SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Tecnológico Nacional de México

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN LA PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

TESIS

Que presenta:

Ligia Paola González Wilches

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. José María Tun Suárez

Conkal, Yucatán, México
Junio, 2018

SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, 12, Junio de 2018

El comité de tesis del candidato a grado: Ligia Paola González Wilches, constituido por los CC. Dr. José María Tun Suarez, Dr. Arturo Reyes Ramírez, Dr. Jairo Cristóbal Alejo y Dr. Carlos Juan Alvarado López, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en la producción de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

(Dr. José María Tun Suárez)
Director de Tesis

(Dr. Arturo Reyes Ramírez)
Asesor de Tesis

(Dr. Jairo Cristóbal Alejo)
Asesor de Tesis

(Dr. Carlos Juan Alvarado López)
Asesor de Tesis

11 /Junio/2018

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Ligia Paola González Wilches

AGRADECIMIENTOS

"Demos gracias a los hombres y a las mujeres que nos hacen felices, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer a nuestros espíritus" (Will Rogers, 1879-1935)

Al **Instituto Tecnológico de Conkal**, **División de Posgrados e Investigación**, por abrirme las puertas para realizar mis estudios de Maestría, gracias por la excelente formación y apoyo brindado en todo momento, me llevo los mejores recuerdos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría, y para realizar una estancia de Investigación en Cuba, que garantizó mi sostenimiento en condiciones de calidad de vida y motivación, gracias por financiar la formación de investigadores y contribuir al desarrollo de Latinoamérica.

Al **Dr. José María Tun Suárez**, director de mi tesis, a quien conocí en Colombia en Feria de Posgrados. Su trayectoria en temas de mi interés y calidad humana, me motivaron para estudiar en México y ha sido la mejor decisión. Agradezco la excelente dirección del trabajo, sus grandes aportes y enseñanzas, su ayuda para resolver los retos presentados, su dedicación de tiempo extra para que concluyera mi tesis a tiempo, con buenos resultados, muchas gracias por su apoyo incondicional y confianza.

Al **Dr. Carlos Juan Alvarado López**, por su asesoría para definir diseños experimentales, metodología de trabajo con micorrizas y contenidos nutrimentales. Gracias por ser un excelente maestro, con quien adquirí bases estadísticas, fundamentales y gracias por escucharme, aconsejarme y sacarme una sonrisa en momentos difíciles.

Al **Dr. Arturo Reyes Ramírez**, por su asesoría para el desarrollo de la tesis, por enseñarme a trabajar en el laboratorio con *B. subtilis*, gracias por resolver todas mis dudas, por sus críticas constructivas que ayudaron a mejorar el trabajo, por su amabilidad y buena disposición siempre que lo requerí, muchas gracias.

Al **Dr**. **Jairo Cristóbal Alejo**, agradezco por abrirme las puertas del laboratorio de Fitopatología para el desarrollo de este trabajo, por su asesoría y suministro de información oportuna, por sus aportes para la corrección y mejora de mi documento, gracias también por su calidad humana y por designar a **Felicia Moo**, para enseñarme a trabajar con *T. harzianum*, agradezco también a **Felicia** su gran ayuda y tiempo dedicado.

Al **Dr. Rene Garruña**, por su contribución a mi trabajo de Tesis, desde la asignatura de Seminario III, en la cual brindó conocimientos fundamentales para avanzar en la redacción del artículo, nos llevó a reflexionar y contribuyó a desarrollar en sus estudiantes, cualidades fundamentales para el crecimiento personal y profesional.

Al **Dr. Esaú Ruiz Sánchez** por su colaboración durante el proceso de admisión, gracias por su excelente labor docente en la asignatura de Control Biológico en la cual me brindó elementos para analizar literatura científica y plantear experimentos, saberes fundamentales para el desarrollo de mi tesis. Gracias también su calidad humana.

Al **Dr. Luis L. Pinzón López,** por la excelente clase de Fisiología vegetal, por su contribución a mi formación, mediante el desarrollo de un proyecto práctico, que me dio grandes bases para el establecimiento de mi ensayo de tesis, gracias por ayudarme a conseguir insumos para el desarrollo de mi tesis, en momentos claves para mi avance.

Al Dr. **Miguel Ángel Bautista** por su amistad y su gran apoyo al compartirme su trabajo de investigación y literatura pertinente, a la Dra. **Blanka Y. Samaniego,** por suministrarme información y resolver algunas de mis dudas**.** También agradezco a **Florencio Dzul Hoy**, por ayudarme en la siembra y compartirme información.

A todos los profesores que aportaron a mi formación y compañeros de maestría, en especial a **Jazmín López**, por su amistad y apoyo para la cuantificación de micorrizas, a todos, gracias por su compañía, que hicieron muy grata y enriquecedora esta experiencia.

A mi esposo Miguel Ángel Duarte, por su ayuda durante todos los experimentos, gracias por su paciencia, por darme aliento en los momentos de agotamiento o dificultad, gracias por acompañarme y ayudarme a cumplir este gran sueño, por su amor que es mi principal motivación y por llenar de felicidad cada momento de mi vida.

A mis amigos **Claudia Parra y Carlos Rivera**, por abrir el camino y mostrarme esta bella opción de vida, por su apoyo para lograr este sueño y ayuda para emprender proyectos como nuestro grupo Agroconciencia, gracias por su amistad verdadera.

¡BENDICIONES PARA TODOS! SIN USTEDES NO HUBIESE SIDO POSIBLE

DEDICATORÍA

"El fin último de la agricultura no es solo la producción de alimentos sanos, sino el cultivo y perfeccionamiento de los seres humanos" (Masanobu Fukuoka 1913-2008)

Dedico este trabajo a la Madre Tierra, por darme todo lo que necesito para vivir, los cuatro elementos: el aire, el agua, el fuego, la tierra, una gran familia de microorganismos, plantas, animales y humanos que cada día me alimentan, sustentan, maravillan, ayudan y acompañan, llenando de magia y felicidad, este este camino por la vida. Así mismo me comprometo a su cuidado desde mi vida cotidiana y profesional, en unión con todas las personas que cada día defienden la naturaleza, a trabajar por el impulso de la Agroecología.

Al Padre Creador, por darme el hermoso regalo de la existencia, una gran oportunidad para aprender, crecer y evolucionar, gracias por guiarme, protegerme y ayudarme, al abrir siempre puertas y poner en mi camino ángeles encarnados, que han sido claves para lograr el desarrollo de este trabajo y el cumplimiento de un sueño.

A los campesinos del mundo, seres que han mantenido su conexión con la madre tierra, que cada día se esfuerzan por alimentar al mundo, que cuidan su tierra como su mayor tesoro, guardianes de las semillas, de la cultura y de las tradiciones, que nos hacen verdaderamente ricos como humanidad. A eso seres que han preferido ver un amanecer, a ver la televisión, que se han mantenido limpios de la contaminación, materialismo y caos de las ciudades. Con ellos está mi compromiso como ser humano y profesional, para contribuir a que su labor sea sostenible y con mayor calidad de vida.

A mis padres Ana Ruth Wilches y Jimeno González, por darme la vida y permitirme llegar a este mundo, por ser mis primeros ángeles, quienes han dado su vida y un gran esfuerzo para darme lo mejor, por apoyarme para salir adelante y progresar, por su amor, su dedicación, sus consejos, su ejemplo de lograr siempre lo que se proponen, por confiar en mí y trasmitirme la mejor energía para cumplir mis propósitos, fueron mi aliciente e inspiración permanente.

A mi esposo, compañero de vida, de sueños y aventuras, Miguel Ángel Duarte, por ser incondicional conmigo, por su apoyo fundamental para concluir a tiempo y con éxito este, y muchos proyectos importantes mi vida, por su amor incondicional, por llenar mi vida de felicidad, por darme siempre fuerza e impulso para avanzar y aliento para no desfallecer.

A mis sobrinos Juan David, Nicolas, Valeria y Felipe, los niñ@s y jóvenes de mi familia, que me han permitido vivir momentos muy felices a su lado, que son las futuras generaciones, semillitas que están empezando a florecer y a quienes debemos como familia y sociedad, todo el amor, compromiso y dedicación. A ellos gracias por inspirarme a ser mejor, para darles un ejemplo y apoyo cuando lo necesiten.

ÍNDICE DE CONTENIDO

i. Declaración de propiedad iii

ii. Agradecimientos. iv

iii. Dedicatoria vi

iv. Índice de contenido viii

v. Índice de cuadros y figuras x

vi. Resumen general xi

vii. Abstract xii

I. CAPÍTULO 1. MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL Y SU EFECTO EN EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). 1

1.1 INTRODUCCIÓN 1

1.2 ANTECEDENTES 3

1.2.1 Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal 3

1.2.2 Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal 3

1.2.2.1 *Bacillus subtilis*: generalidades y la promoción de crecimiento vegetal 5

1.2.3 Hongos Promotores de Crecimiento Vegetal 6

1.2.3.1 *Trichoderma harzianum*: generalidades y promoción de crecimiento vegetal 6

1.2.3.2 Hongos Micorrízicos Arbusculares: generalidades y promoción de crecimiento vegetal 8

1.2.4 Consorcios de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal 10

1.3 HIPÓTESIS 12

1.4. OBJETIVOS 13

1.4.1 Objetivo General 13

1.4.2 Objetivo Específicos 13

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL 14

1.6 LITERATURA CITADA 15

II. CAPÍTULO 2. INOCULANTES MICROBIANOS EN LA CALIDAD DE PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) 21

2.1 RESUMEN Y ABSTRACT 21

2.2 INTRODUCCIÓN 23

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS 25

2.3.1 Preparación de inoculo de los microorganismos. 25

2.3.2 Ensayo 1: Efecto de diferentes aplicaciones de inoculantes de MPCV 26

2.3.2.1 Inoculación de semilla con MPCV 26

2.3.2.2 Germinación de semillas 27

2.3.3 Ensayo 2: Evaluación de aplicación de tratamientos de consorcios de MPCV 27

2.3.3.1 Inoculación de semilla con MPCV 27

2.3.3.2 Germinación de semillas 28

2.3.3.3 Manejo de plántulas 28

2.3.4 Variables de estudio 28

2.3.5 Diseño experimental y análisis estadísticos 29

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 30

2.4.1 Efecto de diferentes aplicaciones de inoculantes de MPCV 30

2.4.2 Evaluación de aplicación de tratamientos de consorcios de MPCV 32

2.4.3 Discusión de resultados 38

2.5 CONCLUSIONES 42

2.6 LITERATURA CITADA 43

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.	Efecto de distintas formas de inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal, en parámetros de calidad de plántulas de tomate a los 19 y 28 días después de siembra (dds).	31
Cuadro 2.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el porcentaje de emergencia de plántulas de tomate.	32
Cuadro 3.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal, individualmente y en consorcios en parámetros de calidad de plántulas de tomate a los 45 días después de siembra.	36
Cuadro 4.	Contenido nutrimentales con base en materia seca, en plántulas de tomate a los 45 días después de la siembra, inoculadas con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.	37
Figura 1.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en la altura de plántulas de tomate.	33
Figura 2.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el diámetro de tallo de plántulas de tomate.	33
Figura 3.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el índice de robustez de plántulas de tomate.	34
Figura 4.	Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el número de hojas de plántulas de tomate.	34

RESUMEN GENERAL

Un pueblo de hombres educados, será siempre un pueblo de hombres libres, la educación es el único medio para salvarse de la esclavitud (José Martí 1853-1895)

Los Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV) mejoran el crecimiento y desarrollo de plantas, mediante mecanismos de solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de reguladores de crecimiento vegetal, antagonismo contra fitopatógenos, entre otros. Su uso contribuye a reducir las dosis de fungicidas y fertilizantes químicos. Por tal razón, en este estudio se evaluó el efecto de la aplicación a la semilla y al sustrato de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV): *Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) de forma individual y en consorcios, en el crecimiento y calidad de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) híbrido Pony express. Los resultados indicaron que la aplicación de los inoculantes microbianos a la semilla y al sustrato a los 13 después de la siembra, tiene el mayor efecto promotor de crecimiento en las plántulas de tomate y el consorcio de *B. subtilis, T. harzianum* y HMA manifestó un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento y calidad de plántulas de tomate, en comparación con su aplicación individual y dual; al registrar valores similares en las variables de crecimiento y calidad las plántulas, similares al tratamiento control con aplicación de fertilizantes. Pero las plántulas del consorcio registraron bajo contenido nutrimental al no disponer de una fuente de nutrimentos. Esta respuesta sugiere que la aplicación del consorcio de inoculantes microbianos permite reducir la aplicación de fertilizantes químicos.

ABSTRACT

Plant Growth-Promoting Microorganisms (MPCV) improves growth and development of plants, through mechanisms of nutrient solubilization, nitrogen fixation, production of plant growth regulators, antagonism against phytopathogens, among others. MPCV, use contributes to reduce fungicides and chemical fertilizers dozes. For this reason, in this study, was evaluated the effects in seeds and substrate caused by the use of plant growt-promoting microorganisms (MPCV) like: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* and fungi mycorrhizal Arbusculares (HMA) individually and in consortia, Growth and quality of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) hybrid Pony express. The results indicated that the application of microbial inoculants to the seed, and the substrate 13 after planting, has the greatest growth-promoting effect on tomato seedlings; and the consortium of *B. subtilis*, *T. harzianum*, and expressed HMA has a synergistic effect in the promotion of growth and quality of tomato seedlings. Its individual and dual application, registered similar values in every growth variable of seedlings when compared with the control group (fertilizers). But the seedlings of the consortium registered low nutritional content because they did not have a source of nutrients. This response suggests that application of a consortium of microbial inoculants allows reducing the application of chemical fertilizers.

