



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

**CARRERA DE AGRÍCOLA**

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

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**VALIDACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE  
FOSFATO COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN  
PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

**AUTORA:**

**ALEJANDRA E. ZAMBRANO BASURTO**

**TUTOR:**

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

**CALCETA, JULIO DEL 2022**

## DECLARACIÓN DE AUTORIA

Yo Alejandra Estefanía Zambrano Basurto, con cedula de ciudadanía 1314907328, declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado **VALIDACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)** es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyan en este documento.

A través de la presente declaración concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



---

**ALEJANDRA ESTEFANIA ZAMBRANO BASURTO**

**1314907328**

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Alejandra Estefanía Zambrano Basurto, con cédula de ciudadanía 1314907328, autorizo a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **VALIDACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.



---

**ALEJANDRA ESTEFANIA ZAMBRANO BASURTO**

**1314907328**

## CERTIFICACIÓN DE TUTOR

**ING. ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO, PhD**, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **VALIDACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**, que ha sido desarrollado por **ALEJANDRA ESTEFANIA ZAMBRANO BASURTO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

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

**TUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: **VALIDACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**, que ha sido desarrollado por **ALEJANDRA ESTEFANIA ZAMBRANO BASURTO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

Ing. Galo Cedeño Alexander García, M.Sc

CC: 1311956831

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Cristian Sergio Valdivieso López, M.Sc

CC: 1717929283

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Sergio Miguel Vélez Zambrano, M.Sc

CC: 1310476773

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## AGRADECIMIENTO

“La satisfacción más grande del ser humano, es ser grato, virtud que se demuestra con la lealtad, valor, amor y diferencia hacia todas aquellas personas que contribuyeron positivamente en nuestro desarrollo integral”. Por tal motivo, quiero dejar constancia de mi gratitud a:

Dios ser supremo del universo, a quien doy gloria y honra por haberme dado la vida y la sabiduría para concluir exitosamente este proceso de formación académica.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí quien día a día trabaja incansablemente por el bienestar universitario y la excelencia académica de sus estudiantes

A mi mamá Marilús Basurto por ser mi motor guía de todos mis sueños y metas gracias a ella estoy aquí luchando por mis metas, a mi padre Eduardo Zambrano quien me ayudo siempre a mis hermanos Fernando y Ángel a mis cuñadas Rita y Angélica sobrinos Mallerly y Davis y mi prima Margarita Basurto, porque siempre me apoyaron con palabras de constancia y perseverancia y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ellos que esta meta está cumplida.

Al Ing. Ángel Monserrate Guzmán Cedeño, Ph.D, tutor de esta tesis de grado, quien con su vasto conocimiento me brindó toda la asesoría necesaria para desarrollar satisfactoriamente este trabajo investigativo.

Ing. Diego Efrén Zambrano Pazmiño por ser mi cotutor en todo el desarrollo de mi tesis por ser mi guía día a día y sobre todo por ser ese gran amigo que siempre estuvo ahí en las buenas y en las malas, a el Ing. Sergio Vélez y Ing. Cristian Valdivieso por ser buenos amigos y por siempre brindarme buenos conocimientos.

A Valeria García por ser una buena amiga, compañera y sobre todo por ser mi gran hermana con ella viví los mejores momentos en mi vida universitaria, a Cristian Chila por ser un gran amigo incondicional a mis compañeros, porque con ellos viví momentos únicos, anécdotas, alegrías y tristezas, me brindaron su amistad a cambio de nada.

Mis catedráticos de la Carrera de Ingeniería Agrícola, por haberme impartido y nutrido de los mejores conocimientos científicos

*Alejandra Zambrano*

## DEDICATORIA

Con toda la humildad que emana de mi corazón, dedico esta tesis de grado a:

A Dios a mí, a mis padres; Marilús Basurto y Eduardo Zambrano, quienes en toda instancia me brindaron su apoyo incondicional y con amor, sacrificio, entrega, ejemplo y sabiduría supieron motivarme para culminar satisfactoriamente mis estudios universitarios, obtener un título académico y así asegurarme un futuro de múltiples oportunidades.

Mis hermanos, quienes también me apoyaron incondicionalmente y brindaron su afecto y amor fraternal, a mis bellos sobrinos, quienes son mi motor de inspiración y perseverancia para seguir creciendo día a día.

*Alejandra Zambrano*

## CONTENIDO GENERAL

<b>DECLARACIÓN DE AUTORIA.....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN .....</b>	<b>iii</b>
<b>CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....</b>	<b>iv</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>vii</b>
<b>CONTENIDO GENERAL .....</b>	<b>viii</b>
<b>CONTENIDO DE TABLAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<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. Objetivo específicos.....	3
1.4. Hipótesis.....	3
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
2.1. Fertilización fosfatada en los cultivos .....	4
2.2. Bacterias endófitas solubilizadoras de fósforo .....	5
2.2.1. Bio preparado a base de bacterias solubilizadoras .....	5
2.2.2. Bacteria solubilizadora liofilizada .....	6
2.2.3. Bacteria solubilizadora encapsulada .....	7
2.3. Referencia de eficiencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato .....	8
2.4. Bacterias endófitas y material de siembra usado en el estudio .....	11
2.4.1. Ceparios de bacterias endófitas de la espam mfl.....	11
2.4.2. Características agronómicas del material experimental, tomate floradade.....	12
<b>CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO .....</b>	<b>13</b>
3.1. Ubicación.....	13
3.2. Duración del trabajo.....	13
3.3. Fases del estudio.....	13

Fase 1: Efecto <i>in-vitro</i> de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato	
en la promoción del crecimiento de la raíz de la plántula de tomate.....	13
❖ Diseño experimental.....	14
Fase 2: Identificación molecular de las bacterias endófitas seleccionadas	
por su capacidad de promover el crecimiento de la raíz de la plántula	
de tomate .....	15
Fase 3: Evaluación de las cepas bacterianas, seleccionadas a partir	
de la identificación molecular, como promotoras del crecimiento de las	
plantas de tomate a nivel de macetas.....	15
❖ Multiplicación e inoculación .....	17
❖ Inoculante líquido.....	17
❖ Encapsulados .....	17
❖ Sobrenadante libre de células .....	17
❖ Testigo positivo.....	17
❖ Testigo negativo .....	17
❖ Preparación de las macetas .....	18
3.4. Datos tomados y métodos de evaluación.....	18
3.5. Análisis estadístico .....	19
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
Fase 1: Efecto <i>in-vitro</i> de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato	
en la promoción del crecimiento radical de plántulas de tomate .....	20
4.1. Longitud de raíz de la plántula de tomate <i>in-vitro</i> .....	20
4.2. Peso seco de la raíz de la plántula de tomate <i>in-vitro</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Fase 2: Identificación molecular de las bacterias endófitas seleccionadas por	
su capacidad de promover el crecimiento de la raíz de la plántula de	
tomate.....	21
Fase 3: Evaluación de las cepas bacterianas, seleccionadas a partir de la	
identificación molecular, como promotoras del crecimiento de plantas	
de tomate a nivel de macetas.....	23
4.5. Altura de planta a los 30, 60 y 90 días después de la siembra.....	23
4.6. Longitud de raíz a los 30, 60 y 90 días después de la siembra .....	24
4.7. Clorofila a los 15, 30 y 45 días después de la siembra.....	25
4.8. Peso fresco parte aérea de la planta de tomate .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

4.9. Peso seco parte aérea de la planta de tomate..... 25

4.10. Peso promedio del fruto ..... 26

**CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 28**

5.1. Conclusiones ..... 28

5.2. Recomendaciones ..... 28

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 29**

**ANEXOS ..... 36**

## CONTENIDO DE TABLAS

2.1. Solubilización de fosfato de bacterias endófitas a las 48 horas de incubadas en el estudio obtención de bacterias endófitas del tomatillo ( <i>Lycopersicon pinpinellifolium</i> L.) como promotoras de crecimiento vegetal, ESPAM MFL, 2020.....	12
3.1. Cepas bacterianas.....	13
3.3. Factor y niveles en estudio.....	16
3.4. Esquema ADEVA.....	16
4.1. Longitud radical de plántulas de tomate in-vitro ensayo por localidad.....	20
4.2. Promedio de longitud radical de tomate alcanzado in-vitro con las mejoras cepas alcanzada por localidad.....	21
4.3. Identificación molecular de bacterias .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4. Altura de planta del tomate variedad Floradade a los 30, 60 y 90 dds* .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5. Longitud de raíz de la planta de tomate variedad Floradade a los 30, 60 y 90 dds. ....	24
4.6. Clorofila de la planta de tomate variedad Floradade a los 15, 30 y 45 dds.....	25
4.7. Peso seco parte aérea de la planta de tomate variedad Floradade a los 30 y 60 dds... ..	25
4.8. Peso promedio del fruto de tomate variedad Floradade .....	26

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue la validación de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato como promotoras de crecimiento vegetal en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria y campus de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” ESPAM MFL, y se conformó de tres fases: la primera de laboratorio, consistió en determinar el efecto *in-vitro* de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato en la promoción del crecimiento de la raíz de plántulas de tomate, que permitió identificar cinco cepas de bacterias (CET-9, JETE-1, CHETE-3, QUEBE-2 y EETE-9) con potencial para promover el crecimiento radical. La segunda fase consistió en identificar molecularmente a bacterias endófitas, seleccionadas por su capacidad de promover el crecimiento radical de plántulas de tomate, encontrando que las cepas JETE-1 y QUEBE-2 pertenecen a las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter calcoaceticus*, con un 100% seguridad, mientras que las cepas CET-9 y CHETE pertenecen a la especie *Serratia surfactanfaciens* con 99,78% de similitud. En la tercera fase se determinó el efecto de las bacterias endófitas como promotoras del crecimiento de plántulas de tomate a nivel de macetas, donde los tratamientos con la aplicación de bacterias endófitas, mostraron mayor desarrollo vegetativo en relación al testigo y el mejor tratamiento fue el inoculante en medio líquido.

