez disminuyen paulatinamente el uso de fertilizantes químicos (Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato R., 1999).

Para la propagación de los HMA se utilizó un inóculo nativo proveniente del cultivo de tomate de árbol, debido a que estos microorganismos se encuentran adaptados a las condiciones del cultivo y probablemente su mecanismo de acción en cada especie vegetal sea diferente y de mayor eficiencia (Klironomos J.N., 2003). Al final de la multiplicación de los HMA se obtuvo un inóculo de 3,64 esporas/g con un porcentaje de colonización del 48%, siendo este valor bajo debido que el inóculo inicial también fue pequeño (0,87 esporas/g) (ver Capítulo 3, Figura 3.1). Por esa razón se utilizó un porcentaje alto (40%) para su propagación, debido a que el potencial micorrícico habría disminuido probablemente por la fertilización y el uso descontrolado de fungicidas y herbicidas (Barea J.M y Azcón C., 2002).

Además, los procesos de producción agrícola inciden sobre la densidad poblacional microbiana del suelo, afectando tanto su biodiversidad como la concentración presente en la rizósfera. Por lo tanto, la falta de condiciones adecuadas para su

supervivencia y adaptación produce una pérdida de la fertilidad de los suelos a largo plazo (Ogata, K. y Zuñiga D., 2008).

4.2 Densidad poblacional de *Pseudomonas* sp. en las zonas muestreadas con cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

De las cinco zonas muestreadas se obtuvo una densidad bacteriana de *Pseudomonas* sp. que varió entre 10^4 y 10^5 UFC/g de raíces y suelo seco (Figura 3.3 y 3.4). Estos valores están dentro de lo manifestado en investigaciones anteriores, donde la densidad bacteriana permanece entre 10^3 a 10^6 UFC/g en suelos de diferentes orígenes, indicando que existe un amplio rango en la abundancia de este grupo, dependiendo de los factores edáficos que afectan la composición de los suelos de uso agrícola. (Bajsa, N., 2008).

4.3 Selección de cepas de *Pseudomonas fluorescens* para su aplicación en el ensayo

La diversidad de las *Pseudomonas* fluorescentes es esencial en el rol ecológico del suelo, ya que entre los mecanismos de acción sobre los cultivos se sabe que ayudan a solubilizar el fosfato inorgánico en suelos con baja disponibilidad de fósforo, mejorando la absorción en las plantas (Popavath R *et. al*, 2008). Estos autores reportaron que *Pseudomonas* fluorescentes (*P.fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. fulva*, *P. mosselli* y *P. plecoglossicida*) poseen potencial para solubilizar fosfato tricálcico, presentando halos de tamaño de 3 ± 1 mm en el medio Pikovskaya a los 10 días de ensayo. Comparando estos valores con los resultados de las cepas de *P.fluorescens* seleccionadas en esta investigación (Capítulo 3, Tabla 3.3 y Figura 3.5) se observó que estas últimas mostraron mayores tamaños de halos 6 ± 1 mm durante siete días de ensayo, es decir que las cepas (aisladas del cultivo de tomate de árbol) presentaron valores superiores de índice de solubilidad de fosfatos (IS).

Se presume que entre los mecanismos de solubilidad del fosfato tricálcico por parte de *Pseudomonas fluorescens* se encuentra la producción de ácidos orgánicos (ácido acético, oxálico y succínico) en el medio Pikosvkaya, que al tener carga negativa forman complejos metálicos, liberando los aniones fosfatos (Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D., 2010). De las tres cepas seleccionadas, al finalizar el ensayo, se demostró que la cepa Z5P6 tuvo mayor sinergismo con los HMA sobre el desarrollo y nutrición de las plantas de tomate de árbol, siendo esta la que presentó el IS más alto en la prueba de selección.