CAPÍTULO 1

1. MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL Y SU EFECTO EN EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

1.1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial. En 2016 México fue considerado el décimo productor y primer exportador, con una superficie sembrada de 51,861 ha y una producción de 3.3 millones de ton, de las cuales 36,855 ha fueron a cielo abierto con producción de 1.3 millones de ton y 15,066 ha bajo agricultura protegida con producción de 2.0 millones de ton. Los principales estados productores en México son: Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Baja California y Zacatecas (FIRA, 2017).

Un aspecto crítico para el cultivo de hortalizas, es la producción de plántulas vigorosas y de calidad fitosanitaria (Rojas, 2002), para ello se emplean contenedores de diferentes materiales, sustratos comerciales, semillas certificadas, fertilizantes químicos y pesticidas inorgánicos; se mantienen bajo una estructura protegida que aumenta los costos de producción; genera impacto negativo ambiental y en la salud humana. Para mitigar los efectos generados por este sistema productivo, es necesario generar alternativas de producción de plántulas y manejo del cultivo, que sean más inocuas y económicas, para lograr de este modo una agricultura sostenible, que sea amigable con el ambiente y reduzca los problemas en la salud de consumidores y los agricultores.

Una de las alternativas para lograrlo, es el uso de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV) que mejoran el crecimiento y desarrollo de las plantas, por su actividad biofertilizante, al aumentar la disponibilidad de los nutrientes y facilitar su absorción, mediante mecanismos directos de solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de reguladores de crecimiento vegetal y mecanismos indirectos de control biológico de patógenos (Mejía *et al.*, 2016). El uso de inoculantes de MPCV a partir de bacterias y hongos, como agentes de control biológico permite reducir o eliminar las aplicaciones de fungicidas y promover el crecimiento de las plantas, al favorecer la asimilación del fósforo y fijar el nitrógeno atmosférico (Bach y Díaz, 2008).

En este sentido, en estudios realizados en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L), inoculadas con cepas de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens y Enterobacter* sp., se determinó *in vitro* que estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar ácido indol acético (AIA), solubilizar fósforo, posteriormente propiciar un efecto positivo sobre el desarrollo de las plántulas en longitud radical, altura, producción de biomasa y adquisición de fósforo (Hariprasad *et al.*, 2009).

Asimismo, al evaluar la promoción del crecimiento de *Trichoderma* spp. en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. en la península de Yucatán, de 14 cepas evaluadas, cinco tuvieron una respuesta positiva en las variables de crecimiento, al incrementar la altura, longitud en la raíz, volumen radical y de la biomasa seca total (Candelero *et al.*, 2015).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) mejoran el crecimiento, y reducen las afectaciones causadas por patógenos en *S. lycopersicum*, donde aumentaron el crecimiento, rendimiento y calidad de fruto (Alvarado *et al.*, 2014; Charles y Martin, 2015).

Estos MPCV han demostrado su efectividad al ser inoculados de manera individual, consorcio de cepas de especies del mismo género o de diferente género en varios cultivos, pero existe poca evidencia de su respuesta, cuando se aplican en consorcios de diferentes géneros o tipos de microorganismos; varios autores han reportado un efecto diferenciado, que se atribuye al tipo de cepa, de cultivo y las condiciones de su establecimiento.

El presente estudio planteó evaluar el numero e intervalo de aplicaciones de los MPCV: *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y los HMA en forma individual y consorcios sobre el crecimiento y calidad en plántulas de tomate.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1. MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL:

Los Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV), incluyen a las rizobacterias y hongos promotores de crecimiento vegetal, fijadores de nitrógeno de vida libre y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), tienen un efecto directo o primario en la nutrición vegetal y, por ende, en la estimulación del crecimiento de las plantas (Cano, 2011).

Además en muchos casos, algunos promotores de crecimiento han demostrado tener efecto en el control de plagas y enfermedades. Tal es el caso de los *Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum* y los HMA, utilizados desde hace años en la agricultura para el control de enfermedades con resultados exitosos.

1.2.3 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal llamadas (PGPR) por sus siglas en inglés, son bacterias de vida libre, que habitan en la rizosfera, con capacidad promotora de crecimiento de vegetal y antagónica contra organismos fitopatógenos. Para que una bacteria sea considerada como PGPR, debe cumplir tres aspectos: tener un buen tiempo de permanencia en la rizosfera después de la inoculación (una población introducida que disminuye rápidamente, tendrá poca capacidad de competir con otros microorganismos); colonizar la superficie de las raíces, para ejercer un efecto fisiológico directo sobre el crecimiento de las plantas; y deben ser inocuas para el suelo, agua, plantas, animales y el hombre (Bach y Díaz, 2008).

Las PGPR pueden promover el crecimiento mediante mecanismos directos e indirectos. Dentro de los mecanismos directos se destacan: la fijación del nitrógeno y producción de sustancias reguladoras del crecimiento. Dentro de los mecanismos indirectos se encuentran la producción de sustancias que movilizan o solubilizan nutrientes, producción de antibióticos, sideróforos, sustancias que inducen la resistencia sistémica y de otras sustancias con actividad para el control de patógenos, como son enzimas líticas y cianuro de hidrógeno. Adicionalmente es importante la actividad ACC desaminasa, involucrada en degradación de etileno producido por las plantas (Bach y Díaz, 2008; Ribaudo *et al.*, 2012).

Producen ácidos orgánicos como el oxálico, cítrico, isobutírico, isovalérico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2–cetoglucónico, que tienen capacidad de formar complejos estables con Al y Fe, reducen el pH en la rizósfera de la planta, condiciones bajo las cuales se incrementa la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn (Paredes y Espinosa, 2010), son capaces de actuar como quelantes del ion calcio en condiciones apropiadas al acidificar el medio, lo que genera disolución de fosfatos de calcio y reducción de la precipitación de los fostatos. En la solubilización del fósforo por las PGPR también pueden actuar enzimas como las fitasas, las cuales permiten la liberación del fósforo insoluble a partir de la hidrólisis de fosfatos orgánicos denominados fitatos (Idriss *et al.,* 2002; Corrales *et al.,* 2014).

La producción de fitohormonas es el mecanismo más importante por el cual muchas PGPR promueven el crecimiento de las plantas (Spaepen *et al.* 2007), producen reguladores de crecimiento, como auxinas, giberelinas y citoquininas o precursores de éstos (Jiménez *et al.,* 2001). Generan una mejor regulación de estomas, lo que evita el deterioro de la planta y produce un desarrollo radical más ramificado, lo que favorece la absorción de agua y la absorción de los nutrientes del suelo (Vernner y Martin, 2009).

Estudios han demostrado que las PGPR pueden estimular el crecimiento de las plantas, mediante la producción de auxinas principalmente el ácido indol acético (AIA) (Spaepen *et al.* 2007). El AIA es responsable de la división, expansión y diferenciación de células y tejidos vegetales y estimula la elongación de las raíces (Kumar *et al.,* 2013).

Entre los géneros de Rizobacterias reportados con capacidad promotora del crecimiento se encuentran *Pseudomonas, Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Erwinia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter* y *Flavobacterium* entre otros (Sánchez *et al.,* 2014).

La inoculación de PGPR (*Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp) en tomate, muestra que estas tienen capacidad intrínseca para solubilizar una fuente de fósforo poco soluble, algunas presentan actividad fosfatasa y son capaces de producir índoles y sideróforos bajo las condiciones evaluadas. Las cepas TVL-2 *Enterobacter* sp y PSO14

Bacillus sp. aumentaron significativamente la biomasa y desarrollo de la planta, así como el rendimiento en la producción de frutos (Sánchez *et al.*, 2012).

1.2.3.1 *Bacillus subtilis:* generalidades y la promoción de crecimiento vegetal

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, familia Bacilliaceae, fillum Firmicutes, aerobia y anaerobia facultativa, quimioheterótrofa, con capacidad de formar endosporas; estructuras de resistencia que pueden permanecer viables, durante una gran cantidad de tiempo, hasta que las condiciones sea favorables para el desarrollo de la forma vegetativa. *B. subtilis* se encuentra con frecuencia asociada a las plantas, ya sea en la rizosfera o en los tejidos internos (Tejera *et al.*, 2011). Puede actuar como agente de control biológico, por sus efectos antagónicos mediante cinco mecanismos: parasitismo directo, producción de antibióticos extracelulares, producción de enzimas líticas, competencia por los nutrientes en el hospedante y estimulación de sus mecanismos de defensas a través de la resistencia sistémica inducida (Ruiz *et al.*, 2016).

Adicionalmente *B. subtilis*, es considerada una especie productora de lipopéptidos, compuestos reconocidos debido a su capacidad de actuar como agentes antimicrobianos, inmunosupresores y citotóxicos (Raaijmakers *et al.*, 2010; Posada, 2017). Se han descrito diferentes potencialidades en cepas de este género, para promover el crecimiento de las plantas, aunque sin duda, su estudio se ha enfocado en la capacidad de ejercer efecto antagónico contra una gran variedad de hongos fitopatógenos (Tejera *et al.*, 2011).

Se ha reportado su efecto promotor de crecimiento mediante distintos mecanismos: Producción de reguladores de crecimiento vegetal, solubilización de fósforo, producción de la 1-aminociclopropano-1-ácidocarboxílico (ACC desaminasa) precursor del etileno, producción de sideróforos y supresión o inhibición del crecimiento de microorganismos perjudiciales por antagonismo, producción de metabolitos secundarios (sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas) e inducción de resistencia sistémica (Mejía *et al.*, 2016).

El género *Bacillus* ha demostrado la capacidad de solubilizar fósforo, destacándose las especies *B. megaterium* y *B. subtilis*, debido a que excretan al medio ácidos orgánicos,

como principal mecanismo de solubilización (Rajankar *et al.,* 2007). Adicionalmente este género ha sido reportado como productor de AIA (Camelo *et al.,* 2011).

Asimismo, en plantas de tomate inoculadas con *B. subtilis* el rendimiento de fruto se incrementó en 25% con respecto al tratamiento testigo sin la bacteria (Mena y Olalde, 2007). En otro trabajo la inoculación de cepas nativas de *B. subtilis* en semillas de tomate, produjo plántulas de mejor calidad y redujo en 50% la fertilización química en comparación con las plántulas que no fueron tratadas (Armenta *et al.,* 2009).

Al evaluar el efecto de cepas nativas de *Bacillus* spp., en el crecimiento y rendimiento de *Capsicum chinense* Jacq., se reportó que dos cepas de *B. subtilis* CBMT2 y CBMT51, manifestaron los más altos valores, en las variables evaluadas a los 60 y 140 días después del trasplante, en comparación con la cepa de *B. cereus* y al testigo sin inocular (Mejía *et al.,* 2016). En chile jalapeño, las plantas inoculadas con cepas nativas de *B. subtilis* presentaron la mayor biomasa seca, en comparación con las inoculadas con las cepas comerciales (Espinoza *et al.,* 2003).

En la caracterización del potencial antagonista de dos cepas del género *Bacillus* y su actividad de control biológico contra *Rhizoctonia solani* en tomate, *B. subtilis* presentó efecto promotor de crecimiento y control de *R. solani*, bajo condiciones de invernadero, estadísticamente superior al testigo sin inocular (Kumar *et al.,* 2013).

1.2.4 HONGOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL:

1.2.4.1 *Trichoderma harzianum*: generalidades y promoción de crecimiento vegetal

Trichoderma harziaunum es un hongo saprofito, cosmopolita, habitante del suelo y de raíces de plantas, simbionte de plantas y parásito de otros hongos. Inicialmente presenta micelio de color blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro, después de la esporulación. Forma conidióforos verdes con diversas ramificaciones perpendiculares, responsables de la producción de esporas denominadas conidios, que pueden ser dispersados por el viento, insectos, herramientas, ropa, etc. (Harman *et al.,* 2004; Romero *et al.,* 2009).

Algunas cepas colonizan la superficie de la raíz, penetran en la epidermis y en algunas capas corticales externas de células, por debajo de la epidermis de las plantas. Libera moléculas bioactivas y al mismo tiempo modifica el transcriptoma y el proteoma de las plantas, lo que genera en las plantas la inducción de vías de resistencia, aumento del crecimiento y mayor absorción de nutrientes (Harman *et al.,* 2004; Harman, 2006).

T. harzianum es conocido por su efecto antagónico contra un amplio rango de fitopatógenos, su ubicuidad, facilidad de aislamiento, cultivo en un gran número de sustratos, alta capacidad de reproducción y colonización en distintos ambientes, de competencia por espacio y nutrientes, ya que crece rápidamente y supera el crecimiento de patógenos (Cubillos *et al.,* 2009; Fernández y Suárez, 2009).

La inoculación de *T. harzianum* aporta otros beneficios a las plantas; a través de la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes en formas disponibles para la planta, y presenta actividad solubilizadora de fosfatos, por tanto se utiliza frecuentemente como un organismo biofertilizante en diferentes productos comerciales (Moreno *et al.,* 2007; Valencia *et al.,* 2007). Promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos mediante la producción de metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal; tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citoquininas que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Altomare *et al.,* 1999).

En la germinación y crecimiento de plántulas de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener) inoculadas con cepas de *T. harzianum*, nativas de la zona bananera del corregimiento de Sevilla (Magdalena, Colombia), se encontró que todos los tratamientos estimularon la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas; sin embargo, en concentraciones 10^6 y 10^8 conidias.mL^{-1} mostró resultados superiores frente a la cepa control (Cubillos *et al.,* 2009).