**PALABRAS CLAVE:** Bacterias promotoras de crecimiento vegetal, Microorganismos endófitos.

## ABSTRACT

The objective of the research was the validation of phosphate-solubilizing endophytic bacterium as plant growth promoters in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). The work was carried out in the Molecular Biology laboratory of the Veterinary Medicine career and campus of the Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" ESPAM MFL, and consisted of three phases: the first laboratory phase consisted of determining the effect in-vitro of phosphate-solubilizing endophytic bacteria in the promotion of root growth in tomato seedlings, which allowed the identification of five strains of bacterium (CET-9, JETE-1, CHETE-3, QEBE-2 and EETE-9) with potential to promote radical growth. The second phase consisted of molecularly identifying endophytic bacterium, selected for their ability to promote the radical growth of tomato seedlings, finding that the JETE-1 and QEBE-2 strains belong to the species *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus*, with 100% safety, while the CET-9 and CHETE strains belong to the *Serratia surfactantifaciens* species with 99.78% similarity. In the third phase, the effect of endophytic bacterium as promoters of the growth of tomato seedlings at the pot level was determined, where the treatments with the application of endophytic bacteria showed greater vegetative development in relation to the control and the best treatment was the inoculant in liquid medium.

**KEY WORDS:** Plant growth promoting bacterium, Endophytic microorganisms

# **CAPÍTULO I. ANTECEDENTES**

## **1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

El fósforo favorece la maduración de los cultivos de manera tal que la ausencia de esta afecta la calidad del fruto, en el Ecuador la plantación de tomate se da mayormente en la región Sierra, más específicamente en las provincias de Imbabura, Chimborazo y Carchi (SINAGAP, 2011). Siendo estas las provincias de mayor producciones de tomate, no obstante las demás provincias productoras en otras regiones del país presentan deficiencias de fósforo lo que provoca que la producción no crezca al mismo nivel y por ende disminuya la productividad y los tiempos de cosecha no lleven una secuencia, otro factor determinante son los escasos estudios de suelo lo que produce que las dosis de fertilizantes fosfatados no sean aplicados en función de la necesidad del suelo generando una desertificación de los suelos y una baja productividad.

El fósforo insoluble es un problema no solo para el crecimiento de la planta y rendimiento de la cosecha, sino también a la calidad del fruto y a la formación de las semillas. Asimismo, la carencia de fósforo puede retrasar la maduración de las cosechas, con lo que se retrasa la recolección y se pone en riesgo la calidad del producto (Bobadilla y Rincón, 2008).

Los mecanismos de transformación del fósforo incluyen a las bacterias solubilizadoras de fosfatos que representan una alternativa al uso de fertilizantes químicos al aumentar la disponibilidad de este elemento en el suelo. Pueden solubilizar y mineralizar el fósforo desde fuentes inorgánicas y orgánicas del fósforo total del suelo, actuando como biofertilizantes (Oliveira et al., 2009).

Los microorganismos solubilizadores de fósforo constituyen hasta un 40% de la población de bacterias del suelo y una porción significativa de ellos son aislados de la rizósfera. No obstante, aunque muchos géneros bacterianos presentan esta capacidad para solubilizar fósforo inorgánico, es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que tengan otras propiedades de promoción de crecimiento vegetal, como por ejemplo, capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Patiño y Reyes, 2014).

Actualmente se comercializan productos a base de bacterias y hongos etiquetados como eficientes, en el lugar de origen, para promover el desarrollo de los cultivos; sin embargo, puede que no funcionen cuando se aplican en condiciones diferentes en las que fueron aislados (Harinathan et al., 2016).

Es importante que se incorporen cepas bacterianas como el caso de la investigación realizada por Von y Dussán (2015), donde, diferentes cepas bacterianas han sido propuestas como la mejor alternativa ecológica para la solubilización de fósforo en los suelos y, consecuentemente, para fortalecer el crecimiento vegetal.

Por lo anteriormente descrito se plantea la siguiente interrogante: ¿De qué forma las cepas bacterianas endófitas locales promueven el desarrollo vegetativo y productivo del cultivo de tomate a nivel de macetas?

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control para fitopatógenos en diversos cultivos, se ha comprobado que los mecanismos de control biológico mediado por bacterias endófitas están basados en diferentes mecanismos los cuales incluyen antibiosis, la competencia por los nutrientes y nichos (CNN) y la resistencia sistémica inducida (ISR). Hasta ahora, sólo el papel de la ISR en el control biológico mediado por endófitas ha sido confirmado en plantas (Pérez et al., 2013).

Carvalho et al. (2014), indican que estos microorganismos emplean ciertos mecanismos como la conversión biológica del nitrógeno (N), la producción de fitohormonas auxinas (ácido indol-3-acético) (Spaepen et al., 2007); citoquininas y giberelinas (Shi et al., 2016).

La Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López cuenta con un cepario de bacterias endófitas debidamente caracterizadas por su función como promotoras del crecimiento vegetal y favorecer la salud de las plantas. Por lo cual es de vital importancia la validación de este cepario conservado en el laboratorio de la Biología Molecular de la ESPAM MFL. Según estudio realizado por Intriago y Plaza (2020), estas cepas fueron evaluadas como

solubilizadoras de fosfato, cuyos resultados inducen a validarlas como promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de interés agroalimentario.

Además, este proyecto aporta a lo propuesto por la Organización de Naciones Unidas (ONU, 2015) en el documento Transformar nuestro mundo: Agenda 2030 Con el desarrollo sostenible, en su objetivo número 15: “Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener o revertir la degradación de las tierras y la pérdida de biodiversidad con su meta 15.6: De aquí a 2030, promover la participación justa y equitativa en los beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos y promover el acceso adecuado a esos recursos, según lo convenido internacionalmente”.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Validar bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato como promotoras de crecimiento vegetal en plántulas de tomate en la etapa de vivero.

#### **1.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto *in-vitro* de la inoculación de bacterias endófitas solubilizadoras de fosfato en la promoción del crecimiento de la raíz de la plántula de tomate.
- Identificar molecularmente bacterias endófitas seleccionadas por su capacidad de promover el crecimiento de la raíz de la plántula de tomate.
- Estimar el efecto de la inoculación de las bacterias endófitas en la promoción del crecimiento de las plantas de tomate a nivel de macetas.

### **1.4. HIPÓTESIS**

Con la aplicación de las bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal se mejorará el desarrollo de las plantas del tomate a nivel de macetas.

## CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. FERTILIZACIÓN FOSFATADA EN LOS CULTIVOS

La respuesta de los cultivos a la fertilización fosfatada depende del nivel de P disponible en el suelo, pero también es afectada por factores del suelo, del cultivo y de manejo del fertilizante. Entre los factores del suelo, se destacan la textura, la temperatura, el contenido de materia orgánica y el pH; mientras que entre los del cultivo deben mencionarse los requerimientos y el nivel de rendimiento (García, 2018).

De acuerdo con Camozzi (2017), para el tomate, si bien las extracciones de P son de escasa magnitud, el cultivo requiere alta disponibilidad de P en el suelo para su normal crecimiento. Si las temperaturas primaverales son bajas, la necesidad de este nutriente es mayor. La cantidad de P a agregar dependerá de los contenidos en el suelo y del material genético empleado. En general, los cultivares de polinización abierta presentan menores requerimientos de fertilización que los híbridos que tienen un mayor potencial de producción.

Según Giovannini (2017) el uso de fósforo se ha transformado en una práctica de alto costo por el agotamiento que se está produciendo de las fuentes de calidad de fósforo, lo que implica aplicar los tratamientos industriales a rocas de menor calidad, incrementando los costos para obtener los mismos resultados y esto conduce a la necesidad de buscar alternativas. Algunos microorganismos, conocidos como solubilizadores de fósforo, transforman el fósforo insoluble en soluble a través del proceso de acidificación, quelación e intercambio de iones.

Este proceso no solo compensa los altos costos de manufactura de los fertilizantes, sino que moviliza los fertilizantes agregados al suelo. Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento, sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales (Fernández et al., 2015).

## **2.2. BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO**

Los mecanismos de transformación del fósforo incluyen a las bacterias solubilizadoras de fosfatos que representan una alternativa al uso de fertilizantes químicos al aumentar la disponibilidad de este elemento en el suelo. Pueden solubilizar y mineralizar el fósforo desde fuentes inorgánicas y orgánicas del fósforo total del suelo, actuando como biofertilizantes (Oliveira et al., 2009). La mineralización del fósforo orgánico es llevada a cabo por acción de fosfatasas, mientras que la producción de ácidos es el principal mecanismo por el cual las bacterias solubilizan fosfatos (Antoun, 2018).

Las bacterias endófitas son aquellas aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Pérez et al., 2016). Estudios indican que las bacterias endófitas ejercen control biológico sobre fitopatógenos (Sessitch et al., 2015), promueven el crecimiento en las plantas hospederas (Tsavkelova et al., 2017), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 2018), contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno (Hurek y ReinholdHurek, 2016), solubilización de fosfato y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Berg et al., 2015).

Las bacterias endófitas son fuentes de una gran diversidad de diferentes metabolitos, la mayoría de estos compuestos han sido identificados en las plantas, pero estas bacterias son una fuente inagotable de más de 20.000 compuestos biológicamente activos, que influyen en el rendimiento y supervivencia de otros organismos (Pérez y Chamorro, 2015).

Hay diversas maneras de usar estos microorganismos como insumos agrícolas. A continuación se presentan las alternativas de preparación y aplicación de las bacterias solubilizadoras y/o Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV):

### **2.2.1. BIO PREPARADO A BASE DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS**

En la identificación macroscópica de las bacterias con mayor actividad solubilizadora de fosfato se tuvieron en cuenta la morfología de las colonias, el tamaño, el color, el borde, la elevación y la forma de la superficie. En la

identificación microscópica se consideraron el tipo de pared y de agregación, mediante tinciones específicas. Para la identificación del género y la especie de las dos bacterias se utilizó el sistema de multipruebas API 20 (API System, S.A., La-Balme-les-Grottes, Francia) y las bases de datos de Apiweb (Lara et al., 2018).

Siguen manifestando que los bioinoculantes se prepararon a partir de las bacterias seleccionadas por desarrollar mayor actividad solubilizadora de fosfato, en un medio líquido NBRIP, en las concentraciones  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL, y bajo las condiciones de pH 6.8, con aireación adecuada por agitación y tiempo de incubación de 48 h.

Los bioinoculantes se produjeron en Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de caldo nutritivo estéril, cada Erlenmeyer se inoculó con los microorganismo eficientes y se incubó a temperatura ambiente ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), manteniendo una agitación constante de 150 rpm en un shaker por un período de 24 h; con el fin confirmar la concentración celular en cada bioinoculante se evaluó el crecimiento por el método de diluciones seriadas, al final del proceso (Mantilla y Peñata, 2015).

