

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**CARRERA DE AGRÍCOLA**

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO INGENIERO AGRÍCOLA**

**MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL TOMATILLO  
(*Lycopersicon pinpinelifoluim* L.) COMO PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL**

**AUTORES:**

**INTRIAGO QUINTANA JOSÉ ANDRES  
PLAZA AVELLAN IGNACIO ENRIQUE**

**TUTOR:**

**ING. ÁNGEL GUZMÁN CEDEÑO, PhD**

**CALCETA, JULIO 2020**

## DERECHOS DE AUTORÍA

**IGNACIO ENRIQUE PLAZA AVELLAN Y JOSÉ ANDRES INTRIAGO QUINTANA**, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



---

**IGNACIO ENRIQUE PLAZA AVELLAN**

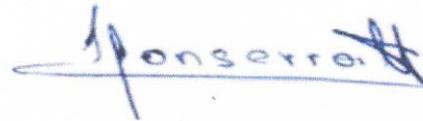


---

**JOSÉ ANDRES INTRIAGO QUINTANA**

## CERTIFICACIÓN DE TUTOR

**ING. ÁNGEL GUZMÁN CEDEÑO, PhD**, certifica haber tutelado el trabajo de titulación “**OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL TOMATILLO (*Lycopersicon pinpinelifolium* L.) COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL**”, que ha sido propuesto, desarrollado y defendido por **IGNACIO ENRIQUE PLAZA AVELLAN Y JOSÉ ÁNDRES INTRIAGO QUINTANA**, previo la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

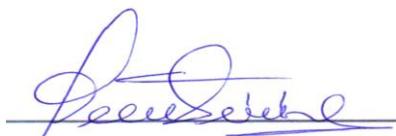


---

**ING. ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO, PhD**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación “**OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS DEL TOMATILLO (*Lycopersicum pinpinelifolium* L.) COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL**”, que ha sido propuesto, desarrollado y defendido por **IGNACIO ENRIQUE PLAZA AVELLAN Y JOSÉ ÁNDRES INTRIAGO QUINTANA**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



---

ING. FREDDY WILBERTO MESIAS GALLO. Mg  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

ING. LUIS ENRIQUE PARRAGA MUÑOZ. Mg  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

ING. GONZALO CONSTANTE TUBAY. Mg  
**PRESIDENTE**

## AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día; Al Ing. Ángel Guzmán Cedeño, PhD por habernos guiado de manera muy correcta en nuestra tesis. Al Ing. Diego Zambrano Pazmiño por ser nuestro cotutor en todo el proceso y desarrollo de la tesis.

A nuestros padres por todo el apoyo brindado durante todo este proceso y que son nuestros pilares fundamentales día a día.

A nuestros profesores por brindarnos las herramientas necesarias y adecuadas para nuestro crecimiento profesional e individual.

Y finalmente a nuestros familiares, amigos y demás personas que nos motivaron a lo largo de nuestra carrera con su apoyo incondicional.

Ignacio Enrique Plaza Avellan y José Andrés Intriago Quintana

*Autores*

## DEDICATORIA

Dedicamos nuestro proyecto de tesis a Dios quien ha sido nuestro guía y fortaleza durante todo este tiempo.

A nuestros padres quienes con su amor, paciencia y esfuerzos nos permitieron llegar a cumplir las metas propuestas, por ser quienes nos han guiado por el camino del bien y nos inculcaron desde pequeño el sentido de la responsabilidad y el esfuerzo.

Ignacio Enrique Plaza Avellan y José Andrés Intriago Quintana

*Autores*

## TABLA DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTORÍA.....	i
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORÍA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
TABLA DE CUADROS Y FOTOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento y formulación del problema.....	1
1.2 Justificación .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo general .....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Hipótesis .....	3
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
2.1 Generalidades de las bacterias .....	2
2.1.1 Morfología de las bacterias.....	2
2.1.2 Función de las bacterias dentro de las plantas .....	5
2.1.3 Mecanismos de acción de las bacterias.....	6
2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	8
2.2.1 Mecanismo de promoción indirecta .....	9
2.2.2 Mecanismo de promoción directa .....	10
2.2.3 Importancia de las bacterias endofitas en los cultivos agrícola .....	10
2.2.4 Referencias de las bacterias endofitas en los cultivos .....	10
2.3 Inoculación.....	12
2.3.1 Ventajas de la inoculación .....	12
2.3.2 Tipos de inoculación .....	13
2.4 Materiales e insumos a usar en el estudio .....	13

2.4.1	Sustratos .....	13
2.4.2	Géneros de bpcv .....	14
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO .....		16
3.1	Ubicación .....	16
3.2	Características climáticas <sup>1</sup> .....	16
3.3	Duración del trabajo .....	16
3.4	Obtención de bacterias endófitas .....	16
3.4.1	Aislamiento bacteriano .....	17
3.4.2	Tinción de gram .....	17
3.4.3	Prueba de hemólisis .....	18
3.4.4	Solubilización de fosfato .....	18
3.4.5	Producción de sideróforo .....	18
3.4.6	Crecimiento en condiciones sin fuente de nitrógeno .....	18
3.4.7	Supervivencia a diferentes condiciones de ph .....	19
3.4.8	Supervivencia a diferentes temperaturas .....	19
3.5	Evaluación de las bacterias aisladas y seleccionadas .....	20
3.5.1	Delineamiento experimental .....	20
3.5.2	Unidad experimental .....	22
3.5.3	Manejo del experimento .....	22
3.5.4	Variables evaluadas .....	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		25
4.1	Aislamiento obtenido y densidad poblacional .....	25
4.2	Tinción de gram .....	25
4.3	Solubilización de fosfato .....	27
4.4	Producción de siderofoforo .....	29
4.5	Crecimiento en condiciones sin fuente de nitrógeno .....	30
4.6	Prueba de hemólisis .....	30
4.7	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de tomate .....	31
4.8	Supervivencia a diferentes condiciones de ph y temperatura .....	32
4.9	Evaluación de las bpcv aisladas y seleccionadas .....	34
4.9.1	Altura de planta .....	34
4.9.2	Longitud de raíz .....	34
4.9.3	Peso fresco parte aérea y raíz .....	35

4.9.4	Peso seco parte aérea y raíz .....	35
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		37
BIBLIOGRAFÍAS		
ANEXOS		

## TABLA DE CUADROS Y FOTOS

### Cuadros:

3.1.	Niveles de los factores. ....	20
3.2.	Descripción de los tratamientos y sus respectivos códigos. ....	21
3.3.	Esquema de ADEVA. ....	21
4.1.	Aislamiento obtenido de raíces y tallos en plantas de tomatillo. ....	25
4.2.	Tinción de gram y morfología de las bacterias .....	26
4.3.	Solubilización de fosfato.....	27
4.4.	Índice de solubilización a las mejores bacterias. ....	28
4.5.	Descripción de los códigos y la medición del halo. ....	29
4.6.	Prueba de hemólisis en bacterias endófitas. ....	31
4.7.	Evaluación a diferentes condiciones de pH. ....	32
4.8.	Evaluación a diferentes condiciones de temperatura. ....	33
4.9.	Ánisis de varianza para las variable evaluadas. ....	34
4.10.	Analisis de las variables evaluadas segun tukey. ....	35

### Fotos:

4.1.	Morfologías macroscópicas de bacterias endófitas. ....	26
4.2.	Morfologías microscópicas de bacterias endófitas. ....	26
4.3.	Solubilización de fosfato en agar Pikovskaya. ....	28
4.4.	A y B, resultados con hemólisis beta. ....	31
4.5.	Potencial promotor del crecimiento en la germinación alto. ....	32
4.6.	Potencial promotor del crecimiento en la germinación bajo .....	32

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”), con el objetivo de obtener bacterias endófitas del tomatillo como promotoras de crecimiento vegetal. El trabajo tuvo dos fases: la primera fue de laboratorio, consistió en el aislamiento, caracterización y evaluación *in vitro* de las bacterias endófitas en condiciones de estrés, que permitió obtener cuatro bacterias (CaP41R-5, ChoP3R-5, QuiP2R5-8 y EstP4T6) como promotoras del crecimiento vegetal. La segunda fase consistió en determinar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las bacterias aisladas y seleccionadas en plantas de tomate. Los factores en estudio fueron los aislados endófitos bacterianos y tipos de sustratos (Convencional y orgánico), los sustratos fueron esterilizados, las unidades experimentales fueron macetas para vivero con semillas de tomate variedad Margot F1, las variables evaluadas fueron: altura de planta (cm), longitud de raíz (cm), peso fresco parte aérea y raíz (g) y peso seco parte aérea y raíz (g). Se concluye que la evaluación de las bacterias endófitas como promotoras de crecimiento vegetal en plantas de tomate actuaron por igual, sobre las variables evaluadas; aunque se observó mejor comportamiento en el suelo convencional probablemente se deba a que podría existir una mayor cantidad de nutrientes para la planta debido a que es una área con mayor explotación a diferencia del suelo orgánico. Sin embargo, estos ensayos son promisorios y resultaría necesario continuar realizando estudios que permitan conocer la respuesta de la planta a estos microorganismos en ambientes productivos.

**Palabras clave:** Endófito, Pikovskaya, sideróforo, bioinoculantes, biofertilizantes.

## ABSTRACT

This research work was carried out in the Molecular Biology laboratory of the Veterinary Medicine degree at ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”), with the aim of obtaining endophytic bacteria from tomatillo as growth promoters vegetable. The work had two phases: the first was in the laboratory, consisting of the isolation, characterization and in vitro evaluation of endophytic bacteria under stress conditions, which allowed obtaining four bacteria (CaP41R-5, ChoP3R-5, QuiP2R5-8 and EstP4T6) as promoters of plant growth. The second phase consisted of determining the plant growth promoting effect of the isolated and selected bacteria in tomato plants. The factors under study were the bacterial endophytic isolates and types of substrates (Conventional and organic), the substrates were sterilized, the experimental units were nursery pots with tomato seeds of the Margot F1 variety, the variables evaluated were: plant height (cm) , root length (cm), fresh weight aerial part and root (g) and dry weight aerial part and root (g). It is concluded that the evaluation of endophytic bacteria as promoters of plant growth in tomato plants acted equally, on the evaluated variables; although better behavior was observed in conventional soil, it is probably due to the fact that there could be a greater amount of nutrients for the plant because it is an area with greater exploitation, unlike organic soil. However, these tests are promising and it would be necessary to continue carrying out studies that allow knowing the response of the plant to these microorganisms in productive environments.

**Key words:** Endophytes, Pikosvkaya, Siderophor, bionoculants, conventional, promotion, pots.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Para incrementar la producción de alimentos se ha recurrido a la denominada “Agricultura intensiva”, este modelo de agricultura se caracteriza por un alto consumo de los insumos, laboreo excesivo del suelo, baja o nula incorporación de materia orgánica, monocultivos, y la falta de biodiversidad en el suelo lo cual provoca bajos rendimientos en los cultivos (INTAGRI, 2013).

Una práctica muy común dentro de la agricultura intensiva es el uso de fertilizantes de síntesis química, para asegurar el desarrollo de las plantas cultivadas, estos aportan sustancias químicas que actúan como reguladores del crecimiento (mediante un mecanismo hormonal) y como nutrientes. Sin embargo, el alto suministro de estos insumos a los cultivos provoca la degradación del suelo, lo cual se ha convertido en un riesgo por su repercusión en la baja producción de los cultivos (Malfanova, 2013).

En Latinoamérica la pérdida de biodiversidad se la atribuye a la transformación y la sobre explotación de hábitats y ecosistemas naturales, la deforestación, los incendios forestales, la actividad agrícola, el cambio climático, la contaminación, la introducción de especies invasivas, la urbanización, la minería, la destrucción de humedales y zonas de páramo, la erosión, los desastres naturales, el desconocimiento del potencial estratégico de la biodiversidad, la débil capacidad institucional para reducir el impacto de las actividades que generan pérdida de biodiversidad, y la expansión de la frontera agropecuaria (Andrade, 2011).