4.4 Evaluación del desarrollo de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con HMA y *P.fluorescens*

Como se muestra en la Tabla 3.4 y Figura 3.7 los valores promedios del tratamiento con la co-inoculación entre la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* y el consorcio de HMA mejora la altura de las plantas de tomate de árbol, siendo estadísticamente diferente de los demás tratamientos del ensayo. Según Cuesta y colaboradores (2004) esta respuesta positiva de las plantas a la inoculación dual disminuirá el periodo de estancia de la especie vegetal en vivero, además de producir plántulas de mejor calidad fisiológica. Similares resultados fueron obtenidos por este autor con la inoculación doble de *P.fluorescens* y *Glomus mosseae* en plantas forestales de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Por su parte Staley y colaboradores (1992) encontraron que al inocular *P.fluorescens* y HMA en plantas de alfalfa y trébol incrementaron en un 23% la altura de las especies respecto a las plantas control. Comparando los resultados de la altura en las plantas de tomate de árbol del presente ensayo, se logró un incremento de 1 vez con la aplicación dual en comparación con el tratamiento control.

Los valores promedios de la aplicación en conjunto de micorrizas y *P.fluorescens* y la inoculación simple de HMA presentaron el mismo nivel de significancia estadística en relación al área foliar (ver Capítulo 3, Tabla 3.4 y Figura 3.8)

aunque numéricamente la co-inoculación supera la aplicación simple de los microorganismos, mostrando un incremento en el caso de la aplicación dual, siendo necesario realizar otros ensayos con mayor número de muestras para verificar si este incremento llega a ser significativo.

Las plantas inoculadas con la combinación de HMA y *Pseudomonas fluorescens* presentan un valor promedio de la biomasa aérea y radicular estadísticamente igual al alcanzado por la aplicación simple de micorrizas, no obstante superiores a los tratamientos con la adición simple de rizobacterias y al control (ver Capítulo 3, Tabla 3.4 y Figura 3.9). Similares resultados fueron obtenidos por Cuesta y colaboradores (2004) donde la co-inoculación HMA-bacterias y la inoculación exclusiva de micorrizas superan significativamente al testigo en peso seco radical y aéreo de las plántulas de *Swietenia macrophylla x mahagoni*. Con estos resultados se evidencia que el consorcio de HMA y *P. fluorescens* aplicados sobre las plantas de tomate de árbol interviene beneficiosamente en el desarrollo de las plántulas, esto podría deberse a la síntesis de fitohormonas como las auxinas producidas tanto por las micorrizas como por las rizobacterias (Cuesta et. al, 2004).

4.4.1 Conteo de esporas y porcentaje de colonización micorrícica al finalizar el ensayo

Se observó que el consorcio de HMA aplicado en los diferentes tratamientos del ensayo tuvo la capacidad de adaptarse a las condiciones del entorno, multiplicarse y colonizar a las especies vegetales en estudio. Siendo el comportamiento de la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* mejor y diferente que Z2P6 y Z5P5 con respecto a la interacción con micorrizas. En la Tabla 3.5 se muestra que la colonización radicular establecida por los hongos micorrícicos arbusculares en las plantas de tomate de árbol fue estadísticamente igual en los tratamientos con la aplicación simple de HMA y en aquellos con inoculación combinada de micorrizas y la cepa Z5P6 de *P. fluorescens* (en conc. de 1.5×10^8 y

6.0x10⁸UFC/ml). En un ensayo con inoculación doble de HMA y *P.fluorescens* sobre el cultivo de trigo, se observó que existe una influencia positiva de la colonización micorrícica en la especie gramínea, acción que se vió reflejada en el mejoramiento de la calidad nutricional del grano. (Kumar Choudhary D, et al., 2009). Según este autor esto podría deberse a que los metabolitos secundarios producidos por las *P.fluorescens* entre los que se destaca el 2,4 diacetil-floroglucinol (DAPG) importante antibiótico en la inhibición de patógenos fúngicos, no afecta el crecimiento de las micorrizas. Resultados similares fueron obtenidos en el presente estudio, existiendo un posible sinergismo entre los microorganismos aplicados, que permitieron mejorar el estado nutricional del tomate de árbol, con una mayor absorción de fósforo y nitrógeno en las plántulas de cuatro meses de edad (ver Tabla 3.7 y 3.8).