### **2.2.2. BACTERIA SOLUBILIZADORA LIOFILIZADA**

Para Andina (2019), entre los endófitos, están las BPCV que presentan un metabolismo versátil con capacidad de utilizar diversos sustratos liberados por la planta para su desarrollo. Al estar menos afectados por estrés ambiental y más aclimatado con su simbionte, pueden representar una mayor ventaja ecológica. El mecanismo principal de los promotores de crecimiento incluye, la producción de fitohormonas (giberelinas, citocininas y auxinas), sideróforos, antibióticos induciendo a una resistencia sistémica a patógenos, a la solubilización y movilización de fosfatos.

La liofilización es un proceso en el cual el agua es removida por evaporación de las suspensiones bacterianas congeladas, ha permitido la preservación exitosa de una gran variedad de especies bacterianas (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clastridium*, *Corynebacterium*, *Haemophilus* y *Staphylococcus*) por más de 30 años. Las bacterias liofilizadas pueden permanecer viables almacenadas a bajas temperaturas por muchos años si permanecen apartadas del oxígeno, el polvo y

la luz, de igual forma, ser fácilmente rehidratadas y restauradas a su estado original en cualquier momento (Gutiérrez, 2018).

Para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los liofilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos. De esta forma la liofilización es un buen sistema de conservación de cultivo de microorganismos porque la operación es compatible con el procesamiento en condiciones que evitan o minimizan las posibilidades de contaminación (García, 2019).

La conservación de microorganismo de interés industrial es una técnica básica en todo el proceso. La conservación ha de estar encaminada al mantenimiento de las cepas altamente productivas durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés. Para lograr estas condiciones se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original (Arencibia et al., 2019).

### **2.2.3. BACTERIA SOLUBILIZADORA ENCAPSULADA**

La encapsulación de microorganismos permite el aislamiento físico y proporciona protección contra factores de medio ambiente o físico-químicos del suelo, permitiendo la liberación gradual del agente encapsulado. Además, estas cápsulas ofrecen la posibilidad de recuperar el agente ya que constituye un micro-entorno interno adecuado para las bacterias (Medina et al., 2016).

Los mismos autores manifiestan que la encapsulación es un método que se emplea para proteger o proporcionar una cubierta a sustancias inestables, para enmascarar sabores, almacenar sustancias y transformar productos de uso tradicional en desarrollos tecnológicos avanzados. Se utiliza diferentes

concentraciones de alginato de sodio y concentraciones de cloruro de calcio para lograr mejores rendimientos, estabilidad y viabilidad.

### **2.3. REFERENCIA DE EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO**

La aplicación de consorcios bacterianos aplicados a plantas de tomate en invernadero promovía la asimilación de fósforo; sin embargo, se encontró que no todas las bacterias aplicadas en dicho consorcio se establecían en la rizosfera. Se evaluó la capacidad de 17 cepas bacterianas agrupadas en dos consorcios para promover la asimilación de fósforo. Se hicieron dos bioensayos en las que se evaluaron 19 tratamientos y el control absoluto, todos con 10 repeticiones por tratamiento. Se utilizó como sustrato: peatmoss + suelo de Navidad, N.L + roca Fosfórica y con una fertilización de 0% de fósforo (Santiago, 2017).

El autor anterior sigue manifestando que las plantas que presentaron mejor resultado fueron las que se inocularon con las cepas CBLA-208 (*Psuedonoma* sp), CBLA-172 (*Psuedomonas* sp) y CBLA-88 (*P. aeruginosa*). Las variables evaluadas fueron: índice de deficiencia de fósforo, altura de la planta, peso seco de la raíz, peso seco foliar, fósforo foliar g/Kg y fósforo foliar en miligramos por planta.

Para Espinoza (2016), la promoción del crecimiento vegetal directa por las Rizobacterias Promotora del Crecimiento Vegetal (RPCV) se puede derivar de la solubilización del fósforo, producción de reguladores de crecimiento, tales como auxinas, giberelinas (Gas), citoquininas e inhibidores de etileno, mediante la obtención de las actividades metabólicas de las raíces y/o mediante el suministro de nitrógeno fijado biológicamente. La promoción indirecta del crecimiento de las plantas se efectúa cuando las RPCV producen sideróforo los cuales pueden solubilizar y quelar el hierro de la rizósfera y así de este modo inhiben el crecimiento de uno o más microorganismo fitopatógenos.

El mismo autor menciona que las actividades positivas que ejercen las RPCV en las plantas pueden incluir aquellas que son de interés agrícola, logrando incrementos en la producción y reducción de costos y no causan daños al ambiente o la salud humana, además algunas RPCV tienen, también una función en la degradación de contaminantes orgánicos.

En un estudio realizado por Angulo et al. (2015), se determinó el efecto de diferentes cepas promotoras de crecimiento, tanto fijadoras de nitrógeno como solubilizadoras de fósforo. Se presentaron dos cepas de *B. pumilus*, solubilizadoras de fósforo. Se considera, que los microorganismos del suelo, que solubilizan distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico, es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutrientes disponibles para las plantas.

Las investigaciones revelan que las bacterias endófitas tienen la capacidad de promover el crecimiento y aportar nutrientes para el desarrollo de la planta, fijar nitrógeno y solubilizar fosfato, aumentar la resistencia de la planta actuando como biocontrolado, promover la fitoremediación y producir metabolitos secundarios y otros productos naturales empleados en la medicina como antibióticos, antivirales, antioxidantes, entre otros (Shweta et al., 2017).

De acuerdo con Moreno et al. (2018), los mecanismos de transformación del fósforo incluyen a las bacterias solubilizadoras de fosfatos que representan una alternativa al uso de fertilizantes químicos, al aumentar la disponibilidad de este elemento en el suelo pueden solubilizar y mineralizar el fósforo desde fuentes inorgánicas y orgánicas del fósforo total del suelo actuando como biofertilizantes. La mineralización del Fósforo orgánico es llevada a cabo por acción de fosfatasas, mientras que la producción de ácidos es el principal mecanismo por el cual las bacterias solubilizan fosfatos (Antoun, 2018).

Estudios realizados por Chuang et al. (2017), sobre la solubilización de fosfatos por parte de hongos en medios de cultivos, demuestran que estos microorganismos solubilizan fósforo insoluble en medios de cultivos con una reducción concomitante en el valor del pH. Así mismo sostienen que el mayor contenido de protones responsables de la reducción del pH pudo deberse a la producción de ácidos orgánicos y/o a la excreción de  $H^+$  que acompaña a la asimilación del  $NH_4^+$  presente en el medio.

Según Pérez et al. (2015), las bacterias endófitas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* entre otras, han sido reportadas como solubilizadoras de fosfatos insolubles y de promover el crecimiento de las plantas. Hameeda et al. (2018), reportaron que las bacterias *Serratia marcescens* EB 67 y *Pseudomonas* sp incrementan la producción de biomasa

en plantas de maíz en condiciones de campo e invernadero, mediante la capacidad de solubilizar fosfatos.

Con relación a lo expuesto las bacterias solubilizadoras de fosfato llevan a cabo la conversión de fósforo insoluble a soluble en fosfatos y ortofosfatos mediante la secreción de ácidos orgánicos. Existen dos mecanismos principales para la solubilización del fósforo inorgánico. El primero es un intercambio del ácido, por ejemplo, los H<sup>+</sup> provenientes del citrato se intercambian por el Fósforo ligado a la superficie de los cristales del Al (OH)<sup>3</sup> o Fe (OH)<sup>3</sup>, los reducen y liberan el fósforo. El segundo mecanismo depende de la concentración de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos, ya que a través de sus grupos *hidroxil* y *carboxil* se quelan los cationes unidos al fosfato y lo convierten en formas solubles (Trivedi y Sa, 2016).

Por esta razón, los autores antes mencionados sostienen que la importancia de algunos microorganismos, los cuales a través de diferentes mecanismos logran poner éste fósforo a disposición de las plantas. Los principales mecanismos son por medio de asociaciones *micorrízica*, que provocan una mayor extensión del sistema radicular y por estimulación de procesos metabólicos, especialmente excreción de ion hidrógeno, liberación de ácidos orgánicos (*cítrico, oxálico, glucónico, láctico, málico etc*), producción de *sideróforos* y la producción de la enzima fosfatasa, que es útil para la hidrólisis del fósforo orgánico del suelo.

En una investigación de Scattareggia (2016), se realizó el aislamiento de los endófitos presentes en las semillas de tomate de las variedades Elpida y Silverio, y luego la identificación utilizando la técnica PCR. Con estos aislamientos se realizó la determinación de la promoción del crecimiento de plantines de tomate en ensayos en cámara de cultivo.

Sigue manifestando que el diseño que usaron fue el estadístico de bloques completamente al azar, donde se evaluaron las 10 cepas obtenidas, una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (control positivo) y un control sin inocular, con 10 repeticiones de cada una. Las variables evaluadas fueron: peso fresco radicular, volumen radicular, y peso seco aéreo y radicular. Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza y las comparaciones de medias mediante la prueba de LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ). Por otro lado, se determinó la capacidad de los aislados para producir ácido indol acético (AIA), sideróforos,

fijar nitrógeno molecular y solubilizar fósforo inorgánico, en medios de cultivo adecuados. Además, estos ensayos se complementaron con pruebas para evaluar la producción de biofilm y la capacidad de autoagregación.

De los 10 aislados con los que se trabajó, las cepas 15, 6, 4 y 8 tuvieron un impacto positivo en la promoción del crecimiento radical y las cepas 39 y 38 se destacaron en cuanto a los parámetros asociados a la parte aérea. Las bacterias se identificaron como pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp y *Paenibacillus polymyxa*.

Es decir que mediante esta investigación los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* tienen la ventaja de producir endósporas, que por ser estructuras altamente resistentes a las altas temperaturas, cambios osmóticos, radiaciones y variaciones de pH, permiten una mayor supervivencia en condiciones estresantes. De manera que al permanecer metabólicamente inactivas pero viables bajo condiciones adversas, los hace apropiadas para la formulación de productos estables, facilitando su comercialización y aplicación.