Por otra parte, Ecuador ha sido víctima de la biopiratería por parte de científicos, empresas y países que hace décadas han sustraído información genética de la flora y fauna del país, con lo cual han creado productos que se aprovechan en el mundo, no así las ganancias y menos el conocimiento (El Telégrafo, 2016). Entre las aplicaciones biotecnológicas desarrolladas a partir

de organismos autóctonos están los biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), que, aplicados al suelo o planta, son una alternativa ecológica para la producción de cultivos agrícolas, reduciendo la aplicación de fertilizantes sintéticos y de agroquímicos que deterioran el ambiente (Espinosa, 2016). Por lo expuesto se plantea la siguiente interrogante ¿Las bacterias endófitas obtenidas del tomatillo (*Lycopersicon pinpinelifolium* L.) ejercen como promotoras de crecimiento vegetal en plantas de tomate a nivel de vivero?

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Según Tester y Langridge (2010) se debe incrementar y mejorar la calidad de los alimentos producidos, pero sin afectar el medio ambiente y con un ingreso reducido de hormonas químicas y fertilizante a los sistemas de producción. Esta intención ha generado un creciente interés por el uso de microorganismos como alternativas sostenibles y económicas frente a los agroquímicos (Malfanova, 2013). Por lo tanto, la selección de microorganismos endófitos como promotores de crecimiento juegan un papel importante en la planta, ya que al asociarse con ellas les permiten: por una parte, aumentar su crecimiento y desarrollo y, por otra, las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Del Puerto, Gonzales, López, Ortiz y Pinaso, 2014).

Actualmente, la eliminación de hábitats naturales es la principal causa de la pérdida de biodiversidad y de sus múltiples beneficios que podrían aportar para la salud pública. En este sentido, la Constitución del Ecuador del 2008 declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados. Así mismo el protocolo de Nagoya reconoce la importancia de los recursos genéticos para la seguridad alimentaria, la salud pública, la conservación de la diversidad biológica, la mitigación del cambio climático y la adaptación a este (Ministerio del Ambiente de Ecuador e Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual, 2018).

El estado de arte reconoce que, dentro de los microorganismos endófitos, existe agentes potenciales generadoras o promotoras de crecimiento, logrando identificar géneros de bacterias que se vienen aplicando en sistemas de producción orgánicos con resultados satisfactorio. Al respecto Sánchez *et al.*, (2012) han validado las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, aseverando que representan una alternativa limpia y segura para garantizar la producción en la agricultura sostenible, ya que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química.

Por los antecedentes anotados, esta investigación se encuentra inmersa dentro de las iniciativas de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López y del grupo Investigación PROINBIO cuyos miembros buscan desarrollar, adoptar y adaptar tecnologías biológicas que conduzcan al aprovechamiento eficiente de la biodiversidad en los sistemas de producción agropecuarios.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener bacterias endófitas a partir del tomatillo (*Lycopersicon pinpinelifolium* L.) que sean promotoras de crecimiento vegetal.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar bacterias promotoras de crecimiento vegetal.
- Evaluar la supervivencia in vitro de las bacterias endófitas bajo condiciones de estrés.
- Determinar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las bacterias endófitas en plantas de tomate a nivel de macetas.

### **1.4 HIPÓTESIS**

Las bacterias endófitas aisladas del tomatillo son promotoras del crecimiento vegetal de las plantas de tomate a nivel de macetas.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS**

Las bacterias son referentes al reino procariota, además son microorganismos capaces de reproducirse mediante fisión binaria, replicando al mismo tiempo su ADN, de esta manera, cada célula hija tendrá el mismo genoma. Por otro lado estas células presentan una estructura similar a las eucariotas puesto que tienen una membrana celular y ribosomas que contienen la información genética (Tatiana y Alvin, 2014).

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesario para su desarrollo y crecimiento (Pírez y Mota, 2006).

Según Dos Santos (2005) las bacterias son una colección de diversos microorganismos procariotas que poseen diferentes morfologías y fisiologías. Unas son fotosintéticas, como las cianobacterias, que obtienen energía de la luz solar y carbono del dióxido de carbono de la biomasa; otras obtienen energía del metabolismo de compuestos inorgánicos como el amonio y el sulfuro.

Estos microorganismos bacterianos son observados a través de un microscopio óptico o electrónico con una adecuada tinción puesto que son incoloras, también pueden ser vistas sin tinción, siendo colocadas en soluciones no acuosas para aumentar el índice de refracción (Tatiana y Alvin, 2014).

#### **2.1.1 MORFOLOGÍA DE LAS BACTERIAS**

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular, estas se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Pírez y Mota, 2006).

Tatiana y Alvin (2014) mencionan que las bacterias reciben diferentes nombres según su forma:

- **Cocos:** Presentan formas casi esféricas y sus agrupaciones son homogéneas. El tamaño oscila entre los 0,8 a 1,0 mm. y puede presentar diversas formas, producto de dos factores importantes como son la tendencia de las células a mantenerse unidas, una vez sucedida la división y el o los planos de división celular. Estas agrupaciones pueden ser: Diplococos, Tétradas, Estreptococos, Estafilococos.
- **Bacilos:** Estas bacterias forman agrupaciones bastante heterogéneas por su variedad de subtipos morfológicos, que pueden ser cilíndricos, en forma de bastón, largos y delgados, pequeños y gruesos, también pueden presentar variaciones en sus extremos pudiendo ser rectos, afilados o redondeados. Estas agrupaciones pueden ser: Diplobacilos, Estreptobacilos, Empalizado, Formas filamentosas.
- **Espirilos:** Dentro de este tipo de bacterias se encuentran aquellas que en su forma presentan una o más curvaturas, algunas pueden presentar forma de hélices.

### 2.1.2 FUNCIÓN DE LAS BACTERIAS DENTRO DE LAS PLANTAS

Las bacterias están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epifitas, endófitas, simbióticas y antagónicas. La mayoría de bacterias forman asociaciones íntimas con las plantas y forman grupos diversos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Las bacterias asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización. Algunos aspectos importantes de la diversidad de bacterias en el ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen (Pérez, Santana, Capó, Martín y Gutiérrez, 2010).

### 2.1.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BACTERIAS

Los mecanismos de acción de las bacterias son variados y se pueden clasificar de manera general, en extracelulares, que ocurren en el exterior de la rizósfera; en los espacios entre células del córtex de la raíz, o intracelulares. Según su acción se dividen principalmente en dos tipos: Directos e indirectos. La diferencia principal es que los mecanismos indirectos ocurren fuera de la planta, mientras que los directos ocurren dentro de ella y afectan directamente a su metabolismo a través de la modificación de la expresión de genes (Benjumeda, 2017).

Algunas bacterias producen un efecto directo que consiste en un aumento en la movilización de nutrimentos solubles, seguido por el mejoramiento de absorción de las plantas, la producción de antibióticos para hongos, bacterias y virus y de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno) (Díaz, Ferrera, Almaraz y Alcantar, 2001). También provocan efectos indirectos que incluyen el aumento de fijación de  $N_2$ , al mejorar el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa, los cuales inducen resistencia sistémica a la planta.

#### ➤ MECANISMOS DE ACCIÓN DIRECTOS

Las bacterias le proporcionan a la planta compuestos sintetizados por ella misma, y le produce así un beneficio a la planta. Estos compuestos pueden ser nitrógeno, hormonas del crecimiento y ciertos nutrientes como hierro o fósforo, provenientes del entorno rizosférico (Dos Santos, 2005).

- **Fijación biológica de nitrógeno:** La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ). Este proceso es exclusivo de algunas bacterias, denominadas bacterias diazotróficas (Loredo, López y Espinosa, 2015).
- **Solubilización de fosfatos:** El fósforo es uno de los nutrientes limitantes del crecimiento de las plantas. Dentro de las funciones que se le han atribuido, se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de

energía, además de formar parte de macromoléculas tales como, ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática (Tejera, Rojas y Heydrich, 2011).

Sigue expresando que una gran cantidad de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo de forma inaccesible para la planta.

- **Producción de fitohormonas:** La fito estimulación es considerada el mecanismo más estudiado de las bacterias endófitas siendo las fitohormonas y algunos compuestos volátiles los responsables de este mecanismo promotor de crecimiento (Molina *et al.*, 2015).

Sigue manifestando que las fitohormonas son moléculas orgánicas que regulan la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo vegetal, estos compuestos son sintetizados en diferentes estructuras de la planta y su acción varía en función de los cambios ambientales que modifican la expresión génica del organismo. Las principales fitohormonas son auxinas, giberelinas y citoquininas.

#### ➤ **MECANISMOS DE ACCIÓN INDIRECTOS**

Estas bacterias protegen a las plantas de microorganismos fitopatógenos como pueden ser otras clases de bacterias u hongos. Estos agentes fitopatógenos causan numerosas enfermedades en los campos de cultivo provocando grandes pérdidas económicas. Estas epidemias son muy difíciles de combatir. Hasta ahora se combatían a base de plaguicidas químicos como órganos fosforados y carbamatos, entre otros con el consiguiente problema de acumulación en el medio natural, además de su poca especificidad (Dos Santos, 2005).

Estos métodos implican una alternativa con un gran potencial porque suponen un importante método de control biológico y su utilización como herramienta biotecnológica parece una esperanzadora realidad que reduzca los impactos

adversos de agroquímicos, y permita una gestión más razonable y sostenible de los recursos agrícolas y forestales.

- **Producción de sideróforos:** El hierro es un nutriente esencial para las plantas. Actúa como cofactor en una serie de procesos importantes como respiración, fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. Es muy abundante por lo general en suelos, pero su especie química predominante es el ión  $Fe^{+3}$ , forma que reacciona para dar óxidos e hidróxidos que son insolubles y por tanto inaccesibles para las plantas y los microorganismos (Benjumeda, 2017).
- **Producción de antibióticos:** La producción de compuestos antimicrobianos es muy común entre las bacterias y hongos. Estos compuestos son sintetizados y excretados, en muchos sistemas de control biológico, los antibióticos desempeñan un papel importante en la supresión de enfermedades. Además, se han realizado estudios moleculares que han sido efectivos para determinar esta capacidad presente en algunas bacterias, debido a la fácil obtención de mutantes defectivos en la producción de estos compuestos (Tejera *et al.*, 2011).
- **Producción de quitinasa y glucanasa:** Uno de los mayores mecanismos de biocontrol que poseen las bacterias endófitas se basa en la producción de estas enzimas líticas, encargadas de degradar la pared celular de organismos patógenos fúngicos. Enzimas secretadas como la  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa, ejercen un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de las hifas de hongos patógenos. Bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son capaces de producir este tipo de sustancias (Benjumeda, 2017).

## 2.2 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal establecen relaciones con los cultivos que difieren en el nivel de interacción con las plantas, y estas pueden

ser asociativas y/o simbióticas. Por otro lado, en la última década ha surgido un interés creciente hacia los microorganismos endófitos, los cuales al estar menos afectados por el estrés ambiental y más aclimatados con su hospedero podrían presentar una mayor ventaja ecológica. "Endófito" es un término topográfico global que incluye a todos los organismos que cumplen una parte o todo su ciclo de vida en el interior de los tejidos y viven y se nutren de sus hospedantes sin producir síntomas de enfermedad. (Glick *et al.*, 1999; Sturz y Nowak, 2000 y Yanni *et al.* 2011 citados por Regueira, 2018).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, tienen la capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y nutrientes, incremento en el volumen de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagonicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo *et al.*, 2015).

En las bacterias que promueven algún beneficio a las plantas se pueden determinar dos tipos de relaciones: las que forman una relación simbiótica con la planta y aquellas de vida libre o asociativas al suelo que se encuentran en el suelo, pero a menudo viven cerca, o incluso dentro de las raíces de las plantas, y que pueden mejorar la calidad o el grado de crecimiento son referidas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Milla, 2007).