4.4.2 Conteo de la densidad poblacional de *P.fluorescens* de raíces y rizósfera al finalizar el ensayo

Los procesos de supervivencia y colonización de las bacterias están influenciados por factores abióticos (humedad, textura, temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno y nutrientes en el suelo) y por factores bióticos (estado fisiológico en el que se aplica el inóculo bacteriano, presencia de antagonismo y capacidad de competencia) (Loredo, O., et al., 2004).

Los factores abióticos en los que se desarrolló el presente ensayo fueron apropiados para la supervivencia de *P. fluorescens*, debido a que la composición del sustrato en el cual se inocularon las bacterias contenía: tierra negra (que posee alto contenido de materia orgánica y nitrógeno) pómina (para un buen drenaje) y turba (como fuente principal de fósforo y demás nutrientes). La temperatura del suelo varió entre 20 y 30°C y el pH entre 6.2 y 6.9, ubicándose en un nivel neutro, rangos óptimos (entre los que se presenta la máxima tasa de multiplicación bacteriana) para el crecimiento de estas rizobacterias (Palleroni, N. J., 2005).

En relación a los factores bióticos, *P.fluorescens* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana de la rizósfera (Kumar Choudhary D, et al., 2009). Por ejemplo cuando entran en competencia con otros microorganismos presentes en el suelo, está implicada la capacidad de desnitrificación y producción de sideróforos (pioverdinas) que les da ventaja sobre otros microorganismos. Así lo demostraron Mirleau y colaboradores (2001) cuando aplicaron la cepa C7R12 de *Pseudomonas fluorescens* frente a cepas mutantes de la misma especie, mostrando que las cepas defectuosas que no presentaban nitrato reductasa y no tenían la capacidad de producir pioverdina fueron significativamente menos competentes que las cepas bacterianas control (wild type). De acuerdo a estos antecedentes, los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas de la presente investigación mostraron similares capacidades que les permitieron ser competentes (ver Capítulo 3, Tabla 3.1 y 3.2).

Probablemente el desarrollo normal de las cepas de *P.fluorescens* se facilitó por las condiciones del entorno anteriormente citadas, existiendo un mayor crecimiento de las rizobacterias cuando fueron inoculadas en forma simple, seguidas por la aplicación en combinación con los HMA, presentando una pequeña densidad poblacional en el tratamiento M1B0 (en las plantas micorrizadas) y un crecimiento nulo en el tratamiento control (ver Capítulo 3, Figura 3.11). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Dixon et. al., 1989; Posta et. al., 1994 y por Marchner y Crowley, 1996, en los que manifiestan que las poblaciones de *Pseudomonas* sp. se ven disminuidas por la colonización de los hongos micorrícicos arbusculares, sugiriendo que la disminución de los exudados radicales influye en el número de bacterias y estado fisiológico de las mismas. Además este comportamiento podría relacionarse con la competencia por la fuente de carbono y por el espacio en la rizósfera.

Por otra parte, Kumar Choudhary y otros autores (2009) consideran que un nivel de colonización óptimo de *Pseudomonas* sp. para mejorar el crecimiento e inducir el

control biológico en las plantas está entre 10^5 y 10^6 UFC/g de raíces. En los resultados de las densidades poblacionales obtenidas en el ensayo (Figura 3.11) la aplicación de las cepas Z2P6 y Z5P6 (inoculada en concentraciones de 1.5×10^8 y 6.0×10^8 UFC/ml) en forma simple y dual con los HMA se encuentran dentro del rango que sugiere una buena colonización radicular. Sin embargo, aunque la cepa Z5P5 muestra una concentración bacteriana de 10^4 UFC/g de raíces, también presentó un efecto positivo sobre el desarrollo del tomate de árbol. Los mejores resultados se observaron en las plantas con la aplicación de la cepa Z5P6 en combinación con los HMA, respecto a la altura se incrementó en 1 vez, dos veces sobre el área foliar, 3 en relación a la biomasa aérea y 3 sobre la biomasa radical en comparación con las plantas control (Capítulo 3, Tabla 3.4).