## **2.4. BACTERIAS ENDÓFITAS Y MATERIAL DE SIEMBRA USADO EN EL ESTUDIO**

### **2.4.1. CEPARIOS DE BACTERIAS ENDÓFITAS DE LA ESPAM MFL**

En el Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL se encuentra un cepario con 63 cepas de bacterias endófitas, aisladas y seleccionadas como potenciales solubilizadoras de fósforo y posibles promotoras de crecimiento vegetal, las cuales fueron obtenidas en diferentes ambientes edáficos en la provincia de Manabí. Se encuentran conservadas en tubos de ensayo con agar nutritivo en refrigeración a 4°C. De acuerdo a Intriago y Plaza, (2020), de este cepario 51 aislados presentaron actividad positiva para la solubilización de fosfatos, como se indica en la tabla 2,1.

**Tabla 2.1.** Solubilización de fosfato de bacterias endófitas a las 48 horas de incubadas en el estudio obtención de bacterias endófitas del tomatillo (*Lycopersicon pinpinellifolium* L.) como promotoras de crecimiento vegetal, ESPAM MFL, 2020.

Códigos	Halo (mm)	Códigos	Halo (mm)	Códigos	Halo (mm)	Códigos	Halo (mm)
CET P4 1R-5	2,5 a	JETE P2 R-8	2,26 a	CHETE P3 R-5	2,86 a	EETE P4 T-6	2,43 a
CET P4 R-5	2,48 a	JETE P3 R-6	2,1 ab	CHETE P3 R-6	2,85 a	EETE P5 R-8	2,4 ab
CET P3 R-8	2,3 ab	JETE P2 R-5	1,85 abc	CHETE P5 T-5	2,77 a	EETE P3 R-8	2,37 ab
CET P3 1 R-7	2,13 ab	JETE P4 T-6.	1,78 abc	CHETE 2P5 R-5	2,69 a	EETE P4 T-8	2,33 ab
CET P5 T-5	2,06 abc	JETE P3 R-7	1,61 bc	CHETE P3 T-5	2,63 a	EETE P5 R-7	2,21 ab
CET P3 1 T-8	1,93 abc	JETE P3 T-5	1,54 bc	CHETE 1P5 R-5	2,56 a	EETE P2 T-6	2,19 ab
CET P3 2 T-7	1,92 abc	JETE P4 T-6	1,46 c	CHETE P4 R-5	2,56 a	EETE P2 R-5	2,19 ab
CET P2 2 R-5	1,8 bc	JETE P5 R-6	1,39 c	CHETE P4 T-7	2,51 a	EETE P3 R-7	2,18 ab
CET P2 R-8	1,51 c	<b>p-valor=</b>	<b>0,0019 **</b>	CHETE P4 T-5	2,33 a	EETE P3 T-5	2,18 ab
<b>p-valor=</b>	<b>0,0003 **</b>	<b>C.V. %=</b>	<b>12,87</b>	CHETE P2 T-6	2,32 a	EETE P3 T-7	2,17 ab
<b>C.V. %=</b>	<b>10,18</b>			CHETE 1P3 R-6	2,29 a	EETE P2 T-7	2,14 ab
				<b>p-valor=</b>	<b>0,081 Ns</b>	EETE P5 T-7	2,12 ab
QEBE P R5 -8	2,16 a			<b>C.V. %=</b>	<b>9,74</b>	EETE P4 R-6	2,11 ab
QEBE P1 T1 -5	2,03 ab					EETE P5 T-6	2,06 ab
QEBE P1 T3 -5	1,98 ab					EETE P2 R-7	2,02 ab
QEBE P1 T2 -7	1,91 ab					EETE P3 T-6	1,96 ab
QEBE P2 T1 -5	1,68 ab					EETE P5 T-5	1,91 b
QEBE P3 T1 -6	1,5 b					<b>p-valor=</b>	<b>0,015 *</b>
<b>p-valor=</b>	<b>0,0393 *</b>					<b>C.V. %=</b>	<b>7,5</b>
<b>C.V. %=</b>	<b>12,18</b>						

**Descripción de los códigos:** CET= Calceta, QEBE= Quiroga, JETE= Junín, CHETE= Chone y EETE= Estancilla.  
P= Planta, R= Raíz, T= Tallo y -5,-6,-7,-8= número de dilución.

## 2.4.2. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL MATERIAL EXPERIMENTAL, TOMATE FLORADADE

Según Rodríguez y Morales (2007), la variedad Floradade tiene un tomate tipo manzano, de excelente calidad y alto rendimiento, sus frutos son grandes de forma globular, color rojo intenso, también tiene resistencia a *Verticillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Se inicia la cosecha a los 80 días después del trasplante, es de hábito semi-indeterminado.

La variedad de tomate Floradade es de ciclo medio posee frutos de buen tamaño, redondos de un peso promedio de 260-300 g con pulpa rojo y consistente, es de crecimiento indeterminado, es decir que presentan inflorescencias más espaciadas y de un porte alto, pueden crecer indefinidamente si encuentran condiciones óptimas y se caracterizan por desarrollar bejucos o tallos largos y mucho follaje (García, 2019).

## CAPITULO 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 y campus de la ESPAM MFL, 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. DURACIÓN DEL TRABAJO

El trabajo tuvo una duración de 14 meses, desde septiembre del 2020 a octubre del 2021.

### 3.3. FASES DEL ESTUDIO

#### FASE 1: EFECTO *IN-VITRO* DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE LA PLÁNTULA DE TOMATE

#### FACTOR EN ESTUDIO

**Tabla 3.1.** Cepas bacterianas

Factor	Niveles/tratamientos				
	Calceta	Junín	Estancilla	Chone	Quiroga
<b>Bacterias endófitas Solubilizadoras de fosfato</b>	a1. CET1	a10. JETE1	a18. EETE1	a35. CHETE1	a46. QEBE1
	a2. CET 2	a11. JETE2	a19. EETE2	a36. CHETE2	a47. QEBE2
	a3. CET3	a12. JETE3	a20. EETE3	a37. CHETE3	a48. QEBE3
	a4. CET4	a13. JETE4	a21. EETE4	a38. CHETE4	a49. QEBE4
	a5. CET5	a14. JETE5	a22. EETE5	a39. CHETE5	a50. QEBE5
	a6. CET6	a15. JETE6	a23. EETE6	a40. CHETE6	a51. QEBE6
	a7. CET7	a16. JETE7	a24. EETE7	a41. CHETE7	
	a8. CET8	a17. JETE8	a25. EETE8	a42. CHETE8	
	a9. CET9		a26. EETE9	a43. CHETE9	
			a27. EETE10	a44. CHETE10	
			a28. EETE11	a45. CHETE11	
			a29. EETE12		
			a30. EETE13		
			a31. EETE14		
			a32. EETE15		
			a33. EETE16		
			a34. EETE17		

<sup>1</sup> Datos tomados en la estación meteorológica del INANMI, situada en la ESPAM MFL correspondiente al periodo; enero 2012 a junio 2019.

## ❖ DISEÑO EXPERIMENTAL

Con los aislados de cada localidad se realizó un esquema experimental diferente. Por ejemplo, con los aislados de Calceta nueve tratamientos con tres replicas y 27 unidades experimentales. Para los aislados de Junín, ocho tratamientos, tres replicas y 24 unidades experimentales. Para los aislados de la Estancilla, 17 tratamientos, tres replicas y 51 unidades experimentales. Para los aislados de Chone, 11 tratamientos, tres replicas y 33 unidades experimentales, y finalmente con los aislados de Quiroga, seis tratamientos, tres replicas y 18 unidades experimentales.

## ❖ UNIDAD EXPERIMENTAL

Para todos los aislados, independientemente de su origen, la unidad experimental se conformó de una caja Petri (90 mm) con cinco semillas de tomate variedad Floradade, para todos los ensayos de esta fase.

## ❖ REACTIVACIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS ENDÓFITOS

A partir de las cepas conservadas a 4°C se procedió a sembrarlas en agar nutritivo, se incubaron a 37°C durante 18 horas (h); posteriormente se realizó la tinción de Gram para ver si es Gram positiva o Gram negativa. A partir de las cepas bacterianas reactivadas se tomó una porción y se colocó en 100 mL de caldo nutritivo, a continuación, se incubaron a 37°C durante 18 h.

## ❖ INOCULACIÓN DE LAS SEMILLAS

A partir del cultivo bacteriano multiplicado en caldo nutritivo se aplicó cinco mL en cajas Petri con papel filtro, previamente se colocó las cinco semillas de tomate por cada replica, a continuación, se dejó en oscuridad durante 15 días para su posterior evaluación.

## ❖ INGREDIENTE ACTIVO (PELLET)

Las bacterias multiplicadas en caldo nutritivo se centrifugaron a 6000 rpm durante cinco minutos, a continuación, se realizó un lavado y se volvió a centrifugar. Al ingrediente activo obtenido (1 mL) se le añadió 100 mL de agua y se inoculó 5 mL en cajas petrí con papel filtro, seguidamente se colocaron cinco

semillas de tomate por réplica y se dejó en oscuridad durante 15 días para su posterior evaluación.

#### ❖ EVALUACIÓN

La evaluación se realizó a los 15 días y se midió la longitud de raíz de las plántulas de tomate en mm, utilizando un calibrador Vernier (Electronic digital Caliper) el procedimiento se ajustó a lo indicado por Bobadilla (2017).

### **FASE 2: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS ENDÓFITAS SELECCIONADAS POR SU CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE LA PLÁNTULA DE TOMATE**

En cada ensayo realizado en la fase uno de laboratorio se escogió la cepa que promovió el mejor desarrollo radical de la semilla de tomate germinada *in-vitro*, las cuales fueron enviadas al laboratorio IDgen, para su identificación molecular. La metodología de secuenciación corresponde al protocolo del laboratorio al cual se enviaron las muestras. De acuerdo a los resultados de la identificación molecular se usaron en la tercera fase dos cepas (CET-9 y EETE-9) pertenecientes a *Serratia surfactanfaciens* consideradas inocuas para el uso agronómico. De acuerdo Stankovic et al. (2014) se ha demostrado que la especie *surfactanfaciens* del género *Serratia* produce un pigmento llamado prodigiosina, tiene actividades antimicrobianas (antifúngicas, antibacterianas, antiprotozoarias), antipalúdicas, antitumorales e inmunosupresoras a niveles no tóxicos. Otros metabolitos secundarios importantes son las serrawettins, que son biosurfactantes útiles producidos por *Serratia* (Soberón y Maier, 2011).