Un estudio realizado con la cepa nativa de Yucatán *T. harzianum* (Th43-14) para el control de *Meloidogyne incognita* en tomate, indujo incrementos significativos en la altura y en la ganancia de biomasa seca total, respecto al testigo sin la aplicación del hongo, por tanto concluyen que esta cepa tiene efecto bioestimulante que promueve el crecimiento y desarrollo de plantas de *S. lycopersicum* (Pinzón *et al.,* 2015).

1.2.4.2 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA): generalidades y promoción de crecimiento vegetal

Los HMA forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas. Una parte de ellos crece en el interior de la raíz, en el apoplasto de las células corticales y la otra en su exterior, ambas comunicadas por un micelio externo que explora gran superficie de suelo. Se consideran microorganismos simbióticos obligados, es decir no pueden completar su ciclo de vida, sin establecer simbiosis con la raíz de una planta, razón por la cual estos hongos no se pueden cultivar sin la presencia de raíces, tanto *in vitro* como en condiciones de invernadero. Se denominan arbusculares ya que en las células corticales de la raíces, sus hifas forman estructuras, que parecen tener forma de arbolitos microscópicos. Además en muchas ocasiones al colonizar la planta intraradicalmente, desarrollan unas estructuras que reciben el nombre de vesículas, donde almacenan sustancias de reserva (Reyes, 2011).

La aplicación de HMA en los sistemas agrícolas sostenibles, tiene potencial en la reducción de las afectaciones producidas por patógenos y otros beneficios entre los que se encuentran, incrementos en el crecimiento y productividad de las plantas, mejoras en la nutrición del fósforo y tolerancia a toxicidad de metales (Pérez *et al.*, 2010).

Por medio de sus hifas los HMA transportan varios elementos del suelo al interior de la planta huésped, entre ellos fósforo, zinc y cobre, cuya disponibilidad para las plantas es limitada. Estos hongos por medio de su micelio extraradical pueden explorar mayor área de superficie de suelo, lo que le permite una mayor capacidad de captación de agua, y a su vez reduce el estrés hídrico causado por alta salinidad, metales pesados y compuestos tóxicos que se pueden acumular en el suelo. El micelio extraradical es profuso y contribuye a la formación de agregados del suelo, con lo cual mejora sus propiedades físicas evitando la erosión (Reyes, 2011).

Se han demostrado los efectos benéficos de la asociación simbiótica entre los HMA y las plantas tales como: incremento en la superficie de absorción de agua y de nutrimentos, de los pelos radiculares, más el producido por la cobertura del hongo, incremento de la vida útil de las raíces absorbentes, mejoramiento de la absorción iónica y acumulación eficiente, especialmente, en el caso del fósforo, solubilización de minerales, que facilita su absorción, aumento de la capacidad fotosintética y por ende, de la producción de biomasa de las

plantas, resistencia de raíces a infecciones causadas por patógenos, ocupación de los espacios radiculares, incremento de la tolerancia de las plantas a toxinas del suelo, a valores extremos de acidez del suelo y disminución del estrés causado por factores ambientales (Cano, 2011).

Los HMA inducen cambios en la composición de los exudados de las raíces, al modificar la estructura de la comunidad bacteriana de la rizosfera, lo que lleva a la formación de la micorrizosfera, por lo cual, pueden ser utilizados como agentes de control biológico (BCA) de enfermedades de la raíz; el efecto de los HMA sobre las bacterias de la rizosfera estaría mediado por factores físicos o químicos de compuestos volátiles o superficiales asociados con el micelio del hongo y el sustrato (Lioussanne *et al.*, 2010).

Con la aplicación de *Glomus cubense* y humus de lombriz en tomate bajo sistema protegido, se encontró que la aplicación de HMA, fue más eficiente que el humus de lombriz, al 25% de la dosis de fertilizante mineral. Por otra parte al incrementarse la fertilización mineral al 50%, se pudo apreciar sinergismo entre ambos productos, al ser más eficiente la aplicación combinada, obteniéndose una producción superior a la que aportó la dosis óptima del fertilizante mineral. La aplicación combinada de los HMA y humus de lombriz, mejoraron la calidad bromatológica de los frutos de tomate, con respecto a los parámetros de sólidos solubles totales (^{o}Brix) y vitamina C (Charles y Martin, 2015).

En estudios realizados para evaluar la aplicación de HMA, *Rhizophagus intraradices* en cultivo de tomate, bajo condiciones de cultivo protegido, encontraron que plantas inoculadas con HMA incrementaron significativamente el contenido de clorofila, altura de planta comparado con plantas no inoculadas. Igualmente, se observaron incrementos significativos en el largo, diámetro y peso de fruto, además, aumentó el rendimiento de fruto por corte y el rendimiento acumulado en 30% (Alvarado *et al.*, 2014).

La biofertilización de tomate con *Glomus cubense*, con inoculantes líquidos y sólidos en semillero bajo condiciones de estrés abiótico, tiene un efecto positivo en el crecimiento y rendimiento a pesar de las condiciones desfavorables (Mujica y Fuentes, 2012).

1.2.4 CONSORCIOS DE MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (MPCV).

La complejidad de las interacciones entre microorganismos y el efecto de su aplicación en plantas en forma de consorcios (en asociación o unión de varios tipos microorganismos), dificulta el análisis de estos sistemas. La mayoría han evaluado el efecto de la aplicación individualmente y en agrupaciones del mismo tipo de microorganismo, sus interacciones, posibles simbiosis o antagonismos y el efecto que esto genera en la planta hospedera, pero no existen muchos estudios sobre consorcios de diferentes tipos de microorganismos.

Estudios realizados sobre el efecto de HMA y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate, encontraron que para los tratamientos inoculados, se obtuvieron los mayores valores de rendimiento con *Glomus mosseae, G. mosseae + Pseudomonas flourescens y G. mosseae + Azospirillum brasilense* combinadas con el 50 % de la fertilización nitrogenada. La inoculación de HMA con bacterias rizosféricas mejoró la absorción de nitrógeno y fósforo (Hernández y Chailloux, 2004).

Al evaluar el crecimiento y los cambios morfológicos de las raíces de los cultivares de fresa Senga Sengana, Kent y Elsanta, tratados con una mezcla de *Glomus* spp. (*G. mosseae, G. intraradices, G. caledonium, G. viscosum* y *G. coronatur*), *Trichoderma viride* y *B. subtilis, P. fluorescens* y *Streptomyces* spp.) y fertilizantes foliares, encontraron aumento en el crecimiento de las raíces en los tres cultivares, lo que se relacionó con el aumentó el pH de la rizosfera, por la actividad de microorganismos y la respuesta genotípica de los cultivares a la inoculación (Malusa *et al.*, 2007).

Bacterias del suelo asociadas a HMA, en *Solanum tuberosum* L., aumentaron la colonización de los HMA y su capacidad de inhibir patógenos como *Erwinia carotovora, Phytophthora infestans* y *Verticillium dahliae*. También aumentaron la solubilización de fósforo y la producción de ácido indol acético, lo que mejoró su capacidad para adquirir nutrientes minerales y el crecimiento de las plantas (Bharadwaj *et al.*, 2008).

Al evaluar la interacción entre *G. mosseae* y hongos promotores de crecimiento de plantas, como *Penicillium simplicissimum* GP17-2 y *T. harzianum* GT3-2 en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), encontraron que la co-inoculación de *G. mosseae* con *T. harzianum* mostró sinérgicamente un mayor crecimiento de las plantas. Además notaron

que la inoculación combinada de los tres microorganismos suprimió la enfermedad damping-off, ocasionada por *R. solani*, y *G. mosseae* redujo la incidencia de la enfermedad, si era previamente inoculado en las plantas antes que el patógeno. Igualmente, observaron que la inoculación combinada de *T. harzianum* con *G. mosseae* aumentó el porcentaje de colonización radical de los HMA. En contraste, la presencia de *G. mosseae* disminuyó el desarrollo de la población de *T. harzianum* alrededor de las raíces; sin embargo, el crecimiento de *P. simplicissimum* no se afectó. La protección contra la enfermedad con la inoculación de cada una de las especies solas, *P. simplicissimum*, *T. harzianum* y *G. mosseae* fue aumentando significativamente, cuando se combinó cada una con *G. mosseae* (Chandanie *et al.*, 2009).

Sobre las interacciones entre HMA, *Trichoderma* y *Pseudomonas*, se reportan relaciones antagónicas o sinérgicas durante el establecimiento, adaptación y proliferación de los microorganismos en la rizosfera, debido a la producción de compuestos antibióticos por parte de los mismos. *Trichoderma* produce compuestos anti fúngicos, que reducen la colonización radicular de los HMA. Por otra parte los exudados del micelio de los HMA, pueden estimular la presencia de bacterias, como *Pseudomonas*, en la rizosfera. A pesar de estos cambios en la comunidad microbiana de la rizosfera, los efectos benéficos en las plantas, debido a la inoculación de los consorcios, como el control de agentes patógenos y la promoción del crecimiento en las plantas se mantienen. Esto puede deberse a la acción complementaria de estos microorganismos para el beneficio de las plantas, a pesar de que se de la competencia entre especies. Las interacciones de los microorganismos micorrizas, *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. contribuyen al control biológico de patógenos y a la estimulación del crecimiento vegetal (Cano, 2011).

La producción de plántulas de *Agave tequilana* Weber var. Azul, mediante la inoculación de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* o la mezcla de ambos, se encontró que estos microorganismos se establecen en el área de la rizosfera, generando un ambiente de equilibrio de poblaciones antagonistas, que no permite que las poblaciones de *Fusarium* spp. se aumenten. Por tal razón las plántulas estarán mejor preparadas para enfrentar las condiciones de estrés del trasplante y la presión de la población nativa de organismos habitantes del suelo (Tlapal *et al.*, 2014).

1.3 HIPOTESIS

- El uso del consorcio de microorganismos promotores de crecimiento vegetal formado por *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares, permite obtener plántulas de tomate, de igual crecimiento y calidad, a las obtenidas mediante fertilización química.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV): *Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum* y Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) en el crecimiento y calidad de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el número e intervalo de aplicaciones de los MPCV: *Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum* y HMA en forma individual y su efecto en el crecimiento y calidad de plántulas de tomate.

2. Evaluar el crecimiento y calidad de plántulas de tomate obtenidas con la aplicación de tratamientos de consorcios de MPCV: *B. subtilis, T. harzianum* y HMA.

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se trabajó con cepas del Instituto Tecnológico de Conkal, de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV) *B. subtilis* cepa K-47 y *T. harzianum* cepa 33-59, que se multiplicaron en el laboratorio, para preparar las soluciones de los inoculantes ajustadas a concentraciones de 10^8 y 10^7 esporas.mL^{-1}, respectivamente. En cuanto a los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) se trabajó con el producto comercial Rizofermic que contiene 20 esporas.g^{-1} de 11 especies de HMA con una dosis de un gramo por alveolo.

Se evaluó el efecto en el crecimiento y calidad de plántulas de tomate, híbrido Pony express, en tres momentos de inoculación de los MPCV, para cada uno de los microorganismos: 1) solo en semilla, 2) en semilla con refuerzo en alveolo el primer día después de la siembra (dds) y 3) en semilla con refuerzo en alveolo a los 13 dds, un testigo químico y un testigo sin inocular. Se estableció un diseño completamente al azar DCA, con 11 tratamientos, cinco repeticiones y se midieron las variables de crecimiento a los 19 y 28 dds.

Se realizó un segundo ensayo, donde se aplicó la mejor forma de inoculación obtenida en el ensayo uno, con los tratamientos de los tres microorganismos individualmente y los consorcios conformados por parejas y los tres microorganismos, comparados con un testigo químico y un testigo sin inocular. Se estableció en un diseño experimental completamente al azar, con nueve tratamientos, 20 repeticiones y se midieron las variables no destructivas a los 19, 24, 29 y 34 dds y un muestreo final no destructivo a los 45 dds.

A partir de los valores obtenidos se calcularon los índices de calidad de plántula. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq .0.05$).

1.6. LITERATURA CITADA

Alvarado C., M., A. Díaz F. y M. A. Peña. 2014. Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas 5(3): 513-518.

Altomare, C., W. Norvell, T. Björkman y G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microb. 65(7): 2926-2933.

Armenta B., A. D., V. M., Airola G., y M. A. Apodaca S. 2009. Selección de aislados nativos de *Bacillus subtilis* para la producción de plántulas de tomate en Sinaloa. En: Primer Simposium Internacional de Agricultura Ecológica. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. pp. 252-256.

Bach A., T., y M., Díaz. 2008. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. Revista Agricultura Orgánica 3: 35-36.

Bharadwaj, D.P., P.O. Lundquist, y S. Alströma. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungal spore-associated bacteria affect mycorrhizal colonization, plant growth and potato pathogens. Soil Biology & Biochemistry 40(10): 2494-2501.

Camelo R., M.; S. P. Vera M., R. Re. Bonilla B. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria 12(2): 159-166.

Candelero D., J., A. J. Cristóbal A., A. Reyes R., J.M. Tun S., M. M. Gamboa A. y E. Ruíz S. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. Revista Internacional Botánica Experimental Phyton 84(1): 113-119.

Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 14(2): 15-31.

Chandanie, W.A., M. Kubota, y M. Hyakumachi. 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Applied Soil Ecology 41(3): 336-341.

Charles N. J. y N. J. Martin. A. 2015. Uso y manejo de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y humus de lombriz en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), bajo sistema protegido. Rev. Cultivos Tropicales 36(1): 55-64.

Corrales R., Z. Y., G. Arévalo, V. y E. Moreno B. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 12(21):67-79.

Cubillos H., J. Valero, y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener). Rev. Agronomía Colombiana 27(1): 81-86.