4.4.3 Análisis de la correlación entre la población de micorrizas y las variables de crecimiento

Como se muestra en la Tabla 3.6 hubo una correlación significativamente alta entre los HMA y las variables de desarrollo del tomate de árbol, luego de 120 días de ensayo, indicando que existe un efecto directo de las micorrizas sobre el crecimiento de las plantas. Así lo demuestra Jaizme M. C. y Rodríguez A. (2008) en diferentes ensayos, donde existió efecto positivo de estos microorganismos sobre las primeras fases de crecimiento en cultivos de interés agrícola. Entre las especies más destacadas se presentaron *Glomus mosseae* sobre tедера (*Bituminaria bituminosa L.*) papaya (*Carica papaya L. cv. Sunrise*) y tomate (*Solanum lycopersicum L. cv. Daniela*) mostrando en todos los casos diferencias significativas en las variables de desarrollo y absorción de nutrientes en relación a las plantas control.

4.4.4 Análisis de nutrientes a nivel foliar y del suelo de las plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) inoculadas con HMA y *P.fluorescens*

En la Tabla 3.7 y Figura 3.13 se indica que la mayor absorción de fósforo se encontró en las plantas de tomate de árbol con inoculación dual de micorrizas y cepas de *Pseudomonas fluorescens* en comparación con la inoculación simple de rizobacterias. Estas diferencias sugieren que la co-inoculación contribuye a mejorar la absorción del mineral, lo que puede ser atribuido a la capacidad que tuvieron los HMA de colonizar las especies vegetales y a la solubilización por parte de *P.fluorescens* del fósforo inorgánico del suelo. Por su parte las micorrizas incrementan el área de absorción radical y a la vez, extraen el macroelemento de diferentes fuentes de fósforo inaccesibles para las plantas. (Raven, et. al, 1992). Se sabe que las micorrizas producen fosfomonoesterasas que intervienen en el proceso de solubilización de fósforo orgánico en el suelo. Además los hongos micorrícicos arbusculares pueden inmovilizar el P mediante la formación de gránulos de polifosfato en sus vacuolas, que luego serán translocados en la planta, sin embargo este mecanismo todavía no está claro (Summer, Malcome E., 2000).

Barea et. al, (1983) sugiere que la cooperación entre *P. fluorescens* (bacterias solubilizadoras de fosfato) y los HMA es muy provechosa, ya que el P liberado en el suelo por los primeros microorganismos serían absorbidos por los segundos, que posteriormente lo harán disponible para la planta. Comparando estos resultados con el análisis de nutrientes en el suelo de los tratamientos del presente ensayo (Anexo C) se puede sugerir que el comportamiento de estos microorganismos co-inoculados es similar a lo descrito anteriormente. Por lo tanto, es deficiente la asimilación de P cuando los microorganismos se aplican en forma independiente en comparación con la co-inoculación que alcanzaron niveles de absorción suficientes para el desarrollo del cultivo (ver Capítulo 3, Figura 3.13).

En investigaciones anteriores se ha demostrado que puede haber dependencia de ciertas especies de micorrizas como *G. mosseae* para actuar de forma combinada con las bacterias solubilizadoras de fosfato, mientras que otras pueden presentar buenos resultados de solubilidad por si solas como *G. fasciculatum*. Por lo tanto, sería interesante identificar las especies más predominantes en el consorcio de micorrizas aplicado en el ensayo, a fin de conocer el comportamiento de cada HMA actuando en forma independiente y en combinación con *Pseudomonas fluorescens* sobre la nutrición mineral del tomate de árbol. De esta manera utilizar estos microorganismos pueden llegar a sustituir a una gran cantidad de fertilizantes fosfatados, reduciendo considerablemente gastos energéticos y costos de producción agrícola (Raven, et. al, 1992).