### **FASE 3: EVALUACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS, SELECCIONADAS A PARTIR DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE TOMATE A NIVEL DE MACETAS**

Las cepas identificadas a nivel molecular se inocularon en condiciones de vivero, de acuerdo al siguiente delineamiento experimental:

#### ❖ FACTOR EN ESTUDIO

**Tabla 3.3.** Factor y niveles en estudio

<b>Factor en estudio</b>	<b>Niveles</b>
Inoculación de bacterias endófitas en diferentes vehículos	a1. Bioinoculante en medio líquido
	a2. Bioinoculante encapsulado
	a3. Sobrenadante libre de células

#### ❖ **TRATAMIENTOS**

a1. Bioinoculante en medio líquido

a2. Bioinoculante encapsulado

a3. Sobrenadante libre de célula

T1. Fosfato monobásico de potasio (testigo positivo)

T2. Sin inóculo (testigo negativo)

#### ❖ **UNIDAD EXPERIMENTAL**

La unidad experimental estuvo conformada por tres plantas, depositadas en fundas de vivero de la siguiente manera: para las plantas evaluadas a los 30 días se utilizó fundas de 10 x 16 pulgadas, a los 60 días se usó fundas de 12 x 20 pulgadas y a los 90 días se utilizó fundas de 18 x 22 pulgadas.

#### ❖ **DISEÑO EXPERIMENTAL**

El trabajo se realizó a través de un Diseño Completamente al Azar. Cada tratamiento se repitió cuatro veces.

**Tabla 3.4.** Esquema ADEVA

<b>Fuente de variación</b>	<b>G.L</b>
Tratamiento	4
Error	15
Total	19

#### ❖ **MANEJO DEL EXPERIMENTO**

En los tres vehículos evaluados se realizó la inoculación tres días antes de la siembra para que la bacteria colonice el sustrato, posteriormente se realizó la siembra de la semilla de tomate. A los 30 días se hizo una re-inoculación de los tratamientos en estudio.

## **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

### **❖ MULTIPLICACIÓN E INOCULACIÓN**

Las cepas se multiplicaron en caldo nutritivo y se incubó durante 18 h a 37°C. Se utilizó tres vehículos para transportar los microorganismos: inoculante líquido, encapsulado en polímeros de alginato y sobrenadante libre de células.

### **❖ INOCULANTE LÍQUIDO**

Para este vehículo se preparó caldo nutritivo se inoculó y se incubó a 37°C durante 18 h, posteriormente se centrifugó para obtener el pellet 1 g luego se disolvió con 99 mL de agua destilada. La inoculación se realizó aplicando 5 mL de la bacteria desarrollada directamente a la funda (planta).

### **❖ ENCAPSULADOS**

Las bacterias multiplicadas en caldo nutritivo se centrifugó 6000 rpm, durante cinco minutos, se realizó lavados con agua destilada estéril, 1 g del ingrediente activo se mezcló con 100 mL de alginato de calcio (1,6%) posteriormente se dejó caer sobre una solución de cloruro de calcio (3%), luego se pesó 5 g para aplicar a la funda (planta), de acuerdo a lo sugerido por Rumino (2005).

### **❖ SOBRENADANTE LIBRE DE CÉLULAS**

A partir del inoculante líquido se obtuvo el sobrenadante libre de células para esto se lo pasó por papel filtro luego se obtuvo 100 mL, se aplicó 5 mL de sobrenadante libre de células directamente a la funda (planta).

### **❖ TESTIGO POSITIVO**

Se pesó 0,34 g de fosfato monobásico de potasio se disolvió en 100 mL de agua destilada se disolvió y luego se aplicó 5 mL directamente a la funda (planta).

### **❖ TESTIGO NEGATIVO**

Sin inóculo

## **PREPARACIÓN DE LAS MACETAS**

**PREPARACIÓN DE SUSTRATO:** Se preparó en forma general una porción 3,1; en la cual se procedió a dividir en tres partes de sustrato de cacao y una parte de abono orgánico.

**LLENADO DE FUNDAS:** Una vez preparado el sustrato se colocó en las macetas

**SIEMBRA:** Se lo realizó de manera manual colocando dos semillas de tomate variedad Floradade, dejando una planta al raleo.

**RIEGO:** Se lo realizó manualmente utilizando una probeta de 100 mL antes y después de la siembra, esto se lo hizo según el requerimiento hídrico del cultivo de tomate.

**CONTROL DE MALEZAS:** Se ejecutó de manera manual.

**CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES:** Se usaron insecticidas orgánicos como el Neem y trampas cromáticas para reducir las entradas de vectores y con ello la transmisión de enfermedades también se utilizó imidacloprid.

**TUTORADO:** Se lo realizó a los 30 días contando desde el día de la siembra, sobre todo a las plantas que se evaluó en la fase de producción.

**COSECHA:** Se ejecutó de forma manual para conservar la calidad de los frutos.

### **3.4. DATOS TOMADOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN**

Cada tratamiento estuvo constituido por tres plantas en sus respectivas macetas en la cual se tomó los datos de la siguiente manera, pasando 30 días se eliminó una planta para tomar los datos correspondiente y así mismo con la planta de los 60 y 90 días por cada réplica.

#### **❖ ALTURA DE TALLO (cm)**

Esta variable se midió después de que las plantas cumplieron su período de 30, 60 y 90 días se usó, una planta de cada unidad experimental. Se les separó la raíz, tallo y hojas. La longitud del tallo consistió en evaluar desde su base hasta la parte apical, utilizando una cinta métrica. Esta variable fue expresada en centímetros.

#### ❖ LONGITUD DE LAS RAÍCES (cm)

Para esta variable se tomó una planta de cada unidad experimental midiendo la longitud de la raíz principal, del cuello de la raíz hasta el extremo inferior de esta a los 30, 60 y 90 días y para esto se utilizó una cinta métrica graduada en centímetros, según la metodología propuesta por García (2015).

#### ❖ CONTENIDO DE CLOROFILA

Esta evaluación se realizó en la planta de tomate a los 15, 30 y 45 días de establecidas en condiciones de vivero, se realizó la concentración de clorofila en tres folíolos tomados al azar del tercio bajo, medio y superior de cada planta empleando el clorofilímetro Minolta SPAD 502 plus. El registro de unidades SPAD se realizó entre las 11:00 y 14:00 horas, siguiendo lo descrito por Tubay et al. (2017).

#### ❖ PESO SECO PARTE AÉREA (g)

Una vez que se obtuvo el peso fresco de tallos y hojas de las plántulas, ambos tejidos se colocaron en una estufa de secado (Marca Shel-Lab, modelo FX-5, serie-1000203) a una temperatura de 80°C durante 72 h hasta obtener su deshidratación completa. Posteriormente se pesó en balanza analítica (Marca Electronic SCALE, 5000 g/0.01 g) y el peso fue expresado en gramos de materia vegetal seca, según la metodología de Murillo et al. (2017).

#### ❖ PESO DE FRUTO (g)

Para esta variable se pesó el fruto en gramos, utilizando una balanza analítica (Marca Electronic SCALE, 5000 g/0,01 g) según estudios realizados por Beltrán y Hernández (2014).

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey  $p < 0,05$  para las fuentes de variación que tuvieron significación estadística en las variables respuestas evaluadas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2010).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### FASE 1: EFECTO *IN-VITRO* DE BACTERIAS ENDÓFITAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO RADICAL DE PLÁNTULAS DE TOMATE

#### 4.1. Longitud radical de plántulas de tomate *in-vitro*

En la tabla 4.1 se muestran los aislados de las localidades: Calceta, Junín, Quiroga, Chone y la Estancilla, con sus respectivos códigos y longitud radical. Al analizar la variable longitud radical de las plántulas se encontró diferencias significativas entre las cepas, al interior de cada localidad.

#### 4.1. Longitud radical de plántulas de tomate *in-vitro* en cada ensayo por localidad.

Código	Longitud radical (mm)								
CET-9	81,87 a	JETE-1	75,17 a	QEBE-2	91,38 a	CHETE-3	76,05 a	EETE-9	67,57 a
CET-5	75,02 ab	JETE-2	30,71 b	QEBE-5	57,28 b	CHETE-9	65,13 ab	EETE-11	66,25 a
CET-8	67,34 abc	JETE-3	25,80 bc	QEBE-3	55,94 b	CHETE-8	58,99 bc	EETE-14	63,41 a
CET-2	62,81 bcd	JETE-6	21,42 bcd	QEBE-4	25,65 c	CHETE-1	51,79 bcd	EETE-15	59,02 ab
CET-3	50,82 cde	JETE-7	20,34 cde	QEBE-6	21,31 c	CHETE-7	46,73 cd	EETE-1	56,60 abc
CET-7	46,35 def	JETE-5	18,76 cde	QEBE-1	12,66 c	CHETE-5	38,38 de	EETE-5	50,78 bcd
CET-1	43,85 ef	JETE-8	14,29 de	<b>p-valor</b>	<b>0,0001</b>	CHETE-4	28,79 e	EETE-6	50,20 bcd
CET-4	37,66 ef	JETE-4	11,12 e	<b>C.V%</b>	<b>12,94</b>	CHETE-6	25,35 ef	EETE-7	47,27 bcde
CET-6	30,59 f	<b>p-valor</b>	<b>0,0001</b>			CHETE-2	11,86 f	EETE-13	46,14 cde
CET-9	81,87 a	<b>C.V. %</b>	<b>13,03</b>			CHETE-3	76,05 a	EETE-10	43,17 de
CET-5	75,02 ab					CHETE-9	65,13 ab	EETE-17	35,31 e
<b>p-valor</b>	<b>0,0001</b>					<b>p-valor</b>	<b>0,0001</b>	EETE-4	21,63 f
<b>C.V. %</b>	<b>11,7</b>					<b>C.V. %</b>	<b>11,08</b>	EETE-8	14,71 f
								EETE-16	14,60 f
								EETE-12	13,54 f
								EETE-2	11,63 f
								EETE-3	11,31 f
								<b>p-valor</b>	<b>0,0001</b>
								<b>C.V. %</b>	<b>10,27</b>

CET= Calceta, JETE= Junín QEBE= Quiroga, CHETE= Chone y EETE= Estancilla.

En la siguiente tabla 4.2 se muestran los valores promedios de la variable longitud radical de las plántulas de tomate sometidas a la influencia de las bacterias endófitas, donde manifiestan que estadísticamente estas cepas seleccionadas fueron las mejores por cada localidad.