Espinoza, V., M.A., A.D. Armenta, B. y P.V. Olalde.2003. Interacción de micorriza *y Bacillus subtilis* en la producción de plántula de chile en invernadero. XII Congreso nacional de Ingeniería agrícola y II foro de la agroindustria del mezcal (memorias). AMIA.

Fernández B., R. J., y C. L. Suárez M. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium oxysporum* schlecht f. sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* sims var. Flavicarpa) del municipio zona bananera Colombiana. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 62(1): 4743-4748.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. (FIRA). 2017. Panorama Agroalimentario, Tomate Rojo. pp.1-5.

Hariprasad, P., H. M., Navya, N. S. Chandra, y S. R. Niranjana, 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. Biological Control 50(3): 307-316.

Harman, G. E., C.R. Howell, A.Viterbo, I. Chet y M. Lorino. 2004. *Trichoderma* species-- opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2(1):43-56.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(2):190–194.

Hernández, M. I. y M. Chailloux. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. Rev. Cultivos Tropicales 25(2): 5-12.

Idriss E., E, O. Makarewicz, A. Farouk, K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, T. Richter y R. Borriss. 2002. Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. Microbiology 148(7): 2097-3109.

Jiménez D. R., Virgen C. G., Tabares, F. S. y Olalde, P. V. 2001. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas: Agro-biotecnología. Avances y perspectivas. 20: 395-400.

Lioussanne, L., F. Perreault, M. Jolicoeur y M. Starnaud, M. 2010. The bacterial community of tomato rhizosphere is modified by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi but unaffected by soil enrichment with mycorrhizal root exudates or inoculation with *Phytophthora nicotianae*. Soil Biology & Biochemistry 42(3):473-483.

Malusa, E.; L. Sas P, L.; Popinska, W. y Zurawicz, E. 2007. The Effect of a Substrate Containing Arbuscular Mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms (*Trichoderma, Bacillus, Pseudomonas* and *Streptomyces*) and foliar fertilization on growth response and rhizosphere pH of three strawberry. International Journal of Fruit Science 6(4): 25-41.

Mejía, M. A. y A. Reyes R. 2016. *Bacillus* nativos antagonistas y su efecto en la sanidad y desarrollo del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Doctorado en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable. Instituto Tecnológico de Conkal. 106 p.

Mena V., H. G. y V. Olalde P. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Scientia Horticulturae 113(1): 103-106.

Moreno S., N., L. Moreno R. y D. Uribe V. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. 38-45.

Mujica P. Y., y A. Fuentes M. 2012. Efecto de la biofertilización con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo del tomate en condiciones de estrés abiótico. Rev. Cultivos Tropicales. 33(4): 40-46.

Paredes M., M., y D. Espinosa V. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28: 61-70.

Pérez O., E.J., A. Hernández R., y O. León S. 2010. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de La Habana.

Pinzón E. L., J. Candelero de la Cruz, J. M. Tun S., V. Reyes O. y J. Cristóbal A. 2015. Control de *Meloidogyne incognita* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la aplicación de *Trichoderma harzianum*. Rev. Fitosanidad 19(1): 5-11.

Posada U., L. F. 2017. Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico. Tesis de grado Doctorado en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. 201 p.

Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. Rev. FEMS Microbiol. 34(6): 1037-62.

Rajankar PN, Tambekar DH, Wate SR. 2007. Study of phosphate solubilization efficiences of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 3(6):701-3.

Reyes J., I. 2011. La Micorriza Arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica, dinámica del suelo. Rev. ContactoS 81: 17–23.

Ribaudo, C. M., J. A. Curá, C. Ponds, A. Granell R. y M. L. Cantore. 2012. Rizósfera, biodiversidad y agricultura sustentable. Asociación Argentina de Microbiología pp. 215-239.

Romero A., O., M. Huerta L., M.A. Damian H., F. Domínguez H., D.A. Arellano V. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Rev. Colombiana de Biotecnología 9(2): 143-151.

Rojas, F. 2002. Metodología para la evaluación de la calidad de plántulas de ciprés (*Cupressus lusitanica* Mill.) en vivero. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 8(1): 75-81.

Ruiz S., E., M. A. Mejía B., A. Serrato D., A, Reyes R., Y. Estrada G. y A. J. Valencia B. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. Agrociencia 50(2): 134-148.

Sánchez L., D. B., A.M. García H., F. A. Romero P., y R. R. Bonilla B. 2014. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Revista Colombiana de Biotecnología 16(2): 122-128.

Sánchez L., D.B., R. M. Gómez V., M. F. Garrido R. y R. R. Bonilla B. 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 3(7): 1401-1415.

Spaepen S., J. Vanderleyden, y R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev. 31(4): 25-48.

Tejera H., B., M. M. Rojas B., y M. Heydrich P. 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.

Tlapal B., B., H. González H., E. Zavaleta M., P. Sánchez G., G. Mora A., C. Nava D., J. I. del Real L., R. Rubio C. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de Fusarium. Revista Mexicana Fitopatología 32(1): 62-74.

Valencia, H., J. Sánchez, D. Vera, N. Valero y M. Cepeda. 2007. Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Sánchez, J. (ed.). Universidad Nacional de Colombia pp.169-183.

Vernner R. y Martin, H. J. 2009. Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivo uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis de grado de Microbiología Agrícola. Pontificia Universidad Javeriana. 61 p.

II. CAPÍTULO 2

INOCULANTES MICROBIANOS EN LA CALIDAD DE PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*).

Ligia P. González-Wilches[1], José M. Tun-Suárez[1*], Arturo Reyes-Ramírez[1], Jairo Cristóbal-Alejo[1] y Carlos. J. Alvarado-López.[2]

[1]Instituto Tecnológico de Conkal, Km. 16.3 Antigua carretera Mérida-Motul. Estado Yucatán. [2]Catedratico CONACYT-[1]Instituto Tecnológico de Conkal, División de Estudios de Posgrado e Investigación, *(jose.tun@itconkal.edu.mx)

2.1 RESUMEN

Ante los costos y la contaminación que implica la producción de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) vigorosas y de calidad, para su cultivo comercial; el empleo de inoculantes microbianos con capacidad promotora de crecimiento vegetal, representa una alternativa viable para reducir el uso de fertilizantes. Razón por la cual, en este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), de forma individual y en consorcios, en el crecimiento y calidad de plántulas de tomate híbrido Pony express. Primero, se definió el número e intervalo de inoculación de los microorganismos con la evaluación de tres variantes: 1) la inoculación solo en semilla, 2) inoculación en semilla y refuerzo un día después de siembra (dds.) y 3) inoculación en semilla y refuerzo a los 13 dds. Después se evaluó los inoculantes de forma individual y en consorcios, bajo un diseño completamente al azar. Los resultados indicaron que la aplicación de los inoculantes microbianos a la semilla y al sustrato a los 13 dds, tiene un mayor efecto promotor de crecimiento en las plántulas de tomate; y el consorcio de *B. subtilis*, *T. harzianum* y HMA manifestó un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento y calidad de plántulas de tomate, en comparación con los demás tratamientos, al registrar valores similares al control con fertilización. Sin embargo, al carecer de fertilización, las plántulas inoculadas, presentaron un contenido nutrimental bajo. Esta respuesta sugiere, que la aplicación del consorcio de inoculantes microbianos, permite reducir la fertilización química en la producción de plántulas de tomate, pero se requiere determinar la dosis óptima de fertilización.

Palabras clave: Consorcio, *Bacillus subtilis*, hongos micorrízicos arbusculares, inoculación, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

Given the costs and contamination involved in the production of high quality and vigorous tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.), for commercial cultivation; the use of microbial inoculants with plant growth promoting capacity represents a viable alternative to reduce the use of fertilizers. This is the reason why in this study, was assessed the effect of the application of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* and mycorrhizal fungi (AMF), individually and in consortia, on the growth and quality of Pony express hybrid tomato seedlings. First, the number and interval of inoculation of the microorganisms was defined with the evaluation of three variants: 1) only in seed inoculation, 2) inoculation in seed and reinforcement one day after sowing (dds.) And 3) inoculation in seed and reinforcement at 13 dds. The inoculants were then evaluated individually and in consortiums, under a completely randomized design. The results indicated that the application of microbial inoculants to the seed, and the substrate at 13 dds has a greater growth-promoting effect on tomato seedlings; and the consortium of *B. subtilis*, *T. harzianum*, and AMF showed a synergistic effect in the promotion of the growth and quality of tomato seedlings; In comparison with the other treatments, registering similar values to the control with fertilization. However, in the absence of fertilization, the inoculated seedlings had a low nutritional content. This response suggests that the application in the consortium of microbial inoculants allows to reduce chemical fertilization in tomato seedling production, but it is necessary to determine the optimal fertilization dose.

Keywords: Consortium, *Bacillus subtilis*, fungi mycorrhizal arbusculares, inoculation, *Trichoderma harzianum*.

2.2. INTRODUCCIÓN

Uno de los puntos críticos en los sistemas de producción agrícola, es partir de plántulas vigorosas y de calidad fitosanitaria (Rojas, 2002). Para obtenerlas se emplean tecnologías y agroquímicos que aumenta los costos de producción, generan impacto negativo ambiental y en la salud humana. Para mitigar los efectos generados por el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas químicos, es necesario desarrollar esquemas de producción de plántulas y manejo del cultivo, que sean inocuas y económicamente rentables, con enfoque hacia una agricultura sostenible.

Una alternativa viable para reducir el uso de agroquímicos es el empleo de inoculantes biológicos, como los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV) que han demostrado su efectividad al promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante mecanismos de solubilización y captación de nutrientes, fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal y control biológico de patógenos (Bach y Díaz, 2008). Dentro de los MPCV reportados se destacan *Bacillus subtillis*, *Trichoderma harzianum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

En este sentido *B. subtillis* es una bacteria promotora de crecimiento en cultivos de *Solanum lycopersicum* (Mena y Olalde, 2007), *Abelmoschus esculentus* y *Amaranthus* sp. (Adesemoye *et al.,* 2008), y *C. annuum* (Peña *et al.,* 2016), entre otros, y antagonista contra *Rhizoctonia solani* (Selva *et al.,* 2013), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ruiz *et al.,* 2014), etc. Así mismo, *T. harzianum* es un hongo saprófito, promotor de crecimiento en plantas de *Pinus radiata* (Donoso *et al.,* 2008), plántulas de *Passiflora edulis* (Cubillos *et al*., 2009), *Pisum sativum* (Camargo y Ávila, 2014), *S. lycopersicum* (Moo-Koh *et al.,* 2016), entre otros y antagonista de *Fusarium* sp. (Reyes *et al.,* 2012; Mis *et al.,* 2015), *Capsicum chinense* (Candelero *et al.,* 2015), y *Meloidogyne incognita* en *S. lycopersicum* (Pinzón *et al.,* 2015). Por otra parte los HMA forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas que mejoran el crecimiento, y reducen las afectaciones causadas por patógenos en *S. lycopersicum*, donde aumenta el crecimiento, rendimiento y calidad de fruto (Alvarado *et al.,* 2014; Charles y Martin, 2015).

Estos MPCV han demostrado su efectividad al ser inoculados de manera individual o consorcios de cepas de especies del mismo o diferente género en varios cultivos como la

asociación de bacterias del suelo con HMA en *S. tuberosum*, estimuló el crecimiento, mejoró la captación de nutrientes y redujo la severidad de enfermedades (Bharadwaj *et al.*, 2008), y la interacción de *Glomus mosseae* y *T. harzianum*, en plantas de *Cucumis sativus* L., propició un efecto sinérgico en el crecimiento de las plantas (Chandanie *et al.*, 2009). Sin embargo, existen pocos estudios de la respuesta cuando se aplican en consorcios (asociaciones de distintos tipos microorganismos) de diferentes géneros en calidad de plántulas; y por otra parte varios autores han reportado un efecto diferenciado, que se atribuye al tipo de cepa microbiana, el cultivo y las condiciones de su establecimiento.

Estos resultados sugieren que la aplicación del consorcio de los tres MPCV en plántulas de tomate, incrementa el efecto sinérgico del crecimiento y calidad fitosanitaria en comparación con su aplicación individual o en consorcio de dos MPCV. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el número e intervalo de aplicaciones de MPCV: *B. subtilis*, *T. harzianum* y HMA, en forma individual y en consorcios, y su efecto en el crecimiento y calidad de plántulas de *S. lycopersicum.*

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Instituto Tecnológico de Conkal (ITC), Yucatán, México, durante el período de enero de 2017 a febrero de 2018. Comprendió dos ensayos: 1) Determinar el número e intervalo de aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV) y 2) Respuesta de la inoculación de MPCV de forma individual y en consorcios en el crecimiento y calidad de plantas de tomate hibrido Pony express.

2.3.1 Preparación de inoculo de los microorganismos

Las cepas K-47 de *Bacillus subtilis* (Gen bank KC223575), y 33-59 *Trichoderma harzianum* (Gen bank MF078648), pertenecen al cepario de los laboratorios de Microbiología y Fitopatología (respectivamente) del Instituto Tecnológico de Conkal. Se realizó la multiplicación de las mismas, como se describe a continuación:

B. subtilis, se activó en agar Nutritivo contenida en caja Petri de 6cm de diámetro y se verificó su mediante tinción de Gram, se observó que todas las células fueran bacilos gram positivos, sin presencia de contaminantes. La cepa se incrementó en cultivó de caldo nutritivo (CN) en matraces de 250 mL, a 30ºC con agitación constante a 150 RPM, durante siete días, hasta que se detectó esporulación. Este medio de cultivo se depositó en tubos eppendorf de 50 mL y se centrifugó a 3000 RPM, 28°C por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sólido blanco del fondo con la bacteria se suspendió en 100mL de agua destilada estéril. En la solución obtenida se determinó la concentración, mediante conteo en cámara de Neubauer y diluyó hasta ajustar a 10^8 esporas.mL^{-1} (Rivera *et al.*, 2016).