### **2.2.1 MECANISMO DE PROMOCIÓN INDIRECTA**

La promoción indirecta del crecimiento se produce cuando las BPCV disminuyen o previenen los efectos deletéreos producidos por microorganismos fitopatogenos. Los mecanismos responsables de este biocontrol incluyen: la competencia por nutrientes, la exclusión de nicho, la producción de metabolitos anti fúngicos (Ezziyani, Sid Ahmed, Pérez, Requena y Candela, 2006).

## 2.2.2 MECANISMO DE PROMOCIÓN DIRECTA

Cárdenas (2005) indica que la promoción directa del crecimiento vegetal se produce cuando:

- Las bacterias endófitas promotoras de crecimiento abastecen a las plantas de compuestos que estimulan su crecimiento (ya sea el vástago o de la raíz).
- Principalmente como fitoreguladores como auxinas y citoquininas.
- Cuando las bacterias facilitan la disponibilidad de nutrimentos para las plantas como fijación del nitrógeno o la solubilización del fósforo.

## 2.2.3 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS ENDOFITAS EN LOS CULTIVOS AGRÍCOLA

Antoun y Prévost (2005) mencionan que las bacterias pueden tener una verdadera historia del éxito en la agricultura sostenible. Se determinan numerosos mecanismos de acción (directos e indirectos) que pueden permitir una producción significativa en el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos. Sin embargo, para que estos inoculantes microbianos tengan un resultado positivo, se tienen que tomar en cuenta una serie de características como la edad de la planta y las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

## 2.2.4 REFERENCIAS DE LAS BACTERIAS ENDOFITAS EN LOS CULTIVOS

- **Efecto de la inoculación en plántulas de *C. Chinense***

El efecto de la interacción entre la inoculación en diferentes concentraciones y en los dos diferentes tipos de suelo (estéril y no estéril) tuvo un efecto en la radiculación (número de raíces secundarias ( $P < 0.001$ ) y terciarias ( $P < 0.0001$ ) así, como en la acumulación de materia seca aérea ( $P < 0.0001$ ) y radicular ( $P < 0.0001$ ) (Canto, Medina y Morales, 2004).

- **Cultivos de trigo inoculados con *Azospirillum brasiliense***

Estos resultados muestran que el tratamiento de inoculación de semillas de trigo con *Azospirillum brasiliense* es una alternativa factible para mejorar la eficiencia de aprovechamiento recursos que hacen al logro de cultivos de alta producción en ambientes representativos de la región pampeana y en escala de producción. La contribución de la inoculación se incrementó en la medida que los ambientes evaluados mostraron menores limitaciones a la producción del cultivo (Díaz, Baliña, Fernández y Peticari, 2006).

- **Inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Al analizar el número de semillas germinadas en cada tratamiento, se observa que no existieron diferencias estadísticas significativas entre las variantes evaluadas, no obstante, existe una tendencia al incremento de este parámetro en los tratamientos inoculados (Gutiérrez, Navarro y Canino, 2003).

Siguen mencionando que estos resultados obtenidos se deben fundamentalmente a las altas producciones de fitohormonas por estas bacterias, principalmente mediante la inoculación combinada (*Rhizobium/Azotobacter Rhizobium/Azospirillum*) y la inoculación de *Azospirillum*, las cuales pueden sintetizar ácido indolacético, giberelinas y citoquininas.

- **Inoculación de bacterias en tomate**

La inoculación de las plantas de tomate con las cepas *Enterobacter* sp TVL-2 y *P. putida* PSO14 exhibe un gran potencial para estimular el crecimiento y la producción de este cultivo. El uso de este tipo de bacterias, pueden ser una alternativa prometedora como biofertilizantes para el cultivo de tomate y la producción en la agricultura sostenible teniendo en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química (Sánchez *et al.*, 2012).

Sigue indicando que podrán reducir los costos de producción al requerirse la mitad de la dosis de fertilizante químico, que al ser suplementado con la fertilización bacteriana permite obtener los mismos resultados. Por tanto, la inoculación con estos microorganismos promotores de crecimiento vegetal representa una alternativa limpia y segura para asegurar la fertilización de los cultivos sin incurrir en los costos ambientales y económicos de la fertilización química tradicional.

## **2.3 INOCULACIÓN**

Es el proceso de diseminar microorganismos adecuados proporcionando al suelo, semilla, o cultivo de una elevada población, que sea capaz de multiplicarse en la rizósfera de la plántula. El éxito de la inoculación depende de la calidad de inoculante, así de las bacterias introducidas deben tener requisitos de eficiencia, competencia, sobrevivencia y agresividad (Mondimo, 2012).

Rodríguez, Chávez, García y Benavides (2013) mencionan que los cultivos inoculados con BPCV generan cierta resistencia a sequía, salinidad o deficiencia nutricional debido al aumento del desarrollo radical a través de las fitohormonas (auxinas y citocininas) que tienen efectos positivos en las plantas.

### **2.3.1 VENTAJAS DE LA INOCULACIÓN**

Cano (2011) manifiesta las ventajas de la inoculación:

- Aseguran la provisión de bacterias para nutrir tempranamente al cultivo y maximizar su producción
- Permite la sobrevivencia de la bacteria en condiciones reales de campo.
- La elección a tiempo de un método de inoculación permite un uso más eficiente del inoculante, debido a que tiene una duración limitada y la posibilidad de sufrir contaminantes.

### 2.3.2 TIPOS DE INOCULACIÓN

Expresa Vargas (2010) los tipos de inoculación que se emplean en los cultivos agrícolas:

- **Inoculación al suelo:** Se emplea para cualquier tipo de cultivo, aunque preferiblemente para semillas que no se pueden impregnar, como plantas de semillas muy pequeñas.

La inoculación al suelo tiene la ventaja de introducir una población mayor de bacterias que la inoculación a la semilla, existiendo la posibilidad de que la mayoría de ellas sean efectivas. Esta puede ser líquida o sólida; sin embargo, la inoculación líquida al suelo es la más importante, porque al estar la bacteria en condiciones húmedas al suelo, aumenta su sobrevivencia siempre que sea a temperatura baja.

- **Inoculación a la semilla:** Se emplea para semillas de arroz, maíz, sorgo, etc. Este método aporta entre  $10^3$  y  $10^7$  UFC/semilla en dependencia del tamaño de la semilla. La inoculación más adecuada para el maíz es 250 mL de UFC/25 kg de semilla y 10 g de UFC/kg de semilla.

## 2.4 MATERIALES E INSUMOS A USAR EN EL ESTUDIO

### 2.4.1 SUSTRATOS

El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de microorganismos y en las partículas que lo forman se desarrollan micro colonias. La actividad microbiana del suelo es limitada por los sustratos orgánicos; así mismo el deterioro de la fertilidad de los suelos se asocia a la disminución de los niveles de materia orgánica. Por lo que se considera sustrato, a los materiales sólidos y porosos de origen natural o sintéticos, que solos o combinados garantizan un adecuado crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales controladas (Sarzos y Emilia, 2014).

## 2.4.2 GÉNEROS DE BPCV

- *Pseudomonas spp*

Estas bacterias pueden ejercer un efecto benéfico directo, a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno, solubilización de fósforo (P) inorgánico. De manera indirecta, por medio de síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica a patógenos. Pueden también actuar como bacterias promotoras de crecimiento, capaces de proteger a las plantas de la infección, causadas por agentes fitopatógenos (Siddiqui y Shaukat, 2003; Alves *et al.* 2004; Fgaier *et al.* 2008 y Rosas *et al.* 2009 citados por Cano, 2009).

- *Azotobacter spp*

Este microorganismo promueve el crecimiento vegetal mediante la liberación de hormonas y otras sustancias, lo que lo convierte en un microorganismo con gran potencial en el campo agrícola. Estas sustancias también le confieren características de resistencia a condiciones climáticas adversas, por lo que puede ser un microorganismo que logre adaptarse a una mayor variedad de suelos y cultivos. Aunado a esto, puede fijar nitrógeno en vida libre, representando otra ventaja frente a otras bacterias (Flores, Gonzales, Aguilar y Herrera, 2014).

- *Bacillus spp*

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos. Este género se encuentra comúnmente

en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Además se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Cuervo, 2010).

## **CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO**

### **3.1 UBICACIÓN**

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”), ubicada en el sitio El Limón, del cantón Bolívar, de la provincia de Manabí, situada a una altitud de 15 msnm y geográficamente entre las coordenadas 00°49'23” Latitud Sur, 80°11'01” Longitud Oeste<sup>1</sup>.

### **3.2 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS<sup>1</sup>**

- Precipitación anual: 986,19 mm
- Temperatura media anual: 26, 27°C
- Humedad relativa: 82,23%
- Heliofanía: 1043, 96 horas/sol/año

### **3.3 DURACIÓN DEL TRABAJO**

El presente trabajo de investigación tuvo una duración de nueve meses. Se desarrolló en dos fases:

### **FASE 1, ETAPA DE LABORATORIO**

### **3.4 OBTENCIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS**

---

<sup>1</sup> Datos tomados en la estación meteorológica del INANMI, situada en la ESPAM MFL correspondiente al periodo; Enero 2011 Febrero 2019.

### 3.4.1 AISLAMIENTO BACTERIANO

Las plantas de tomatillo se recolectaron en Calceta, Quiroga, Junín, Chone Tosagua. Se cogieron 5 plantas de cada lugar. Los tallos y raíces se lavaron con agua destilada previamente esterilizada. La desinfección se realizó superficialmente, para la cual se colocaron los tallos y las raíces en alcohol al 70 % durante 8 minutos, luego se colocaron en hipoclorito de sodio (2,5 %) durante 10 minutos, posteriormente en etanol durante 8 minutos, seguidamente se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril (Araujo *et al.*, 2002).

Estos autores además señalan, que para comprobar el protocolo de desinfección se sembraron raíces y tallos sobre agar nutritivo dejando en incubación durante 24 horas a 37 °C. Los tallos y raíces se trituraron con solución cloruro de sodio (NaCl al 0,85 %), y con un mortero de porcelana con pistilo. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos, seguidamente se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir la liberación de microorganismos endófitos.

Finalmente indican que, para el aislamiento de las bacterias endófitas, en la solución madre se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  en agua peptona estéril y se sembraron 100  $\mu$ L en por cada dilución. La siembra realizada en placas se incubó durante 24 horas a 37 °C. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se seleccionaron por la forma, el borde, el color, la elevación, entre otros.

### 3.4.2 TINCIÓN DE GRAM

Se colocó una gota de agua destilada sobre un porta objetos, luego con una asa de platino se tomó la colonia, mezclándola uniformemente con el agua. Se fijó la muestra a la flama. Luego se adicionó solución de cristal violeta, por un minuto, se eliminó el exceso para añadirle lugol durante un minuto, posteriormente se adicionó alcohol-acetona durante 30 segundos, se lavó y se añadió safranina durante un minuto. Se observó al microscopio características tales como tipo de tinción y morfología (Mora y García, 2007).

### **3.4.3 PRUEBA DE HEMÓLISIS**

Para conocer el potencial patógeno de las cepas bacterianas aisladas se procedió a cultivarlas en medio sólido agar nutriente durante 18 horas a 37°C. Posteriormente las cepas se inocularon en agar sangre suplementando con 5% de sangre de ternero, seguidamente se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Con esta prueba se determinó si las bacterias producen la B-Hemolisina (responsable de la lisis de las células sanguíneas).

### **3.4.4 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO**

A partir de un cultivo puro de bacterias endófitas se tomó una colonia y se sembró en punción en agar Pikovskayas, posteriormente se procedió a incubar a 37 °C durante 72 horas. Las cepas de bacterias endófitas que tuvieron la capacidad de solubilización formaron un halo alrededor de la colonia. A partir del diámetro del halo de hidrolisis y del diámetro de la colonia bacteriana ( $D. colonia + D. halo / D. colonia$ ) se calculó el índice de solubilización (I.S). Se seleccionaron las 10 cepas que presenten los resultados más altos (Niklitschek, 2008).