**Tabla 4.2.** Promedio de longitud radical de la plántulas de tomate *in-vitro* con las mejoras cepas alcanzada por localidad

Localidad/cepa	Longitud radical (mm)	P	C.V%
Calceta (CET-9)	81,87	0,0001	11,70
Junín (JETE-1)	75,17	0,0001	13,03
Quiroga (QEBE-2)	93,38	0,0001	12,94
Chone (CHETE-3)	76,05	0,0001	11,08
Estancilla (EETE-9)	67,57	0,0001	10,27

Los resultados son similares a los reportados por Intriago y Plaza (2020), quienes midieron valores alrededor de 55 mm de longitud en raíces de plántulas de tomate en contacto con bacterias endófitas a nivel *in-vitro*.

## **FASE 2: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS ENDÓFITAS SELECCIONADAS POR SU CAPACIDAD DE PROMOVER EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ DE LA PLÁNTULA DE TOMATE.**

Para la identificación de las cepas, se usaron la región 16S. M: Marcador de peso molecular DNALand de 100bp, que fueron amplificadas con los primers universales 27F/1492R, la búsqueda en la base de datos Genbank permitió identificar a los aislados bacterianos a nivel de especies de las siguientes maneras: QEBE-2 dio un porcentaje de identidad del 100% con dos especies distintas *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter calcoaceticus*, mientras que JETE-1 pertenece a *Pseudomonas aeruginosa* con un porcentaje de identidad de 100%, la cepa CET-9 pertenece a *Serratia surfactantfaciens* y CHETE-3 a *Klebsiella aerogenes* ambas con un porcentaje de identidad de 99,78% y por ultimo a EETE-9 con la especie de *Serratia surfactantfaciens* con un porcentaje de identidad de 99,93%.

**Tabla 4.3.** Identificación molecular de bacterias

Código IDgen	Localidad/cepa	Nomenclatura	% de identidad
B129	Calceta (CET-9)	<i>Serrata surfactanfaciens</i>	99,78
B130	Estancilla (EETE-9)	<i>Serrata surfactanfaciens</i>	99,93
B131	Junín (JETE-1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
B132	Chone (CHETE-3)	<i>Klebsiella aerogenes</i>	99,78
B133	Quiroga (QEBE-2)	<i>Acinetobacter pittii</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	100

Estos resultados discrepan de la investigación realizada por Doncel et al. (2016), que la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* que es un bacilo gramnegativo aerobio, y presentan actividad positiva para la fijación biológica de nitrógeno y solubilización de fosfatos.

Estudios realizados por Forsythe et al. (2005) manifiestan que las bacterias gramnegativas del género *Serratia* en agua, aire, suelo, plantas y animales son miembros de las *Enterobacteriaceae*. La especie del género *Serratia* produce un pigmento rojo no difusible identificado como prodigiosina, que es un metabolito secundario alcaloide con una estructura química tripirrol única (Petersen y Tisa, 2013). Además, algunas especies del género *Serratia* también producen varios metabolitos secundarios útiles que incluyen oocidina A, carbapenem, altiomicina, bacteriocinas y tienen aplicaciones potenciales en la biorremediación ambiental y la industria farmacéutica (Matsuyama, et al., 2011).

En general, los géneros bacterianos que se han detallado en las semillas de diferentes plantas son *Bacillus* y *Pseudomonas*. También se encuentran a menudo *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pantoea* y *Acinetobacter* como endófitos de semillas (Regueira, 2018). En este caso se encontraron que las semillas de tomate albergan especies bacterianas endófitas similares a las reportadas para otras especies de planta, lo que sugiere que podría ser una estrategia de dispersión dentro del medio ambiente.

En correspondencia con las referencias anteriores Truyens et al. (2015), sostienen que cuando las semillas germinan, se produce el desarrollo de estas comunidades microbianas endófitas que suelen enriquecerse con microorganismos provenientes de los suelos.

### FASE 3: EVALUACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS, SELECCIONADAS A PARTIR DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE TOMATE A NIVEL DE MACETAS

#### 4.4. Altura de planta a los 30, 60 y 90 días después de la siembra

En la **tabla 4.4**, se presenta la altura de planta de tomate a los 30, 60 y 90 días; se observa que en los dos primeros periodos de evaluación no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos; sin embargo, a los 90 días hay diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. La mayor altura de planta fue alcanzada por el tratamiento bioinoculante en medio líquido con un incremento del 116,70 cm con relación al testigo negativo que se encuentra al final del segundo rango estadístico.

**Tabla 4.4** Altura de planta del tomate variedad Floradade a los 30, 60 y 90 dds\*

Tratamiento	30 dds (cm)	60 dds (cm)	90 dds (cm)
1 Bioinoculante en medio líquido	15,00	65,75	116,70 a
2 Bioinoculante encapsulada	17,25	61,50	109,00 ab
3 Sobrenadante libre de célula	19,50	65,50	115,5 ab
4 Testigo positivo	14,75	62,50	106,25 ab
5 Testigo negativo	13,74	57,50	87,00 b
<b>P</b>	0,1057	0,4190	0,0426
<b>C.V. (%)</b>	18,98	10,58	12,46

\* Días después de siembra

El uso de inoculantes con bacterias promotoras de crecimiento vegetal, en medio líquido, es una práctica que activa de mejor manera la acción enzimática de los microorganismos, como lo indica Espinoza (2016). En estudio realizado por Angulo et al. (2015), se determinó el efecto de diferentes cepas promotoras de crecimiento, tanto fijadoras de nitrógeno como solubilizadoras de fósforo. En el presente estudio todos los tratamientos que recibieron el inóculo tuvieron una respuesta similar a la variante del testigo positivo (aplicación de fosfato monobásico de potasio), y marcaron diferencias con el testigo negativo (sin ninguna aplicación); estos resultados son similares a los ofrecidos por Sánchez et al. (2012), que en su estudio mostraron incremento en el tamaño de la planta de tomate hasta dos veces en los tratamientos con la aplicación de bacterias a los 30 y 60 días, mientras que a los 90 días ejerció mayor efecto la cual fue tres

veces mayor con respecto al testigo absoluto, mientras que comparando con el testigo químico mostró una diferencia de 30% y presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5. Longitud de raíz a los 30, 60 y 90 días después de la siembra

En la **tabla 4.5**, se muestran valores promedio de longitud de raíz, donde hay diferencias significativas entre las variantes en los tres periodos de evaluación. A los 30 días el tratamiento **bioinoculante encapsulado** se ubicó en el primer rango estadístico con 20,00 cm de longitud de raíz; a los 60 días el **testigo positivo** logró la mayor longitud (49,25 cm), y a los 90 días los tratamientos uno, tres y cuatro alcanzaron la mayor longitud radical y comparten el mismo rango de significancia.

**Tabla 4.5.** Longitud de raíz de la planta de tomate variedad Floradade a los 30, 60 y 90 dds

Tratamiento	30 dds (cm)	60 dds (cm)	90 dds (cm)
1 Bioinoculante en medio líquido	13,25 b	41,75 ab	66,00 a
2 Bioinoculante encapsulada	20,00 a	36,75 ab	56,75 ab
3 Sobrenadante libre de célula	7,50 c	41,00 ab	64,00 a
4 Testigo positivo	10,25 bc	49,25 a	65,75 a
5 Testigo negativo	8,00 c	26,00 b	45,25 b
<b>p</b>	0,0001	0,0240	0,0085
<b>cv%</b>	20,11	22,31	13,14

La utilización de bacterias endófitas, son una alternativa benéfica que ayuda al desarrollo de la raíz y esto hace que obtenga una mejor absorción de nutrientes. Por lo que se recomienda la utilización de productos bases de bacterias altamente eficaz que contribuyan en la mejora de la productividad y de esta manera reemplazar a los agroquímicos como lo indica Gupta et al. (2015). Según Rojas et al. (2020) en su estudio utilizó bacterias del género *Bacillus* con las cepas RC15 obtuvo 20,41 cm y la cepa RC9, alcanzó 16,37 cm con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) cuando se compraron con el testigo, los cambios en la arquitectura de la raíz de las plantas inoculadas fueron notorios con respecto a las no inoculadas.

Estudios realizados por Bazán y Garboza (2019), manifiestan que la prueba F del análisis de varianza demostró alta significancia, con el uso de cepas *Bacillus* alcanzando 26,08 cm, y el testigo con 12,45 cm, la longitud de la raíz favorece la absorción de nutrientes poco móviles como el fósforo.

#### 4.6. Clorofila a los 15, 30 y 45 días después de la siembra

La **tabla 4.6**, se muestra el contenido de clorofila en unidades SPAD presente en las hojas fotosintéticamente activas en plantas de tomate, donde se observa que a los 15 días se reportó diferencias estadísticas entre tratamientos, donde todos los bioinoculantes y el testigo positivo lograron el mayor contenido de clorofila y comparte el mismo rango de significancia, en relación al testigo negativo. Por otra parte, a los 30 y 45 DDS, no se reportó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

**Tabla 4.6.** Clorofila de la planta de tomate variedad Floradade a los 15, 30 y 45 dds.

Tratamiento	15 dds	30 dds	45 dds
1 Bioinoculante en medio líquido	26,00 a	26,83	33,70
2 Bioinoculante encapsulada	25,16 a	24,87	34,86
3 Sobrenadante libre de célula	24,99 a	26,20	37,61
4 Testigo positivo	26,46 a	28,08	40,04
5 Testigo negativo	22,67 b	24,78	31,91
<b>p</b>	0,0001	0,0852	0,0912
<b>C.V.%</b>	4,67	6,69	11,56

Estudios realizados por Hernández (2011), muestran que las plantas inoculadas con bacterias reportaron un valor promedio de 47,2 de índice de clorofila, mientras con el uso de fertilizante químico alcanzó 49,2.

En su investigación Rodríguez et al. (2021) dicen que se encontró correlación altamente significancia, la concentración de clorofila para el estudio mostró valores mayores de tal forma que el valor más bajo 0,88 se obtuvo con las hojas amarillas y el más alto 3,11 con las hojas verdes.

#### 4.7. Peso seco parte aérea de la planta de tomate

El peso seco aéreo no fue influenciado significativamente por los tratamientos evaluados a los 30 y 60 DDS. Sin embargo, el tratamiento con bioinoculante en medio líquido se muestra como la mejor alternativa (Tabla 4.9).