La mayor absorción de nitrógeno se presentó en las plantas co-inoculadas con HMA y *Pseudomonas fluorescens* (ver Tabla 3.8 y Figura 3.14). Similares resultados fueron obtenidos con la inoculación doble entre *Glomus* sp. cepa Zac19 y *Pseudomonas aeruginosa* cepa 11PS, que mejoraron el contenido de nitrógeno en las plantas de alfalfa (Chamizo, A., et al., 2009).

Cabe recalcar, que aunque los valores de nitrógeno encontrados en el sustrato (en forma de NH_4 y NO_3) fueron deficientes en todos los tratamientos (ver Anexo C) en general se puede observar que la co-inoculación incrementó la absorción de N en un nivel suficiente para el normal desarrollo del cultivo (ver Capítulo 3, Tabla 3.8) pudiendo atribuirse este resultado a la incorporación del macroelemento asimilado del suelo en forma de NO_3 , el cual disminuyó en el sustrato de los tratamientos co-inoculados.

Por otra parte en el Anexo C, se muestra que hubo una mayor cantidad de magnesio en el suelo de los tratamientos micorrizados en comparación con la inoculación simple de *P.fluorescens*. Este macroelemento fomenta la absorción de fósforo en la planta, porque tiene un efecto sinérgico cuando la especie tiene un contenido adecuado

de magnesio para su crecimiento, a un pH cercano al neutro, como es el caso del sustrato del presente estudio (que varió entre 6,2 y 6,9) (Kass, Donald, s/a). De acuerdo a este comportamiento entre los dos compuestos, se puede suponer que las micorrizas mejoraron la absorción de P, gracias a que existió un incremento del Mg en el suelo de las plantas micorrizadas, no obstante, no se presentaron diferencias en la absorción de este último elemento a nivel foliar en los tratamientos, encontrándose dentro del rango normal para el cultivo (Anexo B).

Finalmente se muestra que los microelementos: cobre, zinc y boro presentan los valores más altos en los sustratos de las plantas micorrizadas y en aquellas co-inoculadas, de acuerdo a estos resultados se presume que estos microorganismos hacen disponibles estos elementos traza para la absorción vegetal, siendo necesarios en algunos casos, en el estado nutricional de las plantas adultas (Russell, E.J. y Wild, Alan., 1992). Además los autores mencionados, sugieren que la cantidad asimilable dependerá en muchas ocasiones de las condiciones en que se desarrollen las plantas, generalmente se ha observado que aquellas establecidas en suelos contaminados o con suministro inadecuado de nutrientes, tienden a requerir estos elementos. Por todas estas razones, en el presente ensayo, en el que no se presentaron diferencias en la absorción de estos micronutrientes, se piensa que probablemente no son necesarios para los primeros estadios del tomate de árbol (cuatro meses) sino cuando la planta entra en una etapa productiva (Ver Anexo B).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. A partir del muestreo en tres zonas ubicadas en las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua del Ecuador con cultivos de tomate de árbol, se eligió un inóculo inicial de HMA proveniente de Panzaleo (provincia de Cotopaxi) que contenía 0,87 esporas/g, el cual transcurrido tres meses de multiplicación alcanzó 3,64 esporas/g con un porcentaje de colonización del 48%.
2. El inóculo de HMA obtenido en la propagación (de 3,64 esporas/g) se aplicó en un 30% en plántulas de tomate de árbol de 15 días de edad dispuestas en macetas, quedando una disolución final de 1,09 esporas/g en cada una, después de cuatro meses de ensayo se obtuvo 17,63 esporas/g con un porcentaje de colonización de 61,33% en las plantas micorrizadas y en las co-inoculadas entre un rango de 8,33 y 14,20 esporas/g con un porcentaje de infección que varió entre 36% y 60,67%.
3. Las densidades bacterianas de *Pseudomonas* sp. en las cinco zonas muestreadas variaron entre 10^4 y 10^5 UFC/g de raíces y suelo seco, de las cuales se identificaron ocho cepas de *Pseudomonas fluorescens* (dos provenientes de raíces y las restantes del suelo) y se seleccionaron tres cepas: Z2P6, Z5P5 y Z5P6 que presentaron mayor capacidad de solubilizar fosfato inorgánico en el medio de cultivo Pikovskaya.
4. Las cepas seleccionadas Z2P6, Z5P5 y Z5P6 se colocaron en las plantas de tomate de árbol en dos concentraciones: $1,5 \times 10^8$ y $6,0 \times 10^8$ UFC/ml, después de un mes de establecido el ensayo con HMA. Al finalizar el experimento se obtuvo una densidad poblacional entre 10^4 y 10^5 UFC/g de raíces y entre 10^3 y 10^5 UFC/g de suelo seco.