### **3.4.5 PRODUCCIÓN DE SIDERÓFORO**

Una vez obtenido el cultivo puro de bacterias endófitas se tomó una colonia y se sembró en punción en agar Cromo azul-5 (CA5), posteriormente se procedió a incubar a 37 °C durante 72 horas. Las cepas de bacterias endófitas que tuvieron la capacidad de producir sideróforo provocaron un cambio en la coloración del medio azul a anaranjado en torno a la colonia que haya producido los compuestos quelantes (Falero, 2013).

### **3.4.6 CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS ENDÓFITAS EN CONDICIONES SIN FUENTE DE NITRÓGENO**

Establecido el cultivo puro de bacterias endófitas se tomó una colonia y se sembró en punción en agar Ashby (HIMEDIA), este medio no posee fuente de nitrógeno; posteriormente se procedió a inocular a 37 °C durante 7 días. A partir del crecimiento obtenido se sembró por segunda ocasión en agar Ashby, se inocularon durante 7 días a 37 °C. Se seleccionaron aquellas bacterias endófitas que fueron capaces de crecer en los pases sucesivos (Otero, 2011).

#### **3.4.7 SUPERVIVENCIA DE LAS BACTERIAS AISLADAS A DIFERENTES CONDICIONES DE pH**

En este ensayo se evaluaron las cepas que crecieron en condiciones sin fuente de nitrógeno. Para lo cual se preparó caldo nutriente, modificando el pH a 3-5-7 y 9 luego se esterilizó, seguidamente se inocularon 5 mL de bacterias seleccionadas en 45 mL de caldo nutriente y se dejaron en incubación durante 18 horas. Se procedió a través de un Diseño Completamente al Azar. A partir de las bacterias inoculadas e incubadas se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$ , posteriormente se sembraron en medio de cultivo agar nutriente y se incubaron durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC).

#### **3.4.8 SUPERVIVENCIA DE AISLADOS BACTERIANOS ENDÓFITOS A DIFERENTES TEMPERATURAS**

En este ensayo se evaluaron las cepas que produjeron ácido AIA y que sean capaces de crecer en condiciones sin fuente de nitrógeno. Para lo cual se preparó el medio de cultivo caldo nutriente, se esterilizó y se inoculó en una relación 1000 uL de inóculo bacteriano en 10 mL de caldo nutriente (1/10). Seguidamente se incubaron a 28, 40, 50 y 37 °C como tratamiento testigo. Cada evaluación se realizó a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas. Se procedió a través de un Diseño Completamente al Azar. Se realizaron diluciones seriadas, la siembra y diseminación con espátula de Drigalsky en caja Petri. A continuación, se incubaron durante 18 horas a 37 °C y 180 rpm. Culminado el tiempo de incubación se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC).

## FASE 2, ETAPA DE CAMPO

### 3.5 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS Y SELECCIONADAS

Se trabajaron con los cinco aislados endófitos que respondieron favorablemente *in vitro* de acuerdo a la prueba de hemólisis, tinción de Gram (gran positivas), al crecimiento sin fuente de nitrógeno, a su capacidad de solubilización de fosfato, producción de sideróforos, y de su capacidad de supervivencia a diferentes concentraciones de pH y temperatura.

#### 3.5.1 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

- **Factores en estudio**

Factor A: Aislados endófitos de bacterias.

Factor B: Tipos de sustrato

- **Niveles de los factores**

*Cuadro 3.1. Niveles de los factores.*

<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>
A1= Aislado endófito (Calceta)	B1= Sustrato Área convencional
A2= Aislado endófito (Quiroga)	B2= Sustrato Área boscosa
A3= Aislado endófito (Chone)	
A4= Aislado endófito (Tosagua)	
A5= Aislado endófito (Junin)	

- **Tratamientos**

**Cuadro 3.2.** Descripción de los tratamientos y sus respectivos códigos.

N	Código	Descripción	
		Aislado	Sustrato
1	A1B1	Aislado endófito Calceta	Área convencional
2	A1B2	Aislado endófito Calceta	Área boscosa
3	A2B1	Aislado endófito Quiroga	Área convencional
4	A2B2	Aislado endófito Quiroga	Área boscosa
5	A3B1	Aislado endófito Chone	Área convencional
6	A3B2	Aislado endófito Chone	Área boscosa
7	A4B1	Aislado endófito Tosagua	Área convencional
8	A4B2	Aislado endófito Tosagua	Área boscosa
9	A5B1	Aislado endófito Junín	Área convencional
10	A5B2	Aislado endófito Junín	Área boscosa

- **Diseño experimental**

El trabajo se realizó a través de un diseño completamente al azar con tres replicas por variante.

- **Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de varianza y la prueba Tukey  $p < 0,05$  para las fuentes de variación que tengan significación estadística en las variables respuesta evaluadas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa INFOSTAT (Di Rienzo, Balzarini, Gonzales, Casanoves, Tablada y Robledo, 2010). A continuación, se presenta el esquema de ADEVA.

**Cuadro 3.3.** Esquema de ADEVA.

Fuente de variación	G.L
Total	29
Tratamientos	9
Error	20
F.A	4
F.B	1
A X B	4

### **3.5.2 UNIDAD EXPERIMENTAL**

La unidad experimental estuvo constituida por tres macetas (fundas de 6 x 9 cm), en cada maceta se ubicó una semilla de tomate variedad Margot F1.

### **3.5.3 MANEJO DEL EXPERIMENTO**

- **Multiplicación de bacterias**

Para la multiplicación de bacterias endófitas se preparó caldo nutritivo y se esterilizó en autoclave (Yamato SM510). Posteriormente se inoculó el caldo nutritivo adicionando dos asadas de cepas bacterianas. Seguidamente se incubó a 37 °C durante 18 horas, esto constituyó el preinoculo, del cual se tomo 1,5 mL de cultivo y se colocó en tubo micro centrifugados (eppendorf). Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se suspendió en 1 mL de solución salina (0,85 %), seguidamente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, después se eliminó el sobrenadante y se registró el peso del agente activo, el mismo que se conservó en refrigeración hasta su utilización.

- **Esterilización del sustrato**

La esterilización de los sustratos seleccionados en las áreas convencional y boscosa fueron llevados al autoclave (Yamato SM510) para eliminar todos los microorganismos benéficos y patógenos que se encuentren en ellos para la evaluación propia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

- **Inoculación al sustrato**

A partir del agente activo obtenido en la fase de multiplicación se precedió a inocular al sustrato esterilizado que sirvió para la evaluación de la capacidad de las bacterias como promotoras de crecimiento vegetal. Por cada 99 mL de

diluyente (agua estéril) se aplicó 1 g de agente activo. Se recolonizó cada unidad experimental (maceta) con 5 mL de agente activo tres días antes de la siembra.

- **Inoculación de las semillas de tomate y siembra**

Se depositaron semillas de tomate en cajas petri embebidas durante una hora en agua destilada estéril para el testigo y en la dilución bacteriana seleccionada para los tratamientos (Gonzales, 2014). Transcurrido este tiempo se ubicó una semilla de tomate (Margot F1) por maceta.

- **MANEJO DEL CULTIVO EN LAS MACETAS**

**Control de plagas y enfermedades:** Se lo realizó de manera mecánica utilizando mallas anti-insectos para reducir las entradas de vectores y con ello la transmisión de enfermedades.

**Control de malezas:** El control de malezas se lo realizó de manera manual.

**Riego:** El riego se lo realizó manualmente utilizando una probeta de 100 mL con agua destilada antes y después de la siembra de las plantas de tomate, cada día.

**Evaluación:** La evaluación de las plantas se la realizó a los 20 días después de la germinación donde se culminó la evaluación de las variables respuesta.

#### **3.5.4 VARIABLES EVALUADAS**

- **Altura de planta**

Para la determinación de esta variable, se realizó la medición desde el cuello de la planta (en maceta) hasta el punto apical más alto a los 20 días con la ayuda de una regla, sus datos se expresaron en cm.

- **Longitud de raíz**

De la misma planta evaluada para altura, se procedió a realizar la medición de esta variable, tomado desde el cuello hasta la parte terminal de la raíz, con la ayuda de regla, sus valores se expresaron en cm.

- **Peso fresco de la raíz y parte aérea**

Las plantas se cortaron a nivel del cuello para separarlas y se pesaron en una balanza electrónica. Sus datos se expresaron en gramos (g).

- **Peso seco de la raíz y parte aérea**

Los tejidos seleccionados se colocaron en una estufa a 100 grados durante 72 horas, para poder determinar el peso seco de cada una de las partes. Los valores obtenidos se registraron en gramos (g).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO OBTENIDO Y DENSIDAD POBLACIONAL

Se obtuvieron un total 158 morfotipos de bacterias endófitas los cuales fueron aisladas de tejidos como raíces y tallos en plantas de tomatillo utilizando el protocolo de Araujo *et al.* (2002). Los resultados obtenidos mostraron que se encontró mayor densidad poblacional de bacterias endófitas en el tallo con un total de 81 aislados en comparación a las raíces donde el promedio fue de 77 bacterias. Esto resultados se aproximan a los alcanzados por Lamb *et al.* (1996) citados por Pérez, Rojas y Fuentes, 2010) quienes mencionan que las mayores densidades poblacionales bacterianas endófitas nativas o introducidas, son normalmente observadas en la raíz y en la parte inferior del tallo, presentándose decrecimiento de estas hasta la hoja.

**Cuadro 4.1.** Aislamiento obtenido de raíces y tallos en plantas de tomatillo.

	<b>Raíz</b>	<b>Tallo</b>	<b>Total</b>
<b>Calceta</b>	18	17	35
<b>Quiroga</b>	18	17	35
<b>Junín</b>	16	25	41
<b>Tosagua</b>	14	12	26
<b>Chone</b>	11	10	21
<b>Total</b>	77	81	158

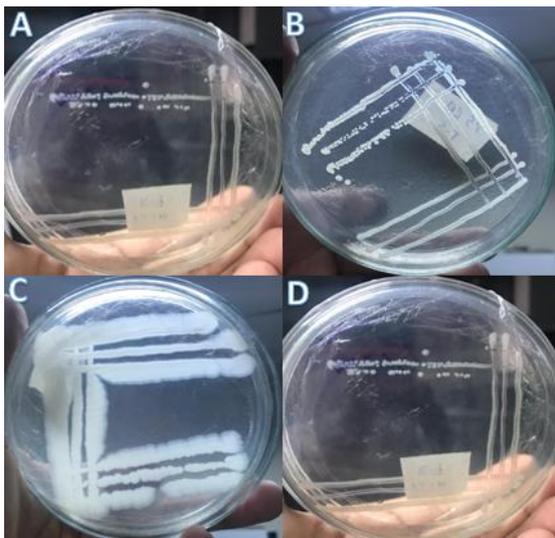
### 4.2 TINCION DE GRAM

Con la tinción de Gram se pudo identificar la morfología de las bacterias y el tipo de tinción mediante la observación microscópica utilizando el método descrito por Mora y García (2007), identificando que la mayoría de las bacterias endófitas presentaron morfologías para cocos con el 44 %, para coco *bacillus* con 30 %, *bacillus* con 24 % y diplococo con 2 %. En respuesta a la tinción de Gram la mayoría de las bacterias dieron positivas mientras que cinco fueron negativas. Estos datos concuerdan con la morfología de las bacterias observadas al microscopio óptico por Pérez, F *et al.* 2010, en donde reflejó que el 81,08 % fueron bacilos cortos, el 16,22 % bacilos largos y el 2,70 %

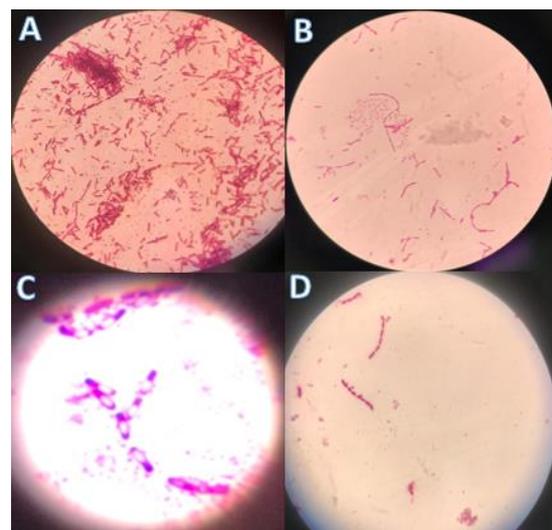
cocobacilos y en la respuesta a la tinción diferencial de Gram el 70,27 % fueron positivos mientras que el resto (29,73 %) Gram negativos.