T. harzianum, se reactivó e incrementó en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) contenida en caja Petri de 10 cm de diámetro, que se incubó a condiciones ambientales, hasta que el micelio del hongo cubrió la caja Petri y se detectó la esporulación. A la caja Petri con la cepa del hongo se le adicionó nueve mililitros de agua destilada estéril y se raspó. La solución se filtró a través de una de gasa y deposito en un tubo ependorff de 50 mL, para obtener la solución madre de esporas, de la cual se tomó una alícuota de 100µL y diluyó en 900µL de agua destilada estéril (Moo *et al.*, 2014). En la solución obtenida se

determinó la concentración, mediante conteo en cámara de Neubauer y diluyó hasta ajustar a 10^7 esporas.mL^{-1}.

En cuanto a los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), se empleó el producto comercial Rizofermic, producido por la Universidad Veracruzana que contiene 20 esporas. g^{-1} de 11 especies de HMA nativos del estado de Veracruz: *Acaulospora morrowiae, Acaulospora spinosa, Acaulospora scrobiculata, Funneliformis mosseae, Funneliformis geosporus, Gigaspora rosea, Gigaspora decipiens, Glomus macrocarpum, Glomus aggregatum, Rhizophagus intraradices, Scutellospora pellucida y Claroideoglomus etucaticum*. Se empleó una dosis de 2 esporas.mL^{-1} solución para la inoculación en semilla y 20 esporas/planta y en la cavidad de la charola.

2.3.2 Ensayo 1: Efecto de diferentes aplicaciones de inoculantes de MPCV

Para evaluar el efecto de tres diferentes formas de inoculación de los MPCV: 1) Inoculación en semilla, 2) Inoculación en semilla y en la cavidad de la charola el primer día después de siembra (dds) y 3) Inoculación en semilla y en la cavidad de la charola a los 13 dds. La concentración de las soluciones para cada microorganismo fue: *B. subtilis* 10^8 esporas.mL^{-1}, *T. harzianum* 10^7 esporas.mL^{-1} y Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) 2 esporas.mL^{-1} solución inoculación en semilla + 20 esporas por planta en la cavidad de la charola.

2.3.2.1 Inoculación de semilla con MPCV

Las semillas de tomate híbrido Pony express (*S. lycopersicum*) se lavaron tres veces en agua destilada estéril, para eliminar los plaguicidas externos con la que fue tratada para prevenir el ataque de patógenos con origen en el suelo. Se conformaron 11 grupos de 100 semillas que fueron sumergidas en 50 mL de la solución de microorganismos correspondiente al tratamiento: 1. (TQ): Testigo químico, fertilizado con Polifeet 1g.mL^{-1} cada tercer día, a partir de 10 días después de la germinación, 2. (TN): Testigo no inoculado 3. (BSs): *Bacillus subtillis* inoculado en semilla. 4. (BS1dds): *B. subtillis* inoculado en semilla y refuerzo el primer día después de siembra. 5. (BS13dds): *B. subtillis:* inoculado en semilla y refuerzo 13 dds. 6. (MAs): Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) inoculado en semilla. 7. (MA1dds): HMA inoculado en semilla y refuerzo 1 dds. 8. (MA13dds): HMA: Micorrizas inoculado en semilla y refuerzo 13 dds. 9. (THs): *Trichoderma harzianum* inoculado en semilla. 10. (TH1dds): *T. harzianum:*

inoculado en semilla y refuerzo 1 dds. 11. (TH13dds): *T. harzianum* inoculado en semilla y refuerzo 13 dds. Para mejorar la adherencia de los MPCV se adicionó Tween 20 (tensoactivo tipo polisorbato) al 0.5% de concentración a la solución. Las soluciones con las semillas se sometieron a agitación constante a 180 RPM a 30ºC durante 10 minutos. Para la inoculación realizada al 1 dds y 13 dds, se aplicó en cada cavidad de la charola, 4mL de la solución de microorganismos a las concentraciones anteriormente mencionadas. Se realizó la siembra el 13 de abril de 2017 y se hizo seguimiento durante 28 días.

2.3.2.2 Germinación de semillas

Las semillas de tomate tratadas con los MPCV y testigos se germinaron en charolas de poliestireno de 77 cavidades redondas de uso forestal (60cm de largo, 35 cm de ancho, 16 cm de alto con un diámetro de cavidad de 3.9 cm). Esto con el fin de que las plántulas tengan mayor espacio para su desarrollo y se pueda expresar el efecto de los MPCV. Fueron previamente lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min, y provistas de sustrato comercial sunshine (70% a 80% de turba canadiense esfagnácea, vermiculta, piedra caliza, yeso agrícola y agente humectante), se depositó una semilla inoculada previamente por cavidad y se agregó la solución de MPCV al sustrato a los tratamientos correspondientes. Las charolas se cubrieron con plástico negro para mantener la humedad y temperatura estable e inducir una germinación homogénea, y al germinar se destaparon y trasladaron a una estructura protegida.

2.3.3 Ensayo 2: Evaluación de aplicación de tratamientos de consorcios de MPCV

El tratamiento de inoculación de los MPCV en semilla y refuerzo de 4 mL de solución de microorganismos aplicado al sustrato de la cavidad de las plántulas a los 13 dds, fue el que resultó adecuado con base a las variables evaluadas en el ensayo 1 y fue considerado para evaluar el efecto de la aplicación de MPCV: *B. subtilis*, *T. harzianum* y HMA, en forma individual y en consorcios, en el crecimiento y calidad de plántulas de *S. lycopersicum*.

2.3.3.1 Inoculación de semilla con MPCV

La inoculación de las semillas de tomate (*S. lycopersicum*) híbrido Pony express fue similar al ensayo 1, las diferencias fueron que se conformaron nueve grupos de 50 semillas y los tratamientos: 1. (TQ): Testigo químico, fertilizado con Polifeet 1g.mL^{-1} cada tercer

día, 10 días después de la germinación, 2. (TN): Testigo no inoculado 3. (BS): *Bacillus subtillis* 4. (MA): Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), 5. (TH): *Trichoderma harzianum*, 6. (BS+MA) *B. subtillis* + HMA, 7. (BS+TH) *B. subtillis* + *T. harzianum*, 8. (TH+MA) *T. harzianum* + HMA y 9. (BS+MA+TH): *B. subtillis* + *T. harzianum* + HMA, se realizó la siembra el 3 de agosto y evaluó durante 45 días.

2.3.3.2 Germinación de semillas

El procedimiento de siembra y germinación fue similar al ensayo 1.

2.3.3.3 Manejo de plántulas

Las plántulas se regaron diariamente, con el mismo volumen de agua por tratamiento, se monitorearon para hacer seguimiento a las variables de estudio y verificar la sanidad de las plántulas.

2.3.4 Variables de estudio

En los dos ensayos, en los muestreos destructivos se midieron las variables de crecimiento: Altura de plántula (cm), diámetro de tallo (mm) en la base del tallo, número de hojas, área foliar (cm^2), masa seca parte aérea (MSA) (g) y masa seca raíz (MSR) (g). A partir de los valores obtenidos se calcularon los índices de calidad de plántula: el índice de robustez mediante el cociente entre altura de la plántula (cm) y diámetro del tallo (mm) y el índice de calidad de Dickson (Masa total de la planta) / ((Altura/Diámetro) + (MSA / MSR)) (Birchler *et al.*, 1998).

Adicionalmente se determinó el porcentaje de colonización micorrízica, en los tratamientos micorrizados y el testigo, mediante la técnica de tinción desarrollada por Rodríguez *et al.* (2015), con variaciones en los tiempos sugeridos. Para la decoloración, las raíces fueron sumergidas cinco minutos en solución de KOH al 10% y para se tiñeron con tinta Parker durante tres minutos.

Para el ensayo dos, se determinó el contenido de nutrientes en las plántulas, con un espectrómetro de microfluorescencia de rayos X, M4 TORNADO 100, marca Bruker.

2.3.5 Diseño experimental y análisis estadísticos

Los dos ensayos se establecieron en un diseño completamente al azar (DCA). El ensayo 1, constó de 11 tratamientos cada uno con cinco repeticiones y nueve plantas por unidad experimental. Se realizaron dos muestreos destructivos a los 19 dds y 28 dds. El ensayo 2, estuvo conformado por nueve tratamientos cada uno con veinte repeticiones y una planta como unidad experimental. Se realizaron cuatro muestreos no destructivos a los 19, 24, 29 y 34 dds para medir: altura de plántulas (cm), diámetro de tallo (mm) y número de hojas y un muestreo final destructivo a los 45 dds.

Los resultados de las variables medidas se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias con prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) y se procesaron los datos con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Efecto de diferentes aplicaciones de inoculantes de MPCV

El análisis estadístico de las variables de estudio, para definir el número e intervalo de aplicaciones de inoculantes microbianos y su efecto sobre el crecimiento y calidad de plántulas de tomate (Cuadro 1); manifestó diferencias significativas entre tratamientos, que no son consistentes para las dos fechas de evaluación, a los 19 dds y 28 dds, con excepción del tratamiento a base del inoculante microbiano de *Trichoderma harzianum*.

Las semillas de tomate que manifestaron los valores más altos en las variables de crecimiento (altura, área foliar, masa seca aérea y diámetro de tallo), índice de calidad de Dickson fueron las inoculadas con *T. harzianum* (al 1er. dds o 13 dds) en ambas fechas de evaluación, fueron superiores a los registrados por los inoculantes microbianos *B. subtilis* y Micorrizas; y tratamientos con fertilización y sin inoculo (Cuadro 1). Estos tratamientos también presentaron los menores valores de índice de robustez, indicador de plántulas más robustas.

Los tratamientos *B. subtilis*, *T. harzianum* y Micorrizas, inoculados en la semilla y aplicación a los 13 dds en ambas fechas de evaluación (19 dds y 28 dds) manifestaron valores superiores o similares en las variables de crecimiento (área foliar, masa seca aérea, diámetro del tallo y masa seca raíz) e índice de Dickson, en relación a los registrados en el tratamiento con fertilización, tratamiento sin inoculo, los tratamientos inoculados solo en semilla y en semilla con segunda aplicación el 1er. dds. Pero la mayor altura se obtuvo en los tratamientos *T. harzianum* y Micorrizas, inoculado en la semilla y aplicación al 1er. dds en ambas fechas de evaluación (19 dds y 28 dds) (Cuadro 1).

Estos resultados indican que la inoculación de los microorganismos a la semilla y una aplicación al sustrato a los 13 dds, fue el número e intervalo de inoculación, que permitió un mejor efecto promotor del crecimiento en plántulas de tomate hibrido Pony express.

Cuadro 1. Efecto de distintas formas de inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal, en parámetros de calidad de plántulas de tomate a los 19 y 28 días después de siembra (dds).

Tratamiento		Altura (cm)		Área foliar (cm^2)		Masa seca aérea (g)		Diámetro del tallo (mm)	Masa seca raíz (g)	Índice de calidad Dickson	Índice de Robustez
		19 dds	28 dds	19 dds	28 dds	19 dds	28 dds	28 dds	28 dds	28 dds	28 dds
1.	TQ	7.4 c	10.6 a	10.2 cd	17.7 abc	0.06 abc	0.13 abc	2.2 b	0.03 ab	0.016 bc	4.95 a
2.	TN	8.0 bc	9.9 ab	10.8 bcd	15.6 cde	0.06 abc	0.11 bcd	2.0 b	0.02 c	0.012 c	4.96 a
3.	BSs	7.3 c	10.2 ab	10.1 d	15.7 bcde	0.05 bc	0.12 abcd	2.0 b	0.03 abc	0.015 bc	5.12 a
4.	BS1d	7.3 c	9.3 ab	9.2 d	14.3 de	0.05 c	0.10 cd	2.0 b	0.02 bc	0.014 bc	4.66 ab
5.	BS13d	7.7 bc	9.4 ab	13.6 d	18.7 abc	0.06 abc	0.14 abc	2.2 b	0.03 abc	0.016 bc	4.39 ab
6.	MAs	7.7 bc	8.6 b	9.9 d	13.2 e	0.05 abc	0.19 d	2.4 ab	0.02 bc	0.014 bc	3.70 b
7.	MA1d	8.6 b	9.6 ab	12.6 abc	16.5 abcde	0.06 abc	0.13 abc	2.2 b	0.03 abc	0.016 bc	4.45 ab
8.	MA13d	7.7 bc	9.5 ab	13.0 ab	17.5 abcd	0.06 abc	0.14 abc	2.2 b	0.03 ab	0.018 ab	4.38 ab
9.	THs	7.4 c	9.6 ab	9.7 d	15.3 cde	0.05 bc	0.13 abcd	2.0 b	0.03 ab	0.017 ab	4.79 ab
10.	TH1d	9.0 a	10.8 a	14.6 a	19.1 ab	0.08 a	0.14 ab	3.0 a	0.02 abc	0.018 ab	3.59 b
11.	TH13d	7.9 bc	10.8 a	13.2 ab	19.7 a	0.07 ab	0.16 a	3.0 a	0.03 a	0.021 a	3.61 b

Nota.:medias con letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).1. (TQ): Testigo químico, fertilizado con Polifeet 1 $g*mL^{-1}$ cada tercer día, 10 días después de la germinación, 2. (TN): Testigo no inoculado 3. (BSs): *Bacillus subtilis* inoculado en semilla. 4. (BS1dds): *B. subtilis* inoculado en semilla y refuerzo el primer día después de siembra (dds.). 5. (BS13dds): *B. subtilis:* inoculado en semilla y refuerzo 13 días después de siembra (dds.). 6. (MAs): Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) inoculado en semilla. 7. (MA1dds): HMA inoculado en semilla y refuerzo 1 dds. 8. (MA13dds): HMA: Micorrizas inoculado en semilla y refuerzo 13 dds. 9. (THs): *Trichoderma harzianum* inoculado en semilla. 10. (TH1dds): *T. harzianum:* inoculado en semilla y refuerzo 1 dds. 11. (TH13dds): *T. harzianum* inoculado en semilla y refuerzo 13 dds.