**Tabla 4.7.** Peso seco parte aérea de la planta de tomate variedad Floradade a los 30 y 60 dds.

Tratamiento	30 dds (g)	60 dds (g)
1 Bioinoculante en medio líquido	2,38	3,08
2 Bioinoculante encapsulada	2,23	2,70
3 Sobrenadante libre de célula	2,20	2,83
4 Testigo positivo	2,13	2,83
5 Testigo negativo	1,85	2,70
<b>p</b>	0,2851	0,8101
<b>C.V.%</b>	15,21	17,78

Salvatierra (2020), afirma que encontró resultados positivos gracias al efecto de dos bacterias endófitas LASFBP076 y LASFBP044, presentaron un mayor peso de materia seca aérea en la planta de tomate con un promedio de 0,60 g que el tratamiento testigo sin inocular. También en la investigación de Ulloa (2018) donde la inoculación con la cepa LASFBP086 aumenta la materia seca en 81% con respecto al testigo sin inocular.

#### 4.8. Peso promedio del fruto

El peso promedio de fruto fue influenciado con la inoculación de bacterias endófitas y la aplicación del testigo químico, pues se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), las plantas que fueron inoculadas por el método de encapsulación fueron las que produjeron mayor cantidad de frutos, con un promedio de 14,43 g, esto puede ser debido a que las plantas inoculadas absorben mayor cantidad de agua y así mismo la asimilación de macronutrientes y, una mayor participación de fotosintatos en la parte reproductiva de la planta. Es notable que el efecto de bacterias endófitas en el cultivo son muy variable entre los tratamientos.

**Tabla 4.8.** Peso promedio del fruto de tomate variedad Floradade

Tratamiento	Cosecha (g)
1 Bioinoculante en medio líquido	12,30 a
2 Bioinoculante encapsulada	14,43 a
3 Sobrenadante libre de célula	10,45 ab
4 Testigo positivo	11,56 ab
5 Testigo negativo	5,38 b
<b>p</b>	0,0130
<b>C.V.%</b>	29,17

En el estudio realizado por Hernández (2011), se hallaron resultados similares donde se expresó diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre tratamientos siendo el mejor tratamiento con la aplicación de bacterias logrando

frutos más grandes y con mayor peso promedio de fruto de 21,67 g, mientras que con la aplicación de químicos alcanzó frutos pequeños y un promedio de 19,16 g.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- ❖ Las cepas bacterianas (CET-9), (EETE-9), (JETE-1), (CHETE-3) y (QEBE-2), fueron seleccionadas por su mayor capacidad promotora del crecimiento vegetal a nivel *in-vitro*.
- ❖ Las cepas bacterianas CET-9 y EETE-9 fueron identificadas con la especie *Serratia surfactanfaciens*, mientras que las cepas JETE-1, CHETE-3 y QEBE-2 pertenecieron a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes* y *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, respectivamente.
- ❖ Las cepas CET-9 y EETE-9 fueron las que mostraron el mayor potencial de uso con fines agronómicos.
- ❖ Los tratamientos con la aplicación de bacterias endófitas y el testigo positivo (Fosfato monobásico de potasio) influyeron en mayor medida sobre el desarrollo vegetativo y productivo en el cultivo de tomate, en relación al testigo negativo.

### 5.2. RECOMENDACIONES

- ❖ Continuar realizando ensayos con aplicación de las cepas CET-9 y EETE-9 en diferentes cultivos.
- ❖ Validar los resultados obtenidos bajo condiciones de campo, con fines de realizar ajustes y generar futuras tecnologías de biofertilización en tomate.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andina, S. (2019). Evaluación de bacterias endófitas promotoras de crecimiento en el cultivo de quinua. *Universidad Simón I Patiño*, 7(9), 1-12.
- Angulo M, Claros M, Ortuño N. (2015). Efecto de diferentes cepas de bacterias promisorias en plantas de quinua (*Chenopodium quinoa*) en condiciones de invernadero. En: Congreso Científico de la Quinua. p. 185-91.
- Antoun, H. (2018). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Eng.* 46(16), 62-67.
- Andreu, J; Betrán, J; Delgado, I; Espada, J; Gil, M; Gutiérrez, M y Pérez, M. (2006). Fertilización nitrogenada; guía de actualización. 197p.
- Arencibia, A; Arrebola, L; Gámez, R. (2019). Métodos generales de conservación de microorganismos. ISBN: 978-959-7076-20-9.
- Barrios, J. E. (2015). Evaluación de sistemas de podas sobre el rendimiento de tomate; Catarina, San Marcos. Tesis de grado.
- Beltrán, F. y Hernández, L. (2014). Propuesta diferencial a la salinidad de genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en primeras etapas fenológicas. *Revista terra latinoamericana.* 32(4), 311-323.
- Bazan, R., & Garboza, N. (2019). Bacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de *Asparagus officinalis* L. y su efecto en el desarrollo vegetativo de *Lycopersicon esculentum* Mill. Obtenido de Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Facultad De Ciencias Biológicas.
- Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, A. Sikora, A. Ulrich, y J. Hallmann. (2015). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 5:215-229
- Bobadilla, C y Rincón, S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato Solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Pontifica Universidad Javeriana Facultad de Ciencias-Carrera de Microbiología industrial.
- Bobadilla, A. E. (2017). Respuestas al estrés salino por cloruro de sodio y agua de mar en la fase de crecimiento de dos tipos de tomate en un sistema hidróponico de raíz flotante.
- Camozzi, M. (2017). Importancia y manejo del fósforo en cultivos hortícolas. *Revista Haifa.* 2(4), 12-23.
- Carvalho, G., Balsemao, E., Saraiva, M., Ferreira, G., Hemerly, S. (2014). Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic

diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5631–5642.  
<http://doi:10.1093/jxb/eru319>

- Chanway, C.P. (2018). Bacterial endophytic: ecological and practical implications. *Sydowia* 50:149-170.
- Chuang, C; Kuo, C; Chao, W; Chao, F. (2017). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol. Fert. Soils*. 43(23), 575-584.
- 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.
- Doncel, A., Chamorro, L., & Perez, A. (2016). Activity in-vitro of bacteria endophytes promoters of growth associated with colosoana pasture in the municipality of Corozal, Sucre. *Rev Colombiana Cienc Anim* 2016; 8(Supl):351-360., 1(6)-10.
- Espinoza, B. (2016). *Inoculación de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de tomate (Solanun lycopersicum) bajo condiciones de invernadero*. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-México.
- Fernández, L; Zalba, P; Gómez, M; Zagardoy, M. (2015). Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under.
- Forsythe, S., Abbott, L., Pitout, J. (2005). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas y otras Enterobacteriaceae*.
- García R., A. Berenguer, M. Tormo, M. Sanchez, J. Quiros, C. Navarro, R. Arnaud, M. Dorronsoro, M. Chirlaque, A. Barricarte, E. Ardanaz, P. Amiano, C. Martinez, A. Agudo y C. Gonzalez. (2014). Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoides in Spain. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 1005-1011.
- García, F. (2018). Fertilización del maíz en la región pampeana. En: AIANBA, editores, Actas VII Congreso Nacional de Maíz. AIANBA 7 al 9 noviembre de 2001. Pergamino, Buenos Aires, ARG. 6 p.
- García, J. (2015). Efecto de proteína de Lombriz (*Eisenia foetida*) en el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de grado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- García, M. (2019). La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). 30(8), 12-15.

- García, E. (2019). Evaluación del quitosano, sobre la emergencia y crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) bajo condiciones controladas. (Tesis de grado).
- García Seminario, R. (2018). Influencia del potasio en la producción y calidad del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) variedad Floradade.
- Giovannini, J. (2017). Estudio cuantitativo del efecto de bacterias. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*, 3(6), 12-78.
- Gutiérrez, S. (2018). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. 21 ed. Pontifica Universidad Javeriana.
- Grimont, P. A. D., & Grimont, F. (1978). The Genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*, 32(1), 221–248. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.001253>
- Gupta, G, Singh, P, Kumar, A, Kumar, S, y Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbiol. Biochem. Technol.* 7: 096-102. doi: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>.
- Hameeda, B; Harini, O; Rupela, S; Wani, K y Gopal, K. (2018). Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 12(164), 234-242.
- Harinathan, B., Sankaralingam, S., Palpperumal, S., Kathiresan, D., Shankar, T., Prabhu, D. (2016). Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on Growth and Development of Pearl Millet and Ragi. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 7(3):1-7. <http://doi:10.9734/JABB/2016/26290>
- Hernández, S. (2017). Estudio del comportamiento de distintos tipos de sustratos de lana de roca, en respuesta al aumento de oxígeno disuelto en la solución nutritiva respecto a la producción y calidad de un cultivo de tomate tipo "Floradade pera". <http://repositorio.ual.es:8080/jspui/handle/10835/2641#.V2Af8bt97IU>.
- Hernández, A. (2011). Desarrollo de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* L. cv. Camelia) en respuesta a la biofertilización bajo condiciones de casa sombra y análisis de algunos parámetros fisiológicos. (Tesis de Grado). Recuperado de: <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/195/1/Armando%20Hernandez%20Perez%2C%20Maestria.pdf>
- Hurek, T., y B. Reinhold-Hurek. (2016). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* 106:169-178.
- Intriago, J., & Plaza, I. (2020). Obtención de bacterias endófitas del tomatillo (*Lycopersicon pinpinellifolium* L.) Como promotoras de crecimiento vegetal. (Tesis, Calceta: ESPAM).