5. El porcentaje de supervivencia fue del 90% (126 plantas) de las cuales aquellas co-inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens* (en concentración de $6,0 \times 10^8$ UFC/ml) presentaron el mejor crecimiento del tomate de árbol, aumentando la altura en 1 vez, área foliar en 2, biomasa aérea y peso radicular en 3 veces respecto los controles. Con esto se comprobó la hipótesis planteada, demostrando que la inoculación dual mejoró el crecimiento y nutrición de las plantas.

6. Las plantas micorrizadas y co-inoculadas con HMA y *P.fluorescens* cepa Z5P6 evidenciaron una mayor absorción de los nutrientes fósforo y nitrógeno, en contraste con las plantas control y aquellas con inoculación simple de rizobacterias, debido a la capacidad que presentan los microorganismos para descomponer la materia orgánica, logrando movilidad y mayor asimilación de nutrientes.

7. El sustrato de las plantas micorrizadas y co-inoculadas con HMA y *P.fluorescens* alcanzaron niveles normales de fósforo en comparación con las inoculadas con rizobacterias y las controles que presentaron valores deficientes; el nitrato fue deficiente en todos los tratamientos, sin embargo fue mayor en los tratamientos con micorrizas y co-inoculados; el magnesio estuvo dentro del rango normal existiendo una mayor cantidad en el suelo tratado con micorrizas en relación al que poseía inoculación simple de *P.fluorescens* y del control.

8. Finalmente se mostró que los microelementos: cobre, zinc y boro estuvieron dentro de los rangos óptimos en el suelo para el desarrollo del tomate de árbol, sin embargo, los valores más altos se presentaron en los sustratos de las plantas micorrizadas y en aquellas co-inoculadas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Realizar otros ensayos a nivel de invernadero con mayor número de repeticiones por tratamiento, para verificar si existe un incremento significativo en las variables de crecimiento de las plantas con interacción entre los HMA y la cepa Z5P6 de *P.fluorescens*, en un período más prolongado de establecimiento del ensayo.
2. Sería necesario medir las variables de producción del cultivo a nivel de campo para determinar los beneficios de la aplicación de estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal en cuanto a su rendimiento.
3. Evaluar la contribución de los microorganismos (HMA y *Pseudomonas fluorescens*) en el control biológico de patógenos radicales (nematodos) y del filoplano (*Colletotrichum gloeosporioides*) del cultivo de tomate de árbol, a fin de conocer los posibles mecanismos de protección en las especies.
4. Determinar la producción del compuesto 2,4DAPG en las cepas de *P.fluorescens* aisladas del cultivo en estudio, debido a que es un antibiótico necesario para la supresión de patógenos radiculares y semillas con infección fúngica.
5. Identificar las especies de HMA que formaron el consorcio aplicado en el ensayo, a fin de probar el comportamiento de cada una en particular cuando es aplicada en forma independiente o en interacción con *P.fluorescens* sobre el desarrollo y nutrición de las plantas de tomate de árbol.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato R. (1999). Manejo de la Micorriza Arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. TERRA Latinoamericana. Volumen 17. Número 003. Universidad Autónoma Chapingo. México. p 179-191.
- Antoun, H. and Prévost D. (2005). Biocontrol and Biofertilization. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Netherlands. Springer, p1-38.
- Arines J., Porto M. E. and Vilariño A. (1992). Effect of manganese on vesicular-arbuscular mycorrhizal development in red clover plants and on soil Mn-oxidizing bacteria. Mycorrhiza 127:131.
- Arvind G., Praveen, R. and Pratibha, V. (2007). Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas. Curr Microbiol, 56:73–79.
- Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S. and. Vivanco J. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. The Annual Review of Plant Biology 57: p233–66.