**Cuadro 4.2.** Tinción de Gram y morfología de las bacterias

Muestras	Morfología	Tinción	
		Gram +	Gram -
Calceta	Coco	27	1
	Coco bacillus	5	0
	Bacillus	2	0
Quiroga	Coco	11	1
	Coco bacillus	16	1
	Bacillus	5	0
	Diplococo	1	0
Chone	Coco	10	2
	Coco bacillus	6	1
	Bacillus	2	0
	Diplococo	1	0
Junín	Coco	13	0
	Coco bacillus	12	0
	Bacillus	15	0
Tosagua	Coco	5	0
	Coco bacillus	5	0
	Bacillus	15	0
	Diplococo	1	0
Total		152	6



**Foto 4.1.** Morfologías macroscópicas de bacterias endófitas..



**Foto 4.2.** Morfología microscópica de bacterias endófitas .

### 4.3 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO

De los 158 morfotipos de bacterias endófitas aislados, 51 de estos presentaron actividad positiva para la solubilización de fosfatos *in vitro* en agar Pikovskaya utilizando el método descrito por Niklitschek (2008). Lo cual es de gran importancia ya que en los sistemas agrícolas, después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más importante en la nutrición de las plantas, desempeñando un papel fundamental en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, transferencia de energía y respiración (Khan, Zaidi, Ahemad, Oves y Wani, 2010). Sin embargo, entre 95-99 % del fósforo presente en los suelos agrícolas se encuentra en forma insoluble, limitando su aprovechamiento por las plantas (Pandey y Maheshwari, 2007).

**Cuadro 4.3.** Solubilización de fosfato de bacterias endófitas a las 48 horas de incubación.

Códigos	M	Códigos	M	Códigos	M	Códigos	M
Ca P4 1R-5	2,5 a	JunP2 R-8	2,26 a	Cho P3 R-5	2,86 a	Est P4 T-6	2,43 a
Ca P4 R-5	2,48 a	2JunP3 R-6	2,1 ab	Cho P3 R-6	2,85 a	1Est P5 R-8	2,4 ab
Ca P3 R-8	2,3 ab	1JunP2 R-5	1,85 abc	Cho P5 T-5	2,77 a	Est P3 R-8	2,37 ab
Ca P3 1 R-7	2,13 ab	JunP4 T-6.	1,78 abc	Cho 2P5 R-5	2,69 a	Est P4 T-8	2,33 ab
Ca P5 T-5	2,06 abc	JunP3 R-7	1,61 bc	Cho P3 T-5	2,63 a	Est P5 R-7	2,21 ab
Ca P3 1 T-8	1,93 abc	JunP3 T-5	1,54 bc	Cho 1P5 R-5	2,56 a	Est P2 T-6	2,19 ab
Ca P3 2 T-7	1,92 abc	JunP4 T-6	1,46 c	Cho P4 R-5	2,56 a	Est P2 R-5	2,19 ab
Ca P2 2 R-5	1,8 bc	1JunP5 R-6	1,39 c	Cho P4 T-7	2,51 a	Est P3 R-7	2,18 ab
Ca P2 R-8	1,51 c	p-valor=	0,0019 **	Cho P4 T-5	2,33 a	Est P3 T-5	2,18 ab
p-valor=	0,0003 **	C.V. %=	12,87	Cho P2 T-6	2,32 a	Est P3 T-7	2,17 ab
C.V. %=	10,18			Cho 1P3 R-6	2,29 a	Est P2 T-7	2,14 ab
				p-valor=	0,081 Ns	Est P5 T-7	2,12 ab
Qui P2 R5 -8	2,16 a			C.V. %=	9,74	Est P4 R-6	2,11 ab
Qui P1 T1 -5	2,03 ab					Est P5 T-6	2,06 ab
Qui P1 T3 -5	1,98 ab					Est P2 R-7	2,02 ab
Qui P1 T2 -7	1,91 ab					Est P3 T-6	1,96 ab
Qui P2 T1 -5	1,68 ab					Est P5 T-5	1,91 b
Qui P3 T1 -6	1,5 b					p-valor=	0,015 *
p-valor=	0,0393 *					C.V. %=	7,5
C.V. %=	12,18						

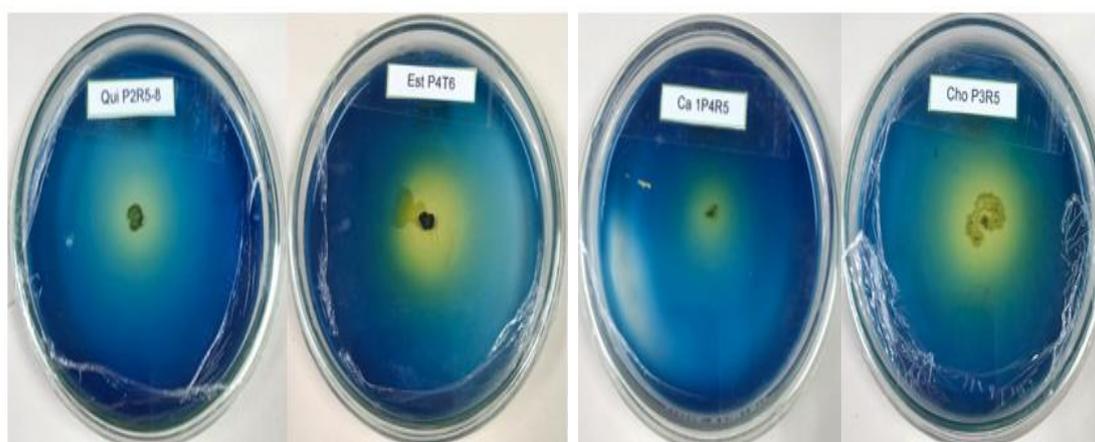
**Descripción de los códigos:** Ca= Calceta, Qui= Quiroga, Jun= Junín, Cho= Chone y Est= Tosagua. P= Planta, R= Raíz, T= Tallo y -5,-6,-7,-8= número de dilución.

Para esta prueba los datos fueron sometidos en la prueba Tukey  $p < 0,05$  y se seleccionaron las diez mejores bacterias con resultados más altos.

A partir de los diámetros del halo de hidrólisis y de la colonia bacteriana se calculó el índice de solubilización (I.S) a las 10 mejores bacterias. Los resultados tras la medición de los índices de solubilización arrojaron valores desde 1,42 mm hasta 3,57 mm. Al respecto, autores como Mantilla, Ávila y Peña (2011) en su estudio obtuvieron valores desde 1,5 mm hasta 4,2 mm tras la medición de los índices de solubilización a los tres y siete días de incubación. Estos autores mencionan que para algunas bacterias este intervalo de tiempo es de gran provecho pues el halo total aumentaba de tamaño y el de la colonia se conservaba, obteniéndose de esta manera buenos índices de solubilización.

**Cuadro 4.4.** Índice de solubilización a las mejores bacterias.

<b>Solubilización de fosfato</b>	
<b>Códigos</b>	<b>I.S. 48 h</b>
Ca P4 1 R-5	3,27 mm
Ca P4 R-5	2,48 mm
Cho P3 R-5	3,57 mm
Cho P4 T-7	1,9 mm
Est P4 T-6	2,32 mm
1Est P5 R-8	2,28 mm
JunP2 R-8	1,66 mm
2JunP3 R-6	1,42 mm
Qui P2 R5 -8	2,21 mm
Qui P1 T1 -5	1,69 mm



**Foto 4.3.** Solubilización de fosfato en agar Pikovskaya.

#### 4.4 PRODUCCIÓN DE SIDEROFORO

Esta prueba se la realizó a las diez mejores bacterias seleccionadas por su capacidad de solubilizar de fosfato, obteniéndose como resultado, que todas ellas tuvieron la capacidad de producir sideróforo ya que provocaron un cambio en la coloración del medio azul a anaranjado. Compant, Duffy, Nowak, Clement y Barka (2005) mencionan que este cambio de coloración se debe a los compuestos quelantes, ya que éstos secuestran el hierro al formar un complejo  $Fe^{3+}$ -sideróforo y al utilizar todo o la mayoría del hierro disponible en el suelo suprime o inhibe el crecimiento de otros microorganismos patógenos (o benéficos) presentes en la rizosfera.

A lo expuesto en el párrafo anterior, autores como Glick y Bashan (1997) también mencionan que la producción de sideróforos por bacterias inhibe a patógenos de plantas in vitro y también promueve el crecimiento de plantas en el suelo. Carcaño, Ferrera, Pérez, Molina y Bashan (2006) mencionan que la habilidad de los sideróforos para actuar como agentes efectivos supresores de enfermedades puede ser afectada por el tipo de planta, la especificidad del fitopatógeno a suprimir, la composición del suelo y la bacteria que sintetiza el sideróforo. En el **Cuadro 4.5** se muestran los resultados tras la medición del halo en donde arrojaron valores desde 1,15 mm hasta 2,27 mm en un periodo de 48 h de incubación.

*Cuadro 4.5. Descripción de los códigos y la medición del halo a las 48 h de incubación.*

<b>Códigos</b>	<b>Halo 48 h</b>
P4CAR-5	1,15 mm
1CAP4R-5	1,97 mm
Cho P4T-7	2,4 mm
Cho P3R-5	1,04 mm
Jun P2R-8	2,27 mm
2Jun P3R-6	2,28 mm
Qui P2R-5	1,41 mm
Qui P1T1-5	2,09 mm
Est P4T-6	1,45 mm
1Est P5R-8	1,36 mm

#### 4.5 CRECIMIENTO EN CONDICIONES SIN FUENTE DE NITRÓGENO

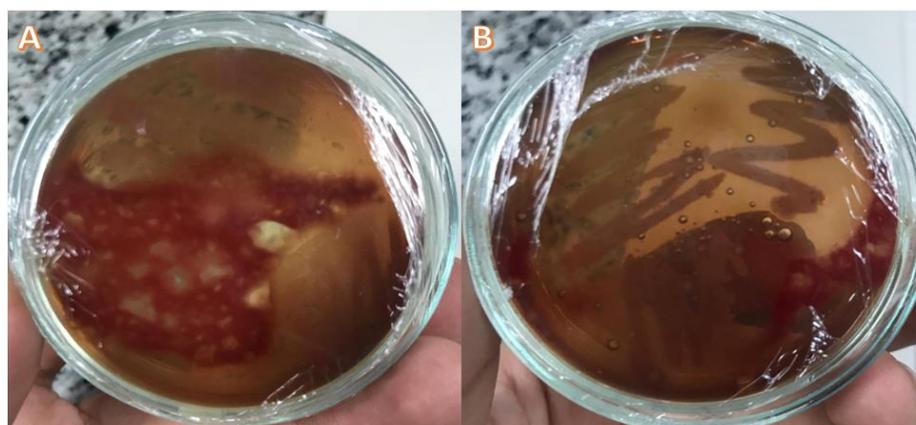
Para esta prueba se seleccionaron las diez cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato y producir sideróforo, obteniéndose como resultado que todas las cepas tuvieron la capacidad de crecer en condiciones sin fuente de nitrógeno en agar semisólido Ashby. Estos resultados se aproximan con Ortuño, Córdoba, Claros, Castillo (2018) que en su estudio sobre la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en el medio Burk (un medio sin fuente de nitrógeno), demostraron que de los 65 aislados, 53 mostraron un crecimiento significativo, capaces de crecer en condiciones sin nitrógeno. Autores como Servin y Dion (2009) en su estudio sobre la fijación biológica de nitrógeno en el medio Burk (un medio que tiene la característica de contener poca fuente de nitrógeno), demostraron que las bacterias que se desarrollaron bajo este medio tienen la capacidad de reducir el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) para producir  $NH_4^+$  (amonio), que después sirve para la biosíntesis de aminoácidos.