En cuanto a la colonización micorrízica, el mayor porcentaje se obtuvo cuando se inocularon las micorrizas en semilla y una segunda aplicación en el sustrato a los 13 dds con 57.5 %, seguido de la inoculación a la semilla y aplicación al sustrato el 1er día después de la siembra (54,0 %) y solo a las semillas (44.5 %). El testigo manifestó 18% de colonización micorrízica posiblemente debido a contaminación o presencia en el sustrato de esporas de micorrizas.

2.4.2 Evaluación de aplicación de tratamientos de consorcios de MPCV

La respuesta de la inoculación de *B. subtilis*, *T. harzianum* o Micorrizas arbusculares a la semilla de tomate híbrido Pony express, en forma individual o en consorcios, indicó que en general los inoculantes microbianos no propiciaron un incremento en el porcentaje de emergencia final de las plántulas de tomate (Cuadro 2), en relación a los tratamientos control (con fertilización y sin inoculo). Pero los tratamientos inoculados individualmente y en consorcios redujeron el tiempo de emergencia de las plántulas, en relación a los controles, sin embargo al calcular la tasa de emergencia, no se presentaron diferencias estadísticas.

Cuadro 2. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el porcentaje de emergencia de plántulas de tomate.

Tratamiento	Emergencia de plántulas (%)						
	3 dds	4 dds	5 dds	6 dds	7 dds	9 dds	12 dds
1. TQ	20.0 c	45.5 b	81.8 a	81.8 b	96.4 a	98.2 a	98.5 a
2. TN	40.0 bc	83.6 a	92.7 a	94.5 ab	96.4 a	96.4 a	96.4 a
3. BS	67.3 ab	87.3 a	89.1 a	92.7 ab	92.7 a	92.7 a	96.4 a
4. MA	67.3 ab	89.1 a	92.7 a	92.7 ab	92.7 a	92.7 a	98.2 a
5. TH	56.4 ab	89.1 a	92.7 a	92.7 ab	94.5 a	96.4 a	98.2 a
6. BS+MA	81.8 a	94.5 a	96.4 a	96.4 ab	96.4 a	96.4 a	98.2 a
7. BS+TH	74.5 a	92.7 a	96.4 a	98.2 a	98.2 a	98.2 a	98.2 a
8. TH+MA	70.9 a	92.7 a	94.5 a	94.5 ab	94.5 a	94.5 a	100.0 a
9. BS+MA+TH	72.7 a	92.7 a	96.4 a	96.4 ab	96.4 a	100.0 a	100.0 a

Nota: medias con letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En el primer muestreo (19 dds), el análisis estadístico indicó que el tratamiento control con fertilización registró la mayor altura en relación a los tratamientos con los inoculantes microbianos y el control sin inoculo ni fertilización (Fig. 1). Pero a los 24 y 29 dds el consorcio de *B. subtilis* + *T. harzianum* + Micorriza alcanzó la misma altura que el control con fertilización y a los 34 dds el consorcio, superó en altura a todos los tratamientos y controles. Respecto al diámetro de tallo no tuvo

un comportamiento consistente ya que fue muy variable entre las fechas de muestreo y a los 34 dds todos registraron valores similares (Fig. 2).

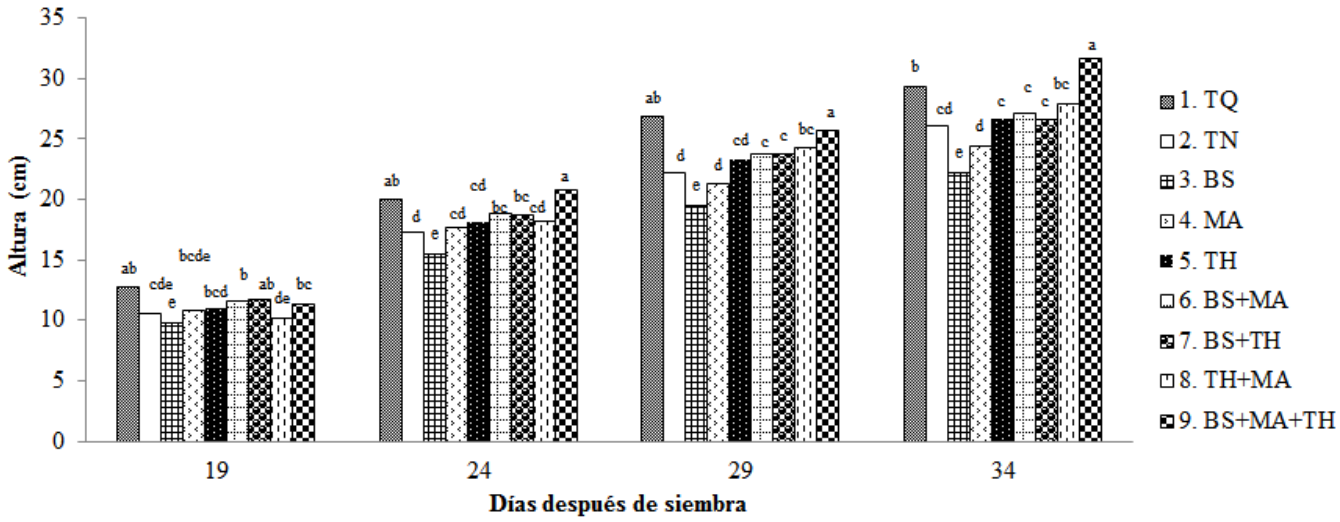

Figura 1. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en la altura de plántulas de tomate. Nota: barras con letras diferentes en el mismo día después de la siembra, representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

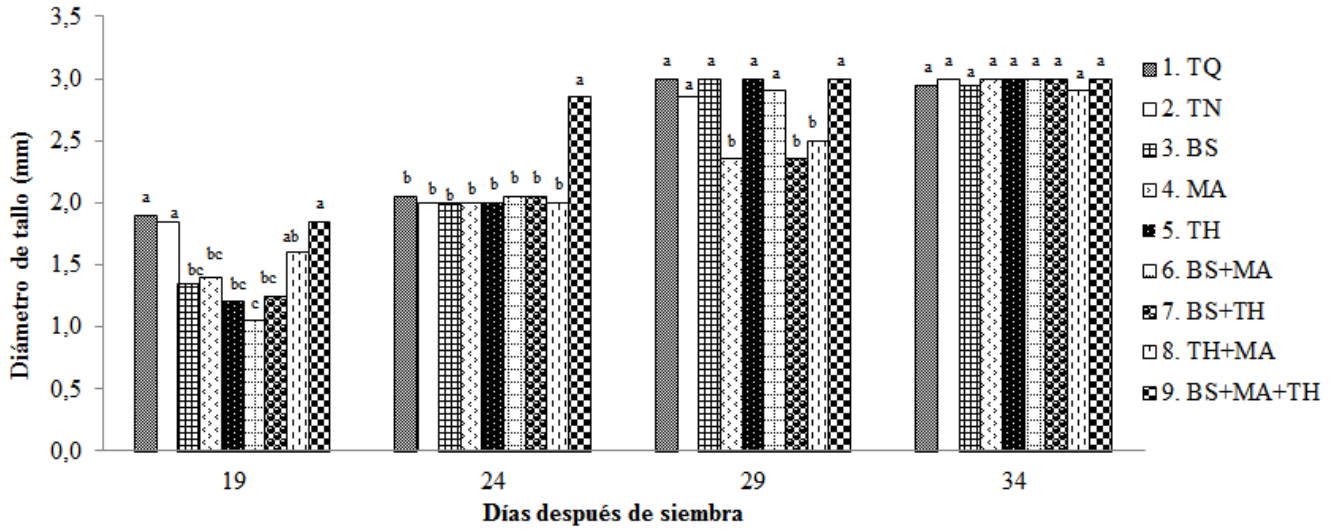

Figura 2. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el diámetro de tallo de plántulas de tomate. Nota: barras con letras diferentes en el mismo día después de la siembra, representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, P ≤ 0.05).

A los 24 dds el consorcio manifestó la mayor robustez de plántula (menor índice de robustez) (fig. 3), sin embargo con el paso de los días, aumentó el índice, es decir disminuyó la robustez de las plántulas del tratamiento del consorcio. En cuanto al número de hojas no hubo diferencias estadísticas

significativas, hasta los 34 dds se aprecia que el control con fertilización manifestó el mayor número de hojas seguido del consorcio (Fig. 4).

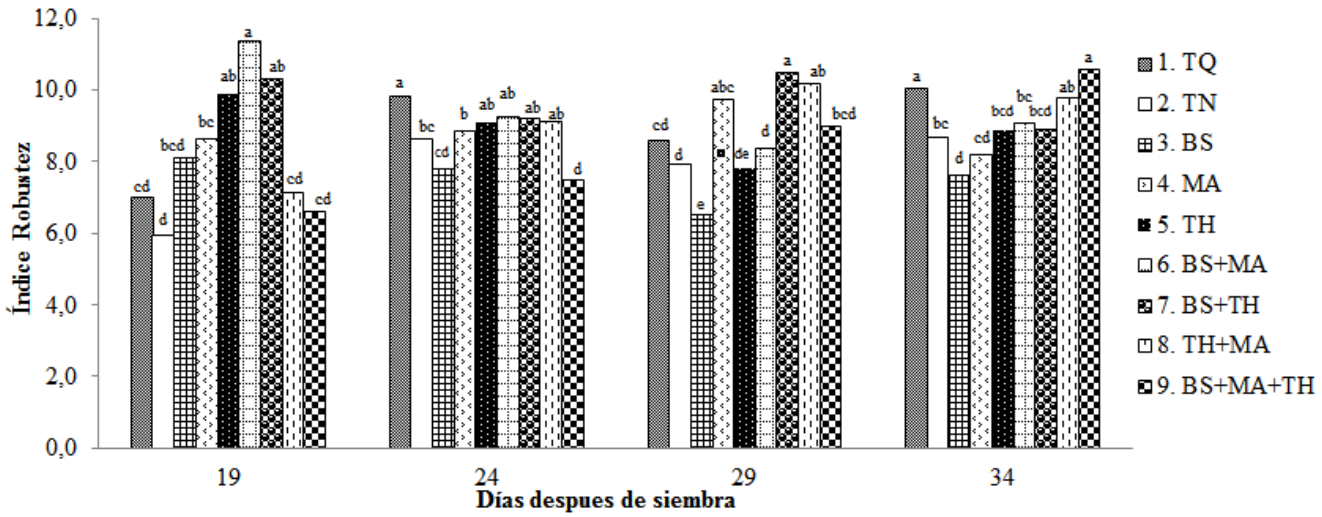

Figura 3. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el índice de robustez de plántulas de tomate. Nota: barras con letras diferentes en el mismo día después de la siembra, representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

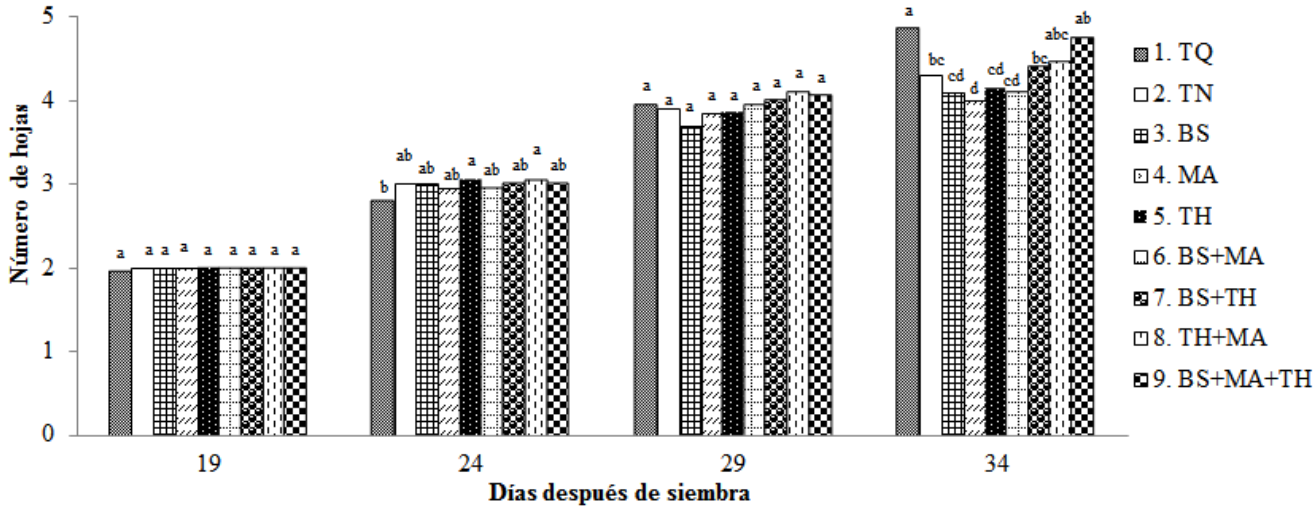

Figura 4. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal individualmente y en consorcios en el número de hojas de plántulas de tomate. Nota: barras con letras diferentes en el mismo día después de la siembra, representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

A los 45 dds el análisis estadístico de las variables de crecimiento (altura, número de hojas, diámetro de tallo, área foliar, masa seca área (MSA), masa seca de raíz (MSR) y masa seca total (Cuadro 3), indicó que el tratamiento con el consorcio de los tres inoculantes microbianos fue el que

obtuvo valores similares a los obtenidos por el control con fertilización, incluso registrando la mayor altura (33.3 cm), pero menor área foliar (64.9 cm^2) y masa seca raíz (0.043g).