- Bajsá Natalia. (2008). Efecto del pastoreo bovino sobre la comunidad bacteriana en el suelo de pradera natural. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Barea, J. M.; Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (1983). Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non acidic soils. 3rd International Congress on Phosphorus Compounds
- Barea, J.M. y Azcón C. (2002). Técnica de elaboración y control de calidad de inoculantes micorrizicos. En: Memorias Curso de Inoculantes Biológicos. Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidin, CSIC, Granada, España.
- Bonfante, Paola and Anca, Lulia-Andra. (2009). Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. Annual Review of Microbiology. 63: p 363-383. En línea: <http://www.microbiologybytes.com/blog/2009/12/02/plants-mycorrhizal-fungi-and-bacteria-a-network-of-interactions/>
- Bowers J.H. and Parkea J.L. (1993). Colonization of pea (*Pisum sativum L.*) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: Effect of soil temperature and bacterial motility.
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol. 154, p 275-304.

- Chamizo, A.; Ferrera-Cerrato, R.; González-Chávez, M. C.; Ortiz-Solorio, C. A.; Santizo-Rincón, J. A.; Varela, L. y Alarcón, A. (2009). Inoculación de alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. TERRA Latinoamericana, Volúmen. 27, Número.3, p. 197-205.

- Cuesta I., Ferrer A. y Rengifo E. (2004). Importancia de la inoculación dual de bacterias y *Glomus mosseae* sobre crecimiento y micorrización de plántulas de *Swietenia macrophylla* x *Mahagoni*. Revista Forestal Baracoa, 23: p 67-72.

- Edi-Premono, M.A. Moawad, and Vleck P.L.G. (1996). Effect of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian J. Crop Sci., 11: p13-23.

- Ferrera, R. y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible, Ciencia Ergo Sum, 8: p175-183.

- Forbes B, Sahn D, Weissfeld A, Bailey & Scott. (2004). Diagnóstico microbiológico. 11a Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. p 218.

- Garbaye J. (2007). Helper Bacteria: A New Dimension to the Micorrhizal Symbiosis. 128: p128-207.

- García, S. (2006). Efectos de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate (*Solanum esculentum*).

- Goldman, Emanuel and Green, Lorrence H. (2008). Practical handbook of microbiology. 2nd ed. Chapter 18. The Genus *Pseudomonas* sp. p231-240.

- Hernández, A., Heydrich, M., Velásquez del Valle, M. y Hernández, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. Revista Mexicana de Fitopatología. ISSN: 0185-3309 Vol 24. p 42-49.

- Herrera-Peraza R, Furrázola E, Ferrer R, Fernández R. and Torres Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 35: p113-123.

- INIAP (2004). Editores: León, J., Viteri, P. y Cevallos, Guillermo, C. Manual No. 61. Quito- Ecuador.

- INIAP. (2008). Editores: Villavicencio, Aida y Vásquez, Wilson. Guía técnica de cultivo. Manual No. 73. Quito-Ecuador.

- International Federation of Organic Agriculture Movements. IFOAM. (2011). En línea: <http://www.ifoam.org>

- Jaizme Vega M. C. y Rodríguez Romero, A. (2008) Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y Bacterias rizosféricas) en Agrosistemas de las Islas Canarias, Agroecología 3: 33-39.