- Lara, C; Sanes, S; Oviedo, L. (2018). Impacto de bacterias nativa solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Biotecnología Aplicada*, 30(4), 271-275.
- Lapo, M. sf. Grandes noticias para el horticultor. Guayaquil, Ecu., PETOSLIUSAGRIPAC, Boletín s/n. p. 18.
- Mantilla, C. L., y Peñata, J. L. N. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichantium aristatum*). *Revista Colombiana de biotecnología*, 17(1), 122-130.
- Medina, J; Chimal, C; Gómez, L; Aguilar, J; Hernández, G. (2016). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Revista terra latinoamericana*. 32(4), 323.
- Moreno, A., García, V. y Reyes, J. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: *Colomb. Biotecnol*, 20(1), 68-83.
- Murillo, B; Yamada, T; Yamaguchi, E; Rueda, N; Ávila, J; García, R; López, E; Diéguez, A & Garibay, A. (2017). Influence of calcium silicate on growth, physiological parameters and mineral nutrition in two legume species under salt stress. *J. Agron. Crop Sci.* 193(78), 413-421.
- ONU (Organización de Naciones Unidas). (2015). Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el desarrollo Sostenible. Recuperado de: [https://www.equividad.org.mx/pdf/2\\_Agenda%202030%20Desarrollo%20Sostenible.pdf](https://www.equividad.org.mx/pdf/2_Agenda%202030%20Desarrollo%20Sostenible.pdf).
- Oliveira, V., Alves, I., Marriel, E., Gomes, M., Scotti, P., Carneiro, T., Guimaraes, E., Schaffert, N., Sá. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* 41:1782-1787.
- Patiño, C., Reyes, S. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. 10(2): 288-297.
- Pérez, A., Chamorro, C., Pérez, C. 2013. Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Rev. Colombiana Cien. Anim.* 5:439-462.
- Pérez, A., Tuberquia, A. y Jiménez, D. (2015). Actividad in-vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 213-223.
- Pérez, A; Chamorro, L. (2015). Bacterias endófitas un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario revista Colombiana Ciencia Anim. 5(2), 439-462.

- Pérez, I., Meriño, L., Abalos, A., y Perez, R. (2016). Características promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Cuabana Quím*, 29(1), 73-88.
- Petersen, L. M., & Tisa, L. S. (2013). Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian journal of microbiology*, 59(9), 627-640. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0343>
- Regueira, E. (2018). *Endófitos promotores del crecimiento vegetal del tomate [Solanum lycopersicum (L.)]* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Rivera, M. (2018). Efecto bioestimulante de dos abonos orgánicos complementarios en el crecimiento de plantines de tomate (*Solanum lycopersicum*) durante la fase de vivero. Universidad de el Salvador Facultad de Ciencias Agronómicas.
- Rodríguez, J. (2020). Utilización de cepas de *Bacillus* como promotores de crecimiento en hortalizas comerciales. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v69n1/0120-2812-acag-69-01-54.pdf>.
- Rodríguez, M., Alcántar, G., Aguilar, A., Etchevers, J., y Santizó, J. (2021). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoamericana*, 1-8.
- Rodríguez, C. (2013). Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuierilla (*Ricinus communis*). Universidad Católica de Manizales.
- Ruminot, C. (2005). Encapsulación de bacterias lácticas en geles de alginato para la producción de bacteriocinas e inhibición de *Listeria monocytogenes*. Tesis Licenciado en Ciencia de los Alimentos. Universidad austral de chile. Valdivia - Chile. p 23
- Rodríguez Salguera, V. H., & Morales Blandón, J. L. (2007). *Evaluación de alternativas de protección física y química de semilleros de tomate (Lycopersicum esculentum Mill) contra el ataque del complejo mosca blanca (Bemisia tabaci, Gennadius)-Geminivirus y su efecto en el rendimiento, en el municipio de Tisma, Masaya* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).
- Martínez, S., & Campos, D. E. R. *Efecto de bacterias solubilizadoras de fosforo en el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate (Solanum lycopersicum L.) Bajo condiciones de invernadero. /Juan Gilberto Santiago Martínez* (No. SB952. P5. S26 2012.).
- Matsuyama, T., Tanikawa, T., Nakagawa, Y. (2011). Serrawettins y otros tensioactivos producidos por *Serratia*. En: *Biosurfactantes*. Saltador; 2011: 93-120.

- Santiago, J. (2017). Efecto de Bacterias Solubilizadoras de Fosforo en el Crecimiento y Desarrollo de Plantas de Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) Bajo Condiciones del Invernadero. (Tesis de grado). Recuperado de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6458/62430%20SANTIAGO%20MARTINEZ%20JUAN%20GILBERTO%2c%20TESIS..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, B; Gomez, M; Garrido, M y Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, vol.3, n.7, pp.1401-1415. ISSN 2007-0934.
- Salvatierra, R. (2020). Inoculación de cepas de bacterias endófitas diazotróficas en el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande. (Tesis de grado). Recuperado de: <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/17642/Salvatierra%20Oruna%2c%20Rusber%20Jhoel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Scattareggia, J. (2016). Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de. *Facultad de Ciencias Agrarias*, 11, 22-54.
- SINAGAP (Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, EC.) 2011. Estadística de producción de tomate riñón en el Ecuador. Recuperado de: <http://sinagap.magap.gob.ec/Sina/Acceso.aspx>.
- Stankovic, N., Senerovic, L., Ilic, T., Vasiljevic, B., Nikodinovic, J. (2014). Propiedades y aplicaciones de undecilprodigiosina y otras prodigiosinas bacterianas. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98 (9): 3841–3858. doi: 10.1007 / s00253-014-5590-1.
- Soberón-Chávez, G., & Maier, R. M. (2011). Biosurfactants: a general overview. *Biosurfactants*, 1-11.
- Sessitch, A., B. Reiter, U. Pfeifer, y E. Wilhelm. (2015). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytic in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol*. 39:23-32.
- Shi, Q., Peng, H., Zeng, S., Ji, R., Shi, K., Huang, H., Ji, J. (2016). Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Bioengineered*, 8(2), 124–128. <http://doi:10.1080/21655979.2016.1212138>
- Shweta, S.; Bindu, J. H.; Raghu, J.; Suma, H.; Manjunatha, B.; Kumara, P. M.; Uma Shaanker, R. (2017). Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd.(Icacinaceae). *Phytomedicine*. 20(10), 913-917.

- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <http://doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Trivedi P. y Sa T. (2016). *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. *Curr Microbiol.* 56(2), 140-144.
- Tsavkelova, E., T. Cherdyntseva, S. Botina, y A. Netrusov. (2017). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 162:69-76.
- Tubay, G; Cedeño, D; Guzmán, A; Cedeño, J. (2017). Contenido clorofílico del tomate en función de la edad del cultivo y daño ocasionado por *Prodidiplosis longifila*. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. Obtenido de *Environmental Microbiology Reports* 7(1), 40–50.
- Ulloa, O. (2018). Efecto de la inoculación de bacterias diazotróficas endófitas en el crecimiento de plántulas de *Asparagus officinalis* L. var. UC 157. Universidad Nacional de Trujillo.
- Vasquez Espejo, C., Alvarez Aliaga, M. T. A., & Crespo Melgar, C. F. A. *Aislamiento, selección y caracterización de bacterias endófitas promotoras del crecimiento de plantas* (Doctoral dissertation).
- Von Rothkirch Gómez, J. (2016). *Solubilización de fósforo por parte de Lysinibacillus sphaericus en un fragmento de suelo en los Llanos Orientales, Colombia* (Bachelor's thesis, Uniandes).

# ANEXOS

**Anexo 2. Identificación de las cepas y siembra de las cepas en agar nutriente.**

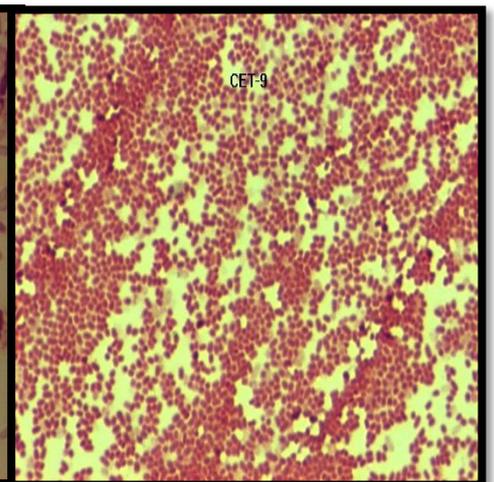
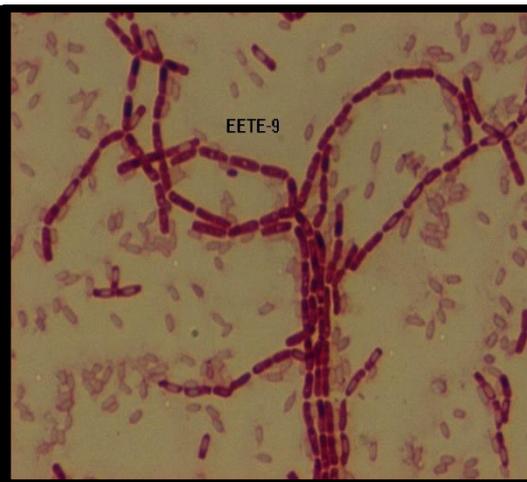


I

**Anexo 1. Incubación de las cepas**



**Anexo 3. Tinción de GRAM.**



**Anexo 4. Preparación de medios de cultivos para sembrar las cepas**



**Anexo 5. Método de siembra**



**Anexo 6.** 15 días de pre-germinación.



**Anexo 7.** Germinación por un periodo de 15 días.



**Anexo 8.** Toma de longitud, peso fresco y peso seco de la plántula de tomate



## Anexo 9. Identificación Molecular de las cepas.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [idgen.ecuador@gmail.com](mailto:idgen.ecuador@gmail.com)  
R.U.C. 1713443479001

### Informe de Resultados

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de bacterias – Diego Zambrano  
**Informe No.:** A-201

**Técnico Responsable:** Francisco Flores

**Fecha:** 22/02/2021

### Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
B129	CET-9	1357	98.6	<i>Serratia surfactantfaciens</i>	16S	99.78	<a href="#">CP016948.1</a>
B130	EETE-9	1354	98.9	<i>Serratia surfactantfaciens</i>	16S	99.93	<a href="#">CP016948.1</a>
B131	JETE-9	1360	99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16S	100	<a href="#">MK796437.1</a>
B132	CHETE-3	1369	80.9	<i>Klebsiella aerogenes</i>	16S	99.78	<a href="#">NR_113614.1</a>
B133	QUEBE-2	1367	99.1	<i>Acinetobacter pittii</i> / <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	16S	100	<a href="#">MN307289.1</a> / <a href="#">NR_042387.1</a>

Nota: La secuencia de 16S de QUEBE-2 dio un porcentaje de identidad del 100% con dos especies distintas. Se recomienda la secuenciación de un segundo marcador molecular (rpoB o gyrB)

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

**Anexo 10. Preparación de las macetas.****Anexo 11. Plantas de tomate.****Anexo 10. Plantas de 60 días.**

**Anexo 11. Aplicación de Neem.**



**Anexo 12. Toma de datos.**