En cuanto a los índices de calidad de Dickson y Robustez (Cuadro 3), el tratamiento del consorcio de inoculantes microbianos fue el que manifestó valores cercanos o similares (0.023 y 12.29) al control con fertilización (0.028 y 11.67) a los 45 dds, lo cual indica que las plántulas son robustas y de calidad.

De los tratamientos con la combinación de los inoculantes microbianos (Cuadro 3), *Bacillus subtilis* + Micorrizas, *Bacillus subtilis* + *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma harzianum* + Micorrizas, a la semilla de tomate y a los 13 dds una aplicación al sustrato de las plántulas, el tratamiento con *T. harzianum* + Micorrizas y *B. subtilis* + Micorrizas superaron al control sin inoculo en todas variables de crecimiento (altura, diámetro de tallo, área foliar, MSA, MSR y masa seca total) e índice de Dickson. Sin embargo ambas combinaciones generaron valores inferiores a los obtenidos por el control con fertilización y el consorcio de los tres inoculantes microbianos.

Con respecto a los tratamientos con la inoculación individual de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* o Micorrizas a la semilla de tomate y a los 13 dds una aplicación al sustrato de las plántulas (Cuadro 3), solo el tratamiento con *Trichoderma harzianum* superó al control sin inoculo en las variables de crecimiento (diámetro de tallo, área foliar, MSA, masa seca total) e índice de Dickson.

Estos resultados indicaron que *Trichoderma harzianum* aplicado de manera individual, en consorcio con Micorrizas o en consorcio con *Bacillus subtilis* y Micorrizas, a la semilla de tomate y a los 13 dds al sustrato de la plántula, tiene un efecto promotor del crecimiento vegetal que se incrementó conforme se asoció a otro inoculante microbiano, lo que permitió obtener valores de crecimiento e índices de calidad superiores o similares a los del control con fertilización. Estos resultados sugieren que su empleo en la producción de plántulas de tomate permite reducir el uso de fertilizantes químicos.

En relación a la colonización micorrízica, el tratamiento con la inoculación individual de Micorrizas registro el más alto porcentaje con 69.67%, seguido de su interacción con: *B. subtilis* (63.67 %); *B. subtilis* + *T. harzianum* (63.0 %) y *T. harzianum* (61.67 %), porcentajes superiores a los obtenidos en el primer ensayo evaluado a (28 dds), debido al tiempo de desarrollo de la plántula que tuvo una diferencia de 17 días con respecto al segundo ensayo (45 dds).

Cuadro 3. Efecto de la inoculación con microorganismos promotores de crecimiento vegetal, individualmente y en consorcios en parámetros de calidad de plántulas de tomate a los 45 días después de siembra.

Tratamiento	Altura (cm)		Diámetro tallo (mm)		Área foliar (cm^2)		MSA (g)		MSR (g)		Masa seca total (g)		Índice calidad Dickson		Índice Robustez	
1. TQ	32.0	**ab**	2.9	**a**	71.8	**a**	0.504	**a**	0.059	**a**	0.563	**a**	0.028	**a**	11.67	**ab**
2. TN	28.1	**de**	2.1	**b**	48.2	**de**	0.355	**c**	0.037	**bc**	0.392	**d**	0.019	**bcd**	13.39	**ab**
3. BS	23.5	**f**	2.1	**b**	38.3	**f**	0.285	**d**	0.029	**c**	0.314	**e**	0.015	**d**	11.22	**b**
4. MA	26.9	**e**	2.4	**b**	45.9	**e**	0.347	**cd**	0.036	**bc**	0.383	**de**	0.018	**cd**	11.47	**ab**
5. TH	28.1	**de**	2.5	**ab**	51.6	**cde**	0.385	**bc**	0.036	**bc**	0.420	**cd**	0.019	**bcd**	11.72	**ab**
6. BS+MA	30.2	**bc**	2.3	**b**	54.4	**cd**	0.423	**b**	0.042	**b**	0.465	**bc**	0.020	**bc**	13.72	**a**
7. BS+TH	29.0	**cd**	2.3	**b**	50.2	**de**	0.398	**bc**	0.039	**b**	0.437	**cd**	0.019	**bcd**	12.64	**ab**
8. TH+MA	29.8	**cd**	2.4	**b**	58.1	**bc**	0.423	**b**	0.042	**b**	0.465	**bc**	0.021	**bc**	12.85	**ab**
9. BS+MA+TH	33.3	**a**	2.8	**a**	64.9	**b**	0.493	**a**	0.043	**b**	0.536	**ab**	0.023	**b**	12.29	**ab**

Nota: medias con letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). 1. (TQ): Testigo químico, fertilizado con Polifeet 1 $g*mL^{-1}$ cada tercer día, 10 días después de la germinación, 2. (TN): Testigo no inoculado 3. (BS): *Bacillus subtilis.* 4. (MA): Hongos Micorrízicos Arbusculares. 5. (TH): *Trichoderma harzianum.* 6. (BS+MA): *B. subtilis* + Hongos Micorrízicos Arbusculares. 7. (BS+TH): *B. subtilis* +*T. harzianum.* 8. (TH+MA): *T. harzianum* + Hongos Micorrízicos Arbusculares 9. (BS+MA+TH): *B. subtilis* + Hongos Micorrízicos Arbusculares +*T. harzianum*

El análisis estadístico del contenido nutrimental de las plántulas de tomate (Cuadro 4), señaló que el control con fertilización y control sin inoculo, registraron el mayor contenido de P, K, Ca, S, Mn, Zn y Fe en relación a todos los tratamientos de inoculantes microbianos que manifestaron valores muy inferiores. Los tratamientos inoculados no presentaron diferencias estadísticas entre ellos.

Cuadro 4. Contenido nutrimentales con base en materia seca, en plántulas de tomate a los 45 días después de la siembra, inoculadas con microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

Tratamiento	Porcentaje en masa (%)														
	P		K		Ca		S		Mn		Zn		Fe	
1. TQ	0.53	a	57.74	a	28.75	b	0.92	a	0.21	b	0.21	a	0.56	a
2. TN	0.46	a	51.83	b	34.93	a	0.6	ab	0.32	a	0.17	a	0.41	ab
3. BS	0.15	b	15.86	c	10.26	c	0.3	b	0.07	c	0.05	b	0.27	abc
4. MA	0.11	b	15.59	c	11.97	c	0.39	b	0.1	c	0.06	b	0.16	bc
5. TH	0.17	b	16.41	c	11.8	c	0.32	b	0.09	c	0.06	b	0.18	bc
6. BS+MA	0.01	b	16.62	c	11.98	c	0.14	b	0.09	c	0.06	b	0.14	bc
7. BS+TH	0.06	b	18.02	c	10.02	c	0.24	b	0.06	c	0.07	b	0.07	c
8. TH+MA	0.04	b	17.75	c	10.45	c	0.23	b	0.07	c	0.07	b	0.07	c
9. BS+MA+TH	0.17	b	15.43	c	11.3	c	0.22	b	0.09	c	0.06	b	0.11	bc

Nota: medias con letras diferentes en cada columna representan diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$). 1. (TQ): Testigo químico, fertilizado con Polifeet 1 $g*mL^{-1}$ cada tercer día, 10 días después de la germinación, 2. (TN): Testigo no inoculado 3. (BS): *Bacillus subtilis.* 4. (MA): Hongos Micorrízicos Arbusculares. 5. (TH): *Trichoderma harzianum.* 6. (BS+MA): *B. subtilis* + Hongos Micorrízicos Arbusculares. 7. (BS+TH): *B. subtilis* +*T. harzianum.* 8. (TH+MA): *T. harzianum* + Hongos Micorrízicos Arbusculares 9. (BS+MA+TH): *B. subtilis* + Hongos Micorrízicos Arbusculares +*T. harzianum*

Estos resultados sugieren que los inoculantes microbianos promueven el crecimiento de las plántulas de tomate, pero con un bajo contenido nutrimental al no disponer de una fuente de nutrientes, en el sustrato o a través de su aplicación de fertilización edáfica o foliar, que permita determinar la efectividad de la actividad solubilizadora de nutrientes de los inoculantes microbianos que faciliten su absorción.

2.4.3 Discusión de resultados

En este estudio, los inoculantes microbianos no tuvieron un efecto significativo sobre la emergencia de plántulas de tomate. Los resultados encontrados coinciden con estudios realizados en semillas de arroz (*Oryza sativa*) y lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas cepas del género *Bacillus* y semillas de girasol con *T. harzianum*, donde la inoculación no incrementó la germinación con relación al control (González y Fuentes, 2017). Sin embargo existen otros estudios que indican que la aplicación de inoculantes microbianos a la semilla favorece la germinación y emergencia de plántulas en cultivos como maracuyá (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener) donde al inocular cepas nativas de *T. harzianum* en semillas, estimuló la germinación y crecimiento de las plántulas (Cubillos *et al.*, 2009). En soya (*Glycine max*) la inoculación de *B. subtilis* en semilla y al suelo incremento la emergencia de plántula de 13 a 17%, altura de planta 9 a 18% y peso seco de raíz de 8.4 a 19% (Zhang *et al.*, 2009). Lo anterior evidencia que el efecto de los inoculantes en la emergencia, puede variar según el hospedero o la cepa estudiada.

La aplicación de inoculantes microbianos a la semilla y refuerzo a los 13 dds generó la mejor respuesta benéfica al registrar los mayores valores de crecimiento e índices de calidad, debido a que la aplicación de los inoculantes microbianos a los 13dds, favorece la colonización de las raíces de las plántulas, por parte de los microorganismos. Este resultado es similar al obtenido al inocular con *T. harzianum* en cultivo de frijol al trasplante y dos adicionales con intervalo de 15 días (González *et al.*, 2005); y en cultivo de tomate en semillero, a la siembra y con refuerzo a los 8 y 15 días después de la germinación (Moo *et al.*, 2017) al trasplante y 15 días después de trasplante (Jiménez *et al.*, 2011); en chile habanero (*Capsicum chinense*) al momento de la siembra y a los 15 y 30 días después de la germinación (Candelero *et al.*, 2015); y en tomate al momento de la siembra, a los ocho dds y 28 días después de la germinación al trasplante (Pinzón *et al.*, 2015).

La mayor capacidad de promoción del crecimiento de *T. harzianum* observada, comparado con otros microorganismos, se debe a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos, alta capacidad

de reproducción y colonización en distintos ambientes–(Cubillos *et al.,* 2009; Fernández y Suárez, 2009).

El consorcio de *T. harzianum* + *B. subtilis* + Micorrizas permitió registrar valores de crecimiento e índices de calidad similares o superiores al control con fertilización, este efecto promotor sinérgico pudo deberse a la acción del ácido indol acético (AIA) responsable de la elongación, respuestas a la luz y gravedad, división celular y diferenciación de tejidos (Vega *et al.,* 2016); y que es liberado por *B. subtilis* (Reetha *et al.,* 2014) y *T. harzianum* (Martínez *et al.,* 2014); y la capacidad de los HMA de crear condiciones favorables para una mayor absorción de nutrientes y crecimiento de microorganismos antagonistas en la rizosfera (Cano, 2011).

A los 24 dds el consorcio de los tres inoculantes microbianos presentó la mayor altura y menor índice de robustez, condición que propicia un plántula de mayor robustez y calidad, con resistencia a la desecación de la planta por el viento, supervivencia y crecimiento potencial en sitios secos (Rodríguez, 2008). Sin embargo con el paso de los días, disminuyó la robustez de las plántulas inoculadas con los consorcios, ya que tienen una mayor demanda nutricional las plantas a medida que crecen, lo que sugiere que después de los 24 dds, se requiere un aporte de fertilización química o usar un sustrato con mayor contenido de nutrientes para compensar su requerimiento nutricional y que ya sería el momento de trasplante.

La actividad de promoción de crecimiento de *B. subtillis* se debe a su capacidad de síntesis de AIA, producción de ácidos orgánicos, que forman complejos estables con Al y Fe, que reducen el pH en la rizosfera de la planta, condición que incrementa la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn, Mn y solubiliza el fósforo (Paredes y Espinosa, 2010); respuesta que ha sido demostrada en plántulas de tomate (*S. lycopersicum*), al incrementar la longitud radical, altura, producción de biomasa y adquisición de fósforo (Hariprasad *et al.,* 2009). En *T. harzianum* la promoción del crecimiento está asociada a la capacidad de descomposición de materia orgánica, de liberar nutrientes en formas disponibles para la planta, y a su actividad solubilizadora de fosfatos (Moreno *et al.,* 2007; Valencia *et al.,* 2007); capacidad observada en cultivos de chile habanero (*C. chinense*) y tomate (*S. lycopersicum*), donde incrementó la altura de planta, longitud en la raíz, volumen radical y de la biomasa seca total en comparación con plantas no inoculadas (Altomare *et al.,* 1999; Candelero *et al.,* 2015; Pinzón *et al.,* 2015). La aportación de los HMA al crecimiento de las plantas, es la de propiciar condiciones favorables para incrementar la superficie de absorción de agua y de nutrimentos, mejorar la absorción iónica y acumulación eficiente del fósforo y solubilización de minerales del suelo, que contribuyen a

incrementar la capacidad fotosintética y producción de biomasa de las plantas (Cano, 2011), como se obtuvo en cultivo de tomate donde la aplicación de *Rhizophagus intraradices* bajo condiciones de cultivo protegido, incrementó significativamente el contenido de clorofila, altura de planta, largo, diámetro y peso de fruto, además, aumentó el rendimiento de fruto por corte y el rendimiento acumulado en 30 % (Alvarado *et al.*, 2014).