#### 4.6 PRUEBA DE HEMÓLISIS

De las diez bacterias seleccionadas por su capacidad de solubilizar fosfato, producir sideróforos y crecer sin fuente de nitrógeno, dos de ellas presentaron actividad  $\beta$ -hemolisis (2JunP3 R6 y 1EstP5 R8) por lo que su uso en la producción agrícola se limita, a diferencia de las ocho restantes que presentaron hemólisis gama. Estudios realizados por Estrada (2017) en cepas bacterianas asociadas *Opuntia* spp mostraron que, de ocho bacterias seleccionadas por su capacidad de producir AIA y solubilización de fosfato, tres de ellas presentaron  $\beta$ -hemolisis a diferencias de las otras cinco que no presentaron halos hemolíticos del tipo Beta alrededor de su crecimiento. Santos, Parra, Isela, Herrera, Valenzuela y Estrada (2018) en su estudio realizado en la “Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional” de un total de 258 cepas microbianas evaluadas, el 11% presenta actividad  $\beta$ -hemolisis, lo que restringe su uso potencial como inoculante microbiano para el sector agrícola.

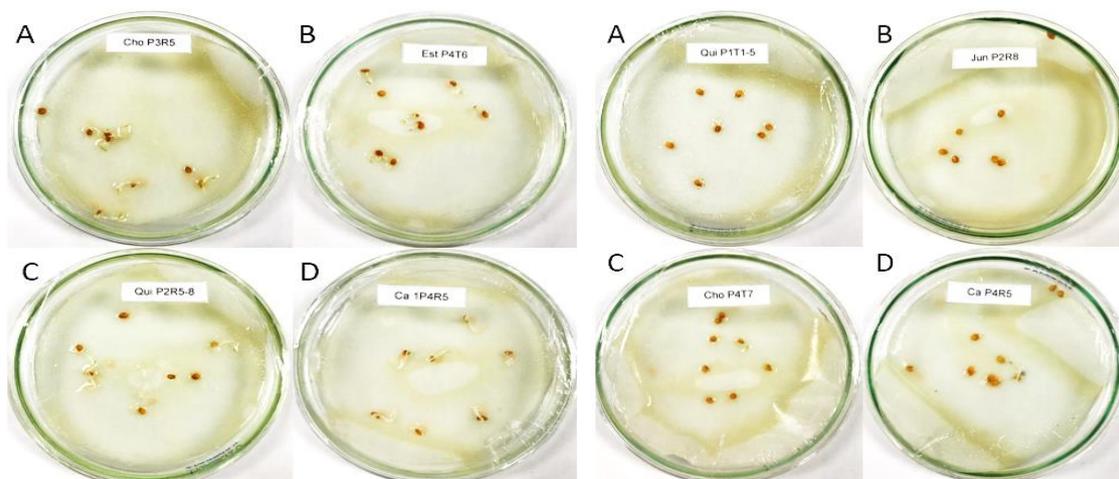
**Cuadro 4.6.** Prueba de hemólisis en bacterias endófitas.

<b>Códigos</b>	<b>Morfología</b>	<b>Prueba de hemólisis</b>
1CaP4 R-5	<i>Coco Bacillus</i>	Gama
Ca P4 R-5	<i>Coco Bacillus</i>	Gama
Cho P4 T-7	<i>Coco Bacillus</i>	Gama
Cho P3 R-5	<i>Coco</i>	Gama
JunP2 R-8	<i>Coco Bacillus</i>	Gama
2JunP3 R-6	<i>Coco Bacillus</i>	Beta
Qui P1 T1 -5	<i>Coco Bacillus</i>	Gama
Qui P2 R5 -8	<i>Coco</i>	Gama
ESTP4 T-6.	<i>Bacillus</i>	Gama
1ESTP5 R-8	<i>Coco</i>	Beta

**Foto 4.4.** A y B, resultados con hemólisis beta.

#### 4.7 GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS DE TOMATE

Un parámetro de importancia considerado para la selección de los aislamientos y su caracterización es la inoculación bacteriana y siembra de semillas por cepas utilizando cajas de Petri más el testigo respectivo no inoculado. Esta etapa permitió realizar una segunda preselección de las diferentes cepas bacterianas con potencial promotor del crecimiento. Las semillas se mantuvieron en condiciones de oscuridad y se contaron diariamente hasta que se obtuvo el máximo de semillas germinadas. Se seleccionaron cuatro cepas bacterianas con potencial como bioinoculantes, descartando cuatro cepas con negativo o bajo impacto en la germinación de semillas de tomate.



**Foto 4.5.** A, B, C y D con potencial promotor del crecimiento en la germinación alto.

**Foto 4.6.** A, B, C y D con potencial promotor del crecimiento en la germinación bajo

#### 4.8 SUPERVIVENCIA A DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA

Para estas pruebas se seleccionaron las bacterias que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato, producir sideróforo, crecer sin fuente de nitrógeno, prueba de hemólisis positiva y aquellas con potencial germinador sobre semillas de tomate, los resultados tras la evaluación del pH muestran que las bacterias endófitas tuvieron una adaptación eficiente a diferentes condiciones de pH ácidos, neutros y alcalinos, aunque en algunas el crecimiento fue incontable debido a que existe aglomeraciones; sin embargo, en condiciones de pH 3 solo una mostró crecimiento (Qui P2R5-8 con  $1 \times 10^{-5}$  UFC), a diferencia de las otras que no existió crecimiento (NC=no contable) como se muestra en el **cuadro 4.7**.

**Cuadro 4.7.** Evaluación de las bacterias endófitas a diferentes condiciones de pH.

Códigos	Morfología	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
Ca P4 1R-5	<i>Coco Bacillus</i>	NC	Incontable	$1 \times 10^{-5}$	Incontable
Cho P3 R-5	<i>Coco</i>	NC	Incontable	$3,5 \times 10^{-6}$	Incontable
Qui P2 R5 -8	<i>Coco</i>	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$7,1 \times 10^{-5}$	Incontable
ESTP4 T-6.	<i>Bacillus</i>	NC	$6,3 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^{-6}$	Incontable

En cuanto a los resultados para la estimación de las bacterias endófitas a diferentes condiciones de temperaturas (20, 37, 45 y 50 °C), las cepas se evaluaron a las 0 horas y luego a las 18 horas para comparar su crecimiento en diferentes tiempos, demostrando que todas las bacterias endófitas mostraron una buena adaptación presentando unidades formadoras de colonias (UFC). Se consta que a temperatura 20 °C fue donde mayor presencia de colonias existió, en comparación a la evaluación a las 0 horas, sin embargo, a temperatura de 50 °C su crecimiento fue inferior a la evaluación a la 0 hora siendo la de resultado más pobre la bacteria ChoneP3R-5 con  $3,3 \times 10^{-5}$  UFC.

**Cuadro 4.8.** Evaluación de las bacterias endófitas a diferentes condiciones de temperatura.

Códigos	Morfología	20°C		37°C		45°C		50°C	
		0 hora	18 horas	18 horas	18 horas	18 horas	18 horas		
Ca P4 1R-5	<i>Coco Bacillus</i>	$1 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^{-8}$	Incontable	Incontable			
Cho P3 R-5	<i>Coco</i>	$3,5 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-12}$	$35,3 \times 10^{-9}$	$17,7 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-5}$			
Qui P2 R5 -8	<i>Coco</i>	$7 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-12}$	$7,1 \times 10^{-9}$	$12,8 \times 10^{-6}$	Incontable			
ESTP4 T-6.	<i>Bacillus</i>	$2,4 \times 10^{-6}$	$666 \times 10^{-9}$	$24,3 \times 10^{-9}$	$8,3 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-6}$			

Calvo y Zúñiga (2010) en estudios sobre las pruebas fisiológicas de crecimiento de cepas bacterianas a diferentes condiciones de temperaturas (4, 10, 15 y 20 °C), mostraron que de las 43 cepas probadas solo una creció a 4 °C, sin embargo, el 98 % creció a 10 °C y el 100 % a 15 y a 20 °C. Por otro lado, respecto al pH, observó que 100 % de las cepas, crecieron bien en ambos pHs (4 y 5,5), lo que indica una buena adaptación del crecimiento a pH ácidos. La evaluación de los niveles de crecimiento tanto a bajo pH y temperatura baja en el tiempo, revelan un patrón bifásico que se explicaría por pequeños periodos de retraso del crecimiento en condiciones de estrés.

Por último, los resultados obtenidos en la evaluación, caracterización y selección de las cepas en la fase de laboratorio, permitió obtener cuatro bacterias endófitas como bioinoculantes con potencial promotor de crecimiento vegetal para ser probadas en plantas de tomate a nivel de macetas.

## 4.9 EVALUACIÓN DE LAS BPCV AISLADAS Y SELECCIONADAS

Como se puede observar en el cuadro 4.9, la influencia de las bacterias endófitas como promotoras de crecimiento vegetal en las variables altura de planta, longitud de raíz, peso fresco de planta y de raíz, peso seco de planta y de raíz no mostraron diferencia significativa para el Factor A (Aislados endófitos) y la interacción, mientras que para el Factor B (Sustratos) presentaron diferencias significativas.

**Cuadro 4.9.** Análisis de varianza para las variables evaluadas según Tukey al 0,05 % de probabilidad.

		Altura de planta	Longitud de raíz	Peso fresco planta	Peso fresco raíz	Peso seco planta	Peso seco raíz
<b>F.V.</b>	<b>GL</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor</b>	<b>p-valor</b>
Factor A	3	0,47 Ns	0,69 Ns	0,89 Ns	0,25 Ns	0,24 Ns	0,06 Ns
Factor A>R	8	0,01 **	0,15 Ns	0,02 *	0,22 Ns	0,001 **	0,62 Ns
Factor B	1	0,0003 **	0,30 Ns	0,01 **	0,017 *	0,0001 **	0,15 Ns
B x A	3	0,79 Ns	0,77 Ns	0,78 Ns	0,13 Ns	0,38 Ns	0,22 Ns
Error	9						
Total	23						
C.V%		9,72	24,96	29,35	34,26	23,53	49,22

### 4.9.1 ALTURA DE PLANTA

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza para altura de planta no se encontraron diferencias significativas entre el Factor A (Bacterias endófitas) e Interacciones, mientras que el Factor B (Sustratos) hubo diferencia significativa. Ver **cuadro 4.10**.

### 4.9.2 LONGITUD DE RAÍZ

El análisis de varianza de longitud de raíz no se encontraron diferencias significativas para el Factor A (Bacterias endófitas), Factor B (Sustrato) e Interacción. Ver **cuadro 4.10**.

### 4.9.3 PESO FRESCO PARTE AÉREA Y RAÍZ

Para estas variables no se encontraron diferencias significativas entre el Factor A (Bacterias endófitas) e interacciones, mientras que el Factor B (Sustratos) las diferencias encontradas fueron altamente significativas. Ver **cuadro 4.10**.

### 4.9.4 PESO SECO PARTE AÉREA Y RAÍZ

El análisis no evidenció significación entre el Factor A (Bacterias endófitas), Factor B (Sustrato), sin embargo, hubo diferencia significativa para el Factor B en la variable peso seco de la parte aérea. Ver **cuadro 4.10**.

**Cuadro 4.10.** Análisis de las variables evaluadas altura de planta, longitud de raíz, peso fresco planta y raíz y peso seco planta y raíz según la prueba de Tukey al 0,05 % de probabilidad.