- Kass, Donald (s/a) Fertilidad de suelos. Capitulo 2 Nutrientes en el suelo. p 12 En línea:
http://books.google.com.ec/books?id=sRua411JhvgC&pg=PA12&dq=magnesio+presente+en+el+suelo+por+parte+de+las+micorrizas&hl=es&sa=X&ei=NfKFT_faM42Etgfr_6nzBw&ved=0CDYQ6AEwAg#v=onepage&q=magnesio%20presente%20en%20el%20suelo%20por%20parte%20de%20las%20micorrizas&f=false

- Klironomos J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:9 2292-2301.

- Kothamasi, D., Chander, R. and Babu, C.R (2001). Arbuscular mycorrhizae in plant survival strategies. *Tropical Ecology* 42(1): 1-13.

- Kumar Choudhary D., Prakash A., Wray V y Johri B. (2009). Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Current Science*, Vol 97, N° 2.25, p 170-179.

- Loredó, O., López, C. y Espinosa V. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Revisión *TERRA Latinoamericana*, Vol 22, N°2, p 255-239.

- Mac Faddin Jean F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Panamericana Pp 73-346

- MGAP. (2009). MAGAP/SIGAGRO/ANÁLISIS SECTORIAL. Extraído de:
http://www.magap.gob.ec/sinagap/spr/spr_tomatearbol.htm

- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J. M., Mazurier, S. y Lemanceau, P. (2001). Involvement of nitrate reductase and Pyoverdine in competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 in soil. Appl. Environ. Microbiol. Vol 67 p 2627-2635.

- Ogata, Katty y Zuñiga Doris. (2008). Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco. *Zonas áridas* 12:1 p 91-208.

- Palleroni, N. J. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Vol 2, Part B). New York: Springer, 323-370.

- Paredes-Mendoza, Marianela y Espinosa-Victoria, David. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. TERRA Latinoamericana. Vol. 28 N°1, p61-67.

- Parniske, Martín. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology, Vol6: p763-773.

- Phillips, J & Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mychorrizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc 55: 158-161.

- Pilco Carillo J. (2009). Evaluación de dos formulaciones químicas a base de N-P-K para el crecimiento y desarrollo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) p11-19.

- Popavath R., Gurusamy R., Kannan B. y Natarajan S. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil

- Quilambo, Orlando. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12), p539-546.

- Ramírez, A y Mijangos, A. (2000). Efectos Nocivos Provocados por el Uso de Plaguicidas en la Fauna Silvestre de México y sus Consecuencias Ecológicas. Extraído de: <http://www.ambiente-ecologico.com/revist54/ramire54.htm#top>

- Raven, Peter H., Evert Ray F y Eichhorn, Susan E. (1992). Biología de las plantas. Volumen 2. Capítulo 26, p 526-528. Editorial Reverté, S.A.

- Rivera, R., Fernández, F., Hernández A. Martin J., y Fernández K. (2003). El manejo eficiente de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible Estudio de caso: El Caribe. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. INCA. ISBN: 959-7023-24-5, p 4-5.

- Russell, E.J. y Wild, Alan (1992). Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Elementos nutritivos necesarios para las plantas cultivadas. p 74-75.

- Saharan, B.S. y Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. LSMR-21.

- Smith, S. E. and Read, D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press.p85-95.
- Soria N., Padilla F. y Larrea G. (2008). Guía para el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) Convenio ESPE – Municipio de Pillaro. p1-23.
- Staley, T.E., Lawrence, E.G., and Nance, E.L. (1992). Influence of a plant growth-promoting pseudomonad and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on alfalfa and birdsfoot trefoil growth and nodulation. Biology and Fertility of Soils, 14: p175-180.
- Summer, Malcome E. (2000). Handbook of Soil Science. CRC Press. Microbially Mediated Processes. p 95- 101.
- Varma, Ajit. (2008). Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics. Springer, Third edit. p 600-615.
- Vidhyasekaran, P. (2004). Concise encyclopedia of plant pathology. Food Products Press &. Haworth Reference Press of Haworth Press, p246-252.