La efectividad del consorcio de los tres inoculantes microbianos en este estudio, es similar al obtenido en frijol francés (*Phaseolus vulgaris*) al inocular con el hongo micorrízico arbuscular (HMA), *Funneliformis mosseae*, y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) *Paenibacillus polymyxa y Pantoea agglomerans* cuyos resultados sugieren que con el uso del consorcio es posible reducir entre un 25 a 50 % la fertilización química (Chauhan y Bagyaraj, 2015) en *Stevia rebaudiana* con PGPR y HMA (Vafadar *et al.*, 2014); y *Jatropha curcas* con *Brevibacillus brevis, B. licheniformis, Micrococcus* sp., y *Acinetobacter calcoaceticus*; donde los inoculantes incrementaron el crecimiento, contenido nutrimental, rendimiento y calidad de la planta en comparación con la respuesta individual de los microorganismos. Lo cual indica una interacción sinérgica entre microorganismos (Jha y Saraf, 2012).

Por otra parte el efecto sinérgico del consorcio de *B. subtilis* con HMA, es acorde a los resultados reportados en *S. tuberosum*. donde la asociación de bacterias del suelo y Hongos micorrízicos arbusculares (HMA), aumentó la solubilización de fósforo y producción de ácido indol acético, que mejoró su capacidad de adquirir nutrientes minerales y el crecimiento de las plantas (Bharadwaj *et al.*, 2008). En tomate la inoculación de *Glomus mosseae, G. mosseae + Pseudomonas flourescens y G. mosseae + Azospirillum brasilense* combinadas con el 50 % de la fertilización nitrogenada mejoro la calidad nutrimental de la plantas (Hernández y Chailloux, 2004). En tomate al inocular cepas nativas de *B. subtilis* en semillas y 50% de la fertilización química recomendada produjo un mejor crecimiento y calidad de plantas en comparación con las no tratadas y dosis completa de fertilización (Armenta *et al.*, 2009). En chile (*C. annuum*) la inoculación de HMA, *F. mosseae* y *B. sonorensis*, redujo en 50% la dosis de fertilizante NPK recomendada, sin efectos adversos en el crecimiento, rendimiento y nutrición, debido al efecto sinérgico de los microorganismos (Thilagar *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos con el consorcio de *T. harzianum* con HMA, son similares a los encontrados en pepino (*C. sativus*), la inoculación de *G. mosseae* y *T. harzianum* mostró una respuesta sinérgica en el crecimiento de las plantas (Chandanie *et al.*, 2009).

Finalmente, las plántulas inoculadas tuvieron una buena colonización micorrízica, siempre superior al 60%, que contribuyó al efecto promotor del crecimiento por su interacción con otros inoculantes microbianos. Estos resultados se consideran buenos, ya que son iguales o superiores a la colonización micorrízica (CM) reportada en otros estudios en tomate: 58% de CM con *R. intraradices* y *Claroideoglomus etunicatum* (Alvarado *et al.*, 2014), 40-47% de CM con *G. cubense* (Mujica y Fuentes, 2012) y confirman que el efecto promotor de crecimiento observado para los tratamientos fue causado por las micorrizas que colonizaron la raíz.

En este estudio el consorcio *T. harzianum* + *B. subtilis* + Micorrizas manifestó capacidad de promoción del crecimiento y sinergismo de su interacción, pero la falta de una fuente de abastecimiento de nutrimentos (fertilizantes inorgánicos, materia orgánica, etc.) al emplear sustratos comerciales con escasa cantidad de materia orgánica, generó un contenido nutrimental de las plántulas de tomate fueron muy bajos en comparación a lo registrado en las plántulas del control con fertilización. Lo cual sugiere que a pesar de las bondades del empleo de los microorganismos se requiere una aportación de nutrimentos para obtener plantas de calidad nutrimental.

Los resultados confirman que los microorganismos inoculados a la semilla y una segunda aplicación al sustrato a los 13 dds en plántulas de tomate, propician un efecto promotor de crecimiento, por acción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal, al desarrollarse en medios de escaso o nulo abastecimiento de nutrimentos. La aportación de nutrimentos en forma orgánica (compost, lombricompost, humus de lombriz) o inorgánica aportaría a la calidad de las plantas. Por tanto se requiere generar conocimientos sobre el empleo de consorcios abastecidos con una fuente de nutrimentos para la producción de plántulas.

2.5 CONCLUSIONES

- Al aplicar los inoculantes microbianos dos veces (en semilla y a los 13 dds) se vio el mayor efecto de promoción de crecimiento y calidad de plántulas de tomate hibrido Pony express.

- El consorcio *T. harzianum*, *B. subtilis* y Micorrizas tiene efecto sinérgico en la promoción del crecimiento y calidad de plántulas de tomate hibrido Pony express, con valores similares al tratamiento control con fertilización, pero con un deficiente contenido nutrimental. Estos resultados sugieren que su empleo en la producción de plántulas de tomate, permite reducir el uso de fertilizantes químicos**.**

"Solo unos pocos encuentran el camino, otros no lo reconocen cuando lo encuentran, otros ni siquiera quieren encontrarlo" (Lewis Carrol l, 1832 – 1898)

2.6 LITERATURA CITADA

Adesemoye, A. O., M. Obini, and E. O. Ugoji. 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. Brazilian Journal of Microbiology 39(3): 423-426.

Altomare, C., W. Norvell, T. Björkman y G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microb. 65(7): 2926-2933.

Alvarado C., M., A. Díaz F. y M. A. Peña. 2014. Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas 5(3): 513-518.

Armenta B., A. D., V. M., Airola G., y M. A. Apodaca S. 2009. Selección de aislados nativos de *Bacillus subtilis* para la producción de plántulas de tomate en Sinaloa. In: Primer Simposium Internacional de Agricultura Ecológica. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. pp. 252-256.

Bach A., T., y M., Díaz. 2008. Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. Revista Agricultura Orgánica 3: 35-36.

Bharadwaj, D.P., P.O. Lundquist, y S. Alströma. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungal spore-associated bacteria affect mycorrhizal colonization, plant growth and potato pathogens. Soil Biology & Biochemistry 40:2494-2501.

Birchler, T., R.W. Rowse, A. Royo y M. Pardos. 1998. La planta ideal: Revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. Investigación Agraria Sistemas de Recursos Forestales 7: (1-2):109-121.

Candelero D., J., A. J. Cristóbal A., A. Reyes R., J.M. Tun S., M. M. Gamboa A. y E. Ruíz S. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. Revista Internacional Botánica Experimental Phyyton 84: 113-119.

Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 14(2): 15-31.

Chandanie, W.A., M. Kubota, y M. Hyakumachi. 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth-promoting fungi and their significance for enhancing plant growth and suppressing damping-off of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Applied Soil Ecology. 41: 336-341.

Charles N. J. y N. J. Martin. A. 2015. Uso y manejo de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y humus de lombriz en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), bajo sistema protegido. Rev. Cultivos Tropicales 36(1): 55-64.

Chauhan, H., D.J. Bagyaraj, J. E. Ravi. 2015. Inoculation with effective microbial consortia can reduce half the fertilizer application for *Andrographis paniculata* (kalmegh) under field condition. Med. Plants: Int. J. Phytomed. Relat. Ind. 7 (2):103–108.

Chauhan, H. y D. J. Bagyaraj. 2015. Inoculation with selected microbial consortia not only enhances growth and yield of French bean but also reduces fertilizer application under field condition. Scientia Horticulturae 197: 441–446.

Camargo C., D. F., E. R. Ávila. 2013. Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). Ciencia y Agricultura 11(1): 91-100.

Cubillos H., J. Valero, y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener). Rev. Agronomía Colombiana 27(1): 81-86.

Donoso, E., G. A. Lobos y N. Rojas. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. Bosque 29(1): 52-57.

Fernández B., R. J. y C. L. Suárez M. 2009. Inhibición in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium Oxysporum* Schlecht f, sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var.

Flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Revista Facultad Nacional de Agronomía 62: 4743 - 4748.

González F., H. y N. Fuentes M. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Rev. Cienc. Agr. 34(1): 17 – 31.

González R., M., L. L. Castellanos G., M. Ramos F. y G. Pérez G. 2005. Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. Fitosanidad 9(1): 37-41.

Hariprasad, P., H. M. Navya, S. Chandra N. y S. R. Niranjana. 2009. Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. Biological Control 50(3): 307-316.

Hernández, M. I. y M. Chailloux. 2004. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. Rev. Cultivos Tropicales 25(2): 5-12.

Jha, C. K. y M. Saraf. 2012. Evaluation of multispecies plant-growth promoting consortia for the growth promotion of *Jatropha curcas* L. J. Plant Growth Regul. 31(4): 588-598.

Jiménez, C., N. Sanabria, G. Altuna y M. Alcano. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Rev. Fac. Agron. 28: 1-10.

Martínez M., A., M. M. Alguacil, J. A. Pascual y S. C. Van Wees. 2014. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth promoting activity on melon plants. Journal of Chemical Ecology 40(7): 804-815.

Mena V., H. G. y V. Olalde P. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Scientia Horticulturae 113(1): 103-106.

Mis M., M. D., J. Cristóbal A., J. M. Tun S., A. Reyes R. y F. A. Moo K. 2015. Identificación molecular de dos cepas de *Trichoderma* y su actividad in vitro antagónica contra *Fusarium* spp. Rev. Protección Veg. 30(1): 69.

Moreno S., N., L. Moreno R. y D. Uribe V. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. 38-45 pp.

Moo K., F. A., J. Cristóbal A., A. Reyes R., J. M. Tun Suárez y M. Gamboa A. 2016. Identificación molecular de aislados de *Trichoderma* spp. y su actividad promotora en *Solanum lycopersicum* L. Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.71:5-11.

Moo-Koh, F. A., J. C. Alejo, A. Reyes-Ramírez, J. M. Tun-Suárez, R. Sandoval-Luna, J. A. Ramírez-Pool. 2014. Actividad in vitro del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia 48:(8) 833-845.

Mujica P. Y., y A. Fuentes M. 2012. Efecto de la biofertilización con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo del tomate en condiciones de estrés abiótico. Rev. Cultivos Tropicales 33(4):40-46.

Paredes M., M. y D. Espinoza V. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoamericana 28: 61-70.

Peña Y., L. P., E. Ruiz S., J. E. Barboza C. y A. Reyes R. 2016. Isolation of Mexican *Bacillus* Species and Their Effects in Promoting Growth of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L. cv Jalapeño). Indian J. Microbiol. 56(3): 375-378.

Pinzón E., L. F.; J. Candelero C., J. M. Tun S.,V. Reyes O, V; J. Cristóbal A. 2015. Control de *Meloidogyne incognita* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la aplicación de *Trichoderma harzianum.* Fitosanidad 19(1): 5-11.

Reetha S., G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan y T. Ravi M. 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). International Journal of Current Microbiology an Applied Science 3(2): 568-574.

Reyes R., A., J. Cristóbal A., E. Ruiz S. y J. M. Tun S. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinense*) con hongos antagonistas. Fitosanidad 16(3): 161-165.

Rivera S., C. A., A. Reyes R., J. L. Cuervo A, y J. Cristóbal A. 2016. *Bacillus subtilis* en el control del "Damping-off" en plántulas de calabaza (*Cucurbita pepo* l.) variedad grey zucchini. Tesis de Maestría en Ciencias Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico de Conkal. 49 p.

Rodríguez T., D. A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal. Universidad Autónoma de Chapingo. Mundi Prensa México. 156 p.

Rodríguez Y., Y., L. Arias P., A. Medina C., Y. Mujica P., L. R. Medina G., K. Fernández S. y A. Mena E. 2015. Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrízica. Cultivos Tropicales 36(2): 18-21.

Rojas, F. 2002. Metodología para la evaluación de la calidad de plántulas de ciprés (*Cupressus lusitanica* Mill.) en vivero. Revista Chapingo 8(1): 75-81.

Ruiz S., E., M. Á. Mejía B., J. Cristóbal A., A. Valencia B. y A. Reyes R. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 5(7): 1325-1332.

Selva K., S., M. R. Krishna R., R. Deepak K., S. Panwar y C.S. Prasad. 2013. Biocontrol by plant growth promoting rhizobacteria against black scurf and stem canker disease of potato caused by *Rhizoctonia solani*. Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection 46(4): 487-502.

Thilagar, G., D.J. Bagyaraj y M.S. Rao. 2016. Selected microbial consortia developed for chilly reduces application of chemical fertilizers by 50% under field conditions. Sci. Hort. 198: 27-35.

Vafadar, F., R. Amooaghaie y M. Otroshy. 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. J. Plant Interact. 9(1): 128–136.

Valencia, H., J. Sánchez, D. Vera, N. Valero y M. Cepeda. 2007. Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. En: Sánchez, J. (ed.). Universidad Nacional de Colombia. 169-183 pp.

Vega C., P., H. Canchignia M., M. González y M. Seeger. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Revista Cultivos Tropicales. 37(1): 33-39.

Zhang, J.X., A.G. Xue, y J.T. Tambong. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum.* Plant Disease 93:1317-1323.