Tratamientos	Altura de planta	Longitud de raíz	Peso fresco planta	Peso fresco raíz	Peso fresco planta
	NS	NS	NS	NS	NS
<b>A1</b>	10,58	4,62	0,77	0,09	0,07
<b>A2</b>	8,75	4	0,6	0,06	0,05
<b>A3</b>	9,5	5	0,78	0,07	0,07
<b>A4</b>	10,58	5,08	0,74	0,06	0,07
<b>Medias</b>	9,58	4,68	0,72	0,07	0,07
	*	NS	**	*	**
<b>B1</b>	11,37 a	4,91	0,85 a	0,09 a	0,09 a
<b>B2</b>	9,17 b	4,57	0,6 b	0,06 b	0,06 b
<b>Medias</b>	10,27	4,74	0,73	0,08	0,08
	NS	NS	NS	NS	NS
<b>A1B1</b>	11,67	4,73	0,93	0,11	0,08
<b>A1B2</b>	9,5	4,5	0,62	0,06	0,05
<b>A2B1</b>	10,17	4,5	0,72	0,08	0,07
<b>A2B2</b>	7,33	3,5	0,49	0,04	0,04
<b>A3B1</b>	10,83	5,5	0,96	0,11	0,09
<b>A3B2</b>	8,17	4,5	0,6	0,03	0,05
<b>A4B1</b>	11,5	5	0,8	0,06	0,07
<b>A4B2</b>	9,67	5,17	0,68	0,07	0,06
<b>Medias</b>	9,85	4,7	0,73	0,07	0,06

Los resultados obtenidos en esta investigación, permiten manifestar que las bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) aisladas de la planta de tomatillo no ejercieron ningún efecto sobre las variables evaluadas, ya que éstas, según los resultados actuaron por igual, pero con mayor eficiencia en el suelo convencional. Situación que probablemente se deba a que podría existir una mayor cantidad de elementos disponible para la planta debido a que es una área con mayor explotación, a diferencia del suelo orgánico que posee abundante materia orgánica descompuesta por microorganismo y para este estudio los sustratos fueron esterilizados; sin embargo, estos resultados son promisorios y resultaría necesario continuar realizando estudios que permitan conocer la respuesta de la planta a estos microorganismos en ambientes productivos.

En este sentido, García (2012), señala que en su estudio no encontró diferencias significativas entre tratamientos sobre la inoculación simple y doble de *Azospirillum* spp, ya que para las variables peso fresco y longitud de la planta el sustrato experimental para la investigación de *Azospirillum* spp consistió de un sustrato estéril, distinto a un suelo que normalmente tiene lugar a la fijación asociada de nitrógeno.

Patten y Glick (2002) reportan que varias especies de bacterias endofíticas de los géneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, entre otros, pueden afectar positivamente las raíces y el follaje de diferentes cultivos en condiciones controladas, no obstante, sugieren la realización de ensayos en campo para validar el efecto de los aislados en condiciones naturales.

Estos efectos contradictorios sobre la especificidad cepa-planta son aparentemente reales, ya que la mayoría de estos parámetros morfológicos son evaluados de forma fácil y exacta, se puede concluir que otros factores ambientales como la nutrición de las plantas, irrigación y el genoma de las mismas pueden significativamente determinar el tipo y la magnitud del efecto en una determinada asociación cepa-planta.

## CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los autores de esta investigación concluyen que:

- La caracterización de las bacterias endófitas obtenidas en plantas de tomatillos permitió identificar cuatro tipos de morfologías bacterianas como *Cocos*, *Cocos bacillus*, *Bacillus* y *Diplococos*, aisladas de raíces y tallos.
- La evaluación de las bacterias endófitas *in vitro* en condiciones de estrés permitió obtener cuatro de estos microorganismos como promotoras de crecimiento vegetal.
- La determinación del efecto promotor de crecimiento vegetal de las bacterias endófitas en plantas de tomate a nivel de macetas no ejerció ningún efecto sobre las variables evaluadas, debido a que estos microorganismos actuaron por igual, pero con mayor eficiencia en el suelo convencional en condiciones controladas.

### RECOMENDACIONES

- Continuar con la investigación e identificación de estas especies endófitas para comprobar la interacción entre cepa-planta a nivel de macetas en las plantas de tomate.
- Seguir realizando estudios que permitan conocer la respuesta de la planta a estos microorganismos en ambientes productivos.
- Realizar estudios con aplicaciones de diferentes dosis de bacterias endófitas aisladas del tomatillo para probar su potencial como inoculante.

## BIBLIOGRAFÍAS

- Andrade, M. 2011. Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 35(137), 491-507
- Antoun, H., y Prévost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. 1-38. Springer, Dordrecht.
- Araujo, W., Marcon, J., Maccheroni, W., Vani, J., Van Elsas, JD., Van Vuurde, J., y Azevedo, J. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10), 4906-4914.
- Benjumeda, D. 2017. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. (En línea). Consultado el 97 de enero, 2019. Formato PDF. Disponible en <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%D1OZ,%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Calvo, P., y Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Canto, J., Medina, S., y Morales, D. 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp en plantas de Chile habanero (*Capsicum chinense* jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 4(1), 21-27.
- Cano, A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp y *Pseudomonas* spp. U. Bogotá, CO. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. Vol. 14. p 17.
- Cano, M. 2009. Interacción de organismos benéficos. Artículo técnico. 14(2), 15–31
- Carcaño-Montiel, M. G., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J. D., y Bashan, Y. (2006). Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 493-502.
- Cárdenas, A. (2005). Efecto de inoculación con *B. subtilis* producción de bacterias. Mexico. Irapuato.115
- Compant S., Duffy, B., Nowak J., Clement C y Barka E. 2005 Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Env. Microbiol.* 71:4951–4959.
- Cuervo, J. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos en dos

biofertilizantes comerciales. Tesis. Microbiología Agrícola y veterinaria. Bogotá. CO. p 7.

- Del Puerto, G., Gonzales, A., Lopez, A., Ortiz, C., y Pinaso, D. 2014. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal. (En línea). Consultado el 07 de Enero 2019. Formato PDF. Disponible en: [https://www.academia.edu/12081541/Microorganismos\\_promotores\\_de\\_crecimiento\\_vegetal](https://www.academia.edu/12081541/Microorganismos_promotores_de_crecimiento_vegetal)
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzales, L., Casanoves, F., Tablada, M., y Robledo, C. 2010. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz, M., Baliña, M., Fernández, V., y Peticari, A. 2006. Rendimiento de cultivos de trigo en la región pampeana inoculados con *Azospirillum brasilense*. INPOFOS Informaciones agronómicas, 29, 17-19.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J., y Alcantar, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra Latinoamericana, 19(4).
- Dos Santos, E. 2005. Hidroponía y promoción del crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con bacterias PGPR. Fundación Antorchas Programa de Becas para Jóvenes Destacados del Polimodal, 65.
- El Telégrafo. 2016. En 11 países se tramitan 120 patentes con recursos genéticos sustraídos de Ecuador. (En línea). Consultado el 30 de Octubre 2018. Formato PDF. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/6/en-11-paises-se-tramitan-120-patentes-con-recursos-geneticos-sustraidos-de-ecuador>
- Espinosa, B. 2016. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersium* L.) bajo condiciones de invernadero. (En línea). Consultado el 07 de Enero 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42382/BERNARDO%20ESPINOSA%20PALOMEQUE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Estrada González, Á. D. J. (2017). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L (Master's thesis).
- Ezziyyani, M., Sid Ahmed, A., Pérez, C., Requena, M., y Candela, M. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Revista Horticultura, 191(1), 8-15.
- Falero, E. (2013). Identificación y caracterización de enzimas bacterianas de origen antártico, con potencial, aplicación biotecnológica. Instituto de investigación biológica. Tesis Lic. En bioquímica. 60.
- Flores, A; Gonzales, V; Aguilar, C y Herrera, R. 2014. Azotobacter: una bacteria con potencial como biofertilizante eco-amigable. (En línea). Consultado el 13 de jun. 2019. Formato PDF. Disponibles en Captulo *Azotobacter*.pdf

- García, E. 2012. Efecto de la inoculación con bacterias diazotróficas de vida libre endófitas sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum* "tomate".
- Gutierrez, T., Navarro, P., y Canino, S. 2003. Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 30(2), 56.
- Glick, B. R. y Y. Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotech. Adv.* 15: 353-378.
- Gonzales, F. 2014. Bacterias fijadoras de nitrógeno en el comportamiento agronómico del tomate *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande. (En línea). Consultado el 07 de marzo. 2019. Formato PDF. Disponible en <http://bdigital.unal.edu.co/38681/1/41726-190271-1-PB.pdf>
- INTAGRI. (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura). 2013. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Serie Nutrición Vegetal. Núm. 13. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 2.
- Khan, M. S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M. and Wani, P. A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Reino Unido. Arch Agron Soil Sci.* 56(1):73-98.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., y Espinosa-Victoria, D. 2015. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Malfanova, N. 2013. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. Tesis Doctor. 167.
- Mantilla, L. C., Avila, L. E., & Peña, J. N. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9(2), 114-120.
- Milla, C. 2007. Selección y caracterización fisiológica de rizobacterias promotoras de crecimiento provenientes de dos biomas. México, 1, 200.
- Ministerio del Ambiente de Ecuador e Instituto Ecuatoriano de la Propiedad Intelectual. 2018. Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica. 1 Ed. Quito-Ecuador.
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. D. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17(2), 24-34
- Mondimo, P. 2012. Metodos de inoculación. (En línea). Consultado el 02 de Octubre 2018. Formato PDF. Disponible en:

[http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/08-Metodos\\_inoculacion\\_Cuantif\\_inoculo.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/08-Metodos_inoculacion_Cuantif_inoculo.pdf)

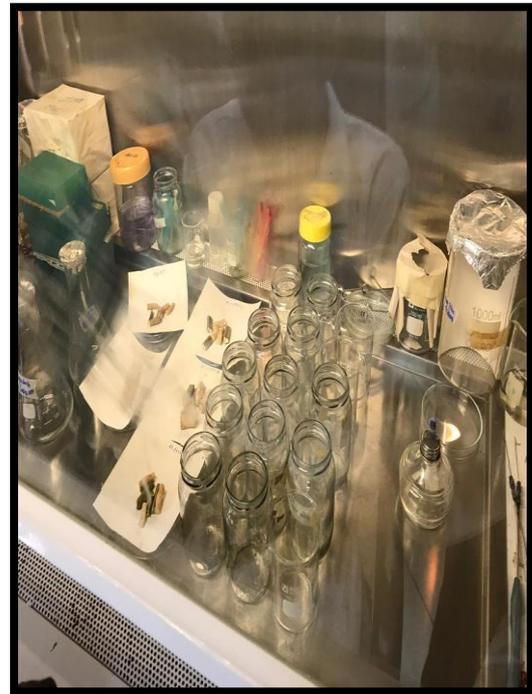
- Mora, N y García, A. 2007. Supervivencia de a diferentes temperaturas. Tesis. Lcdo. En química de alimentos. UAEH. Pachuca, MEX. p 61.
- Niklitschek, M. (2008). Evaluación del rendimiento del trigo (*Triticum aestivum*), inoculado con bacterias solubilizadoras de fosfato y una cepa fijadora de nitrógeno, aisladas de la rizosfera de especies en bacterias. Tesis Lic. Agronomía. Universidad central de Chile. Valdivia-Chile
- Otero, J. 2011. Aislamiento e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosos y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa atlántica colombiana. Universidad Nacional de Colombia. Tesis Magister en Ciencia-Microbiología.
- Ortuño, N., Córdoba, M., Claros, M., y Castillo, J. A. 2018. Evaluación de bacterias endófitas de papa nativa (*Solanum tuberosum* L.) y el desarrollo de un biofertilizante. Revista Latinoamericana de la papa, 22(1), 12-37.
- Pandey, P. y Maheshwari, DK. 2007. Consorcio microbiano de dos especies para la promoción del crecimiento de *Cajanus cajan*. Ciencia actual, 1137-1142.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl Environ Microb 68: 3795-3801.
- Pérez, A., Rojas, J., y Fuentes, J. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto Colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. Acta biológica colombiana, 15(2).
- Pérez, F. R., Santana, R. C., Capó, Y. A., Martín, B. D., & Gutiérrez, R. T. (2010). Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Centro Agrícola, 37(3), 61-66.
- Pérez, M y Mota, M. 2006. Morfología y estructura bacteriana. Artículo de revista académica, 23-42.
- Regueira, E. 2018. Endófitos promotores del crecimiento vegetal del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). (En línea). Consultado el 13 de jun. 2019. Formato PDF. Disponibles en [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/68971/Documento\\_completo.%20Regueira%20Esteban.pdf-PDFA2u.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/68971/Documento_completo.%20Regueira%20Esteban.pdf-PDFA2u.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rodríguez, M., Chávez, R., García, J., y Benavides, A. 2013. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de melón (*Cucumis melo*). *Interciencia*, 38(12), 857-862.

- Sánchez, B., Gómez, M., Garrido, F., y Bonilla, R. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(7), 1401-1415.
- Santos Villalobos, Sergio de los, Parra Cota, Fannie Isela, Herrera Sepúlveda, Angélica, Valenzuela Aragón, Brenda, y Estrada Mora, Juan Carlos. (2018). Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(1), 191-202.
- Sarzoso, G., y Emilia, J. 2014. Aislamiento de bacterias diazotróficas en suelos de cultivo, virgen y humus de lombriz del Distrito de Puno y su efecto in vitro en la germinación de la quinua (*Chenopodium quinoa* willd.). (Tesis de grado). Universidad Nacional del Altiplano, Perú.
- Servin, P. y Dion P, (2009). Curso práctico-teórico de microbiología agrícola. Importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal para los pequeños productores de Bolivia. Fundación
- Tejera, B., Rojas, M., y Heydrich, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138
- Tatiana, V., y Alvin, K. 2014. Morfología Bacteriana. *Revista de actualización clínica*. 49(1), 2594–2598
- Tester, M., y Langridge, P. 2010. Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science*, 327(5967), 818–822.
- Vargas, E. 2010. Tipos de inóculos. (En línea). Consultado el 02 de octubre 2018. Formato PDF. Disponible en: <file:///C:/Users/DIANA/Downloads/Dialnet-InoculosBacterianos-5166274.pdf>

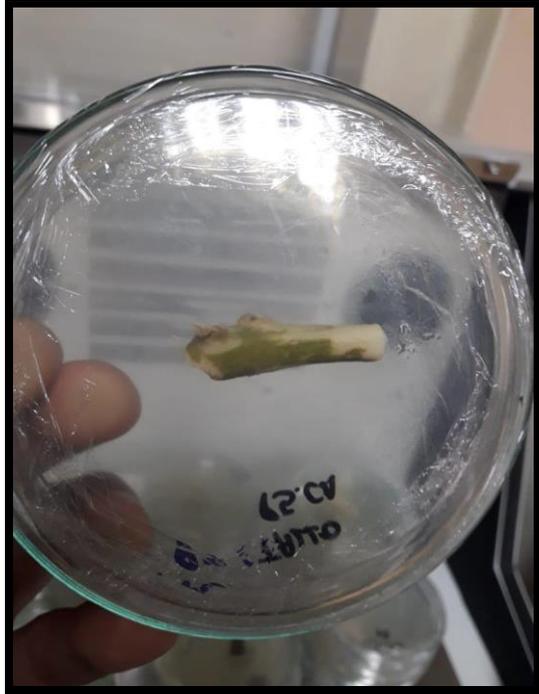
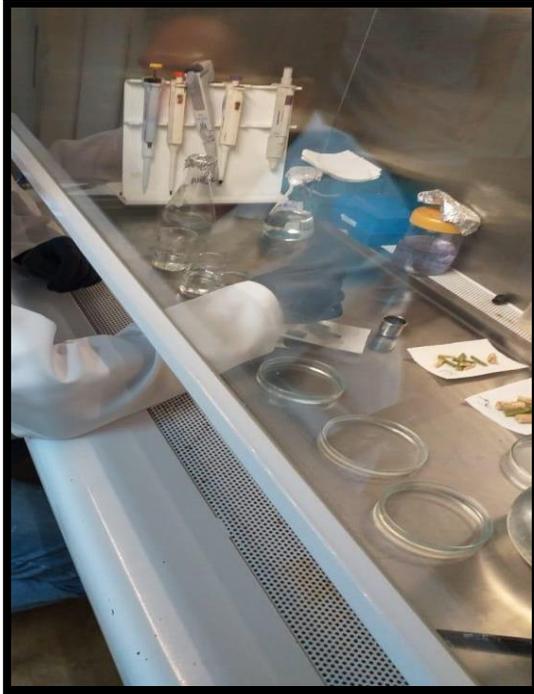
## **ANEXOS**



Recolección de las plantas de tomatillo.



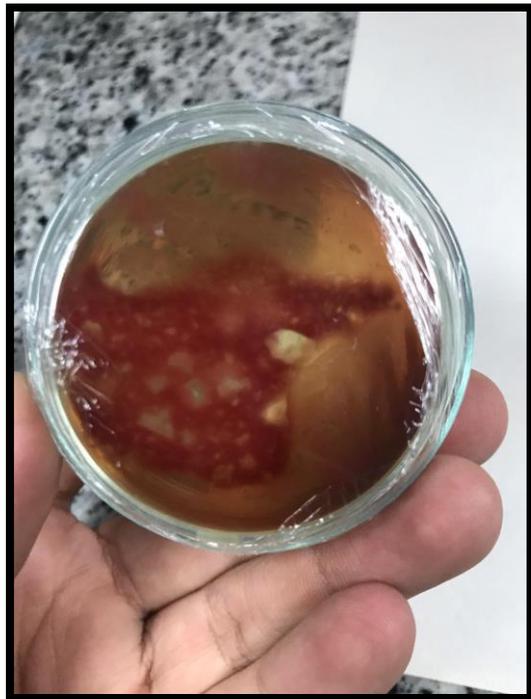
Materiales para la desinfección superficial de las raíces y tallos de plantas de tomatillo.



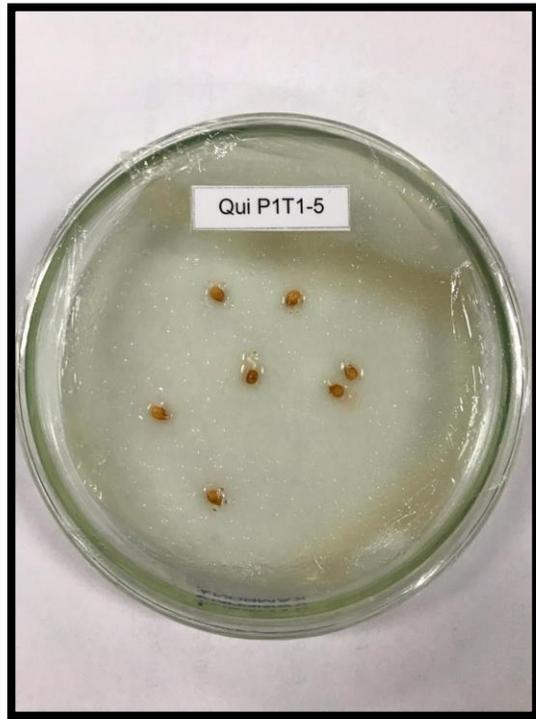
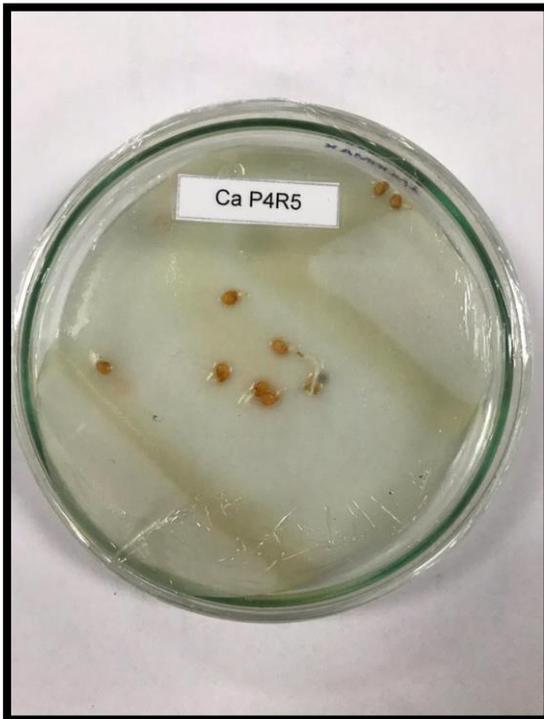
Siembra de raíces y tallos sobre agar nutritivo.



Tinción de gram para la presencia de morfologías macroscópicas y microscópica de bacterias endófitas aisladas del tomatillo (*Lycopersicon pimpinelifolium* L.).



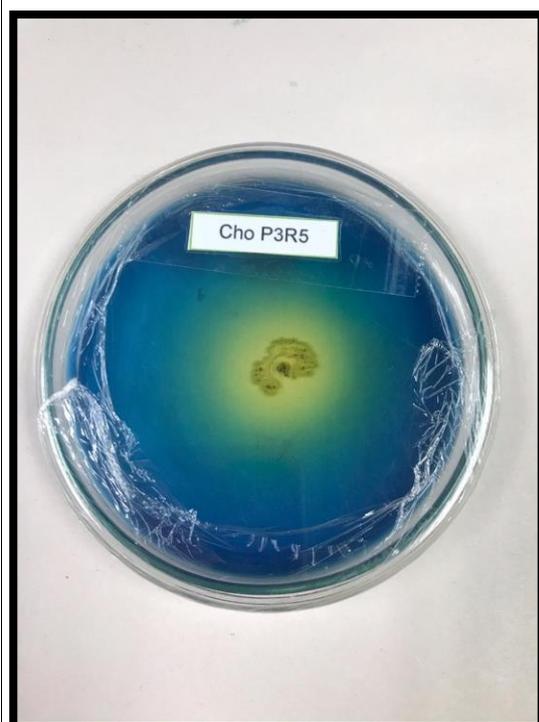
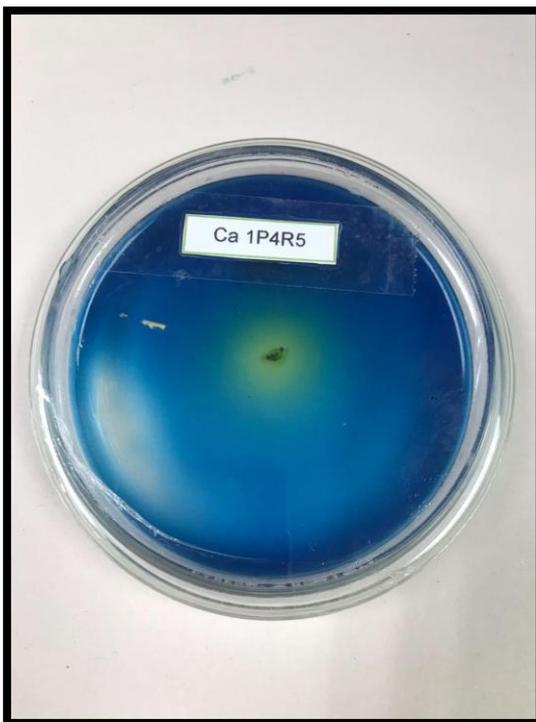
Resultados de Hemolisis beta.



Siembra de las semillas del tomatillo para observar el potencial promotor del crecimiento en la germinación



Inoculación de las bacterias en caldo nutriente incubadas por 18 horas para su respectiva evaluación.



Solubilización de fosfato en agar Pikovskaya



Recolonizar cada unidad experimental (maceta) con 5 mL de agente activo tres días antes de la siembra.



Plantas de tomate con sus respectivos códigos (A= Aislados endófitos Y B= Sustrato) y Replicas



Plantas de tomate para su respectiva evaluación (altura de plantas, longitud de raíz, Peso fresco de la raíz y parte aérea y Peso seco de la raíz y parte aérea).