



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**Efectos de la inoculación con hongos micorrízicos (*Glomus intraradices*) y bacterias BPCV (*Pseudomonas fluorescens*) sobre el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en vivero y en cultivo bajo invernadero**

Tesis para optar al grado académico de  
Magister en Cultivos Intensivos

Autora: Ing. Agr. María Virginia Rizzardi

Director: Dr. Ing. Agr. Carlos Bouzo

Co-director: Dra. Biol. Alejandra Becerra

ESPERANZA, SANTA FE - ARGENTINA

Año: 2017

Dedicada a Luis, esposo y compañero de vida,  
por su apoyo incondicional en mi carrera de posgrado.

A mis amadas hijas, Lucía y Sofía.

A mi madre y mi padre que me enseñaron  
a seguir siempre adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor y director, Dr. Ing. Agr. Carlos Bouzo, por guiarme y brindarme su apoyo técnico en este proceso de aprendizaje.

A mi co-directora, Dra. Biol. Alejandra Becerra, por haber contado con su apoyo y orientación siempre que lo necesité.

A la dirección, equipo técnico y personal del vivero FITOTEC S.R.L.-San Juan, por permitirme realizar ensayos en sus instalaciones y facilitar todos los medios necesarios en apoyo a la investigación.

A la dirección de la EEA-San Juan del INTA, y personal del laboratorio de suelos por facilitar el instrumental y equipamiento necesario.

Al personal del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería - UNSJ, por facilitarme las instalaciones e instrumental de laboratorio.

A los productores Agustín López, Héctor Figueroa y familia, por brindar todo lo que tenían a su alcance para la realización de los ensayos en invernadero.

A los alumnos Alberto Herrera y Matías Gómez por su colaboración en las mediciones de los ensayos.

Al Dr. Claudio Valverde perteneciente al Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelo Departamento de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Quilmes.

Al personal del Laboratorio de Micología. IMBIV- UNC- CONICET.

Al Dr. Agustín Alesso y a la Lic. Mónica Ruíz por su orientación y apoyo en el análisis estadístico.

A Roly y familia de la finca Campo Seco, como así también a todo el personal de las fincas por su ayuda durante todo el ciclo productivo.

A mis amigas y amigos que siempre tuvieron una palabra de aliento.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
Resumen.....	1
Palabras Claves.....	2
Abstract.....	2
Key words.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Planteo del Problema y Justificación del Proyecto.....	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. General.....	5
1.2.2. Específicos.....	6
1.2.3. Hipótesis.....	6
2. Antecedentes.....	7
2.1. Cultivo de tomate en San Juan.....	7
2.1.1. Características generales del cultivo de tomate producido en invernadero en el Valle de Tulum.....	10
2.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento.....	11
2.2.1.- <i>Pseudomonas fluorescens</i> : generalidades y su papel en la rizósfera....	13
2.3. Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA).....	14
2.4. Interacción entre HMA y Rizobacterias en la rizósfera.....	17
3. Materiales y Métodos.....	21
3.1. Material vegetal e inoculantes.....	21
3.2. Métodos de inoculación.....	23
3.3. Conducción de los experimentos.....	24
3.3.1. Etapa de Experimento en Vivero.....	25
3.3.1.1. Tratamientos y Diseño experimental.....	26
3.3.1.2. Variables medidas.....	27
3.3.2. Experimentos en invernaderos.....	29

3.3.2.1. Localización de los invernaderos y técnicas agronómicas utilizadas.....	29
3.3.2.2. Tratamientos y Diseño experimental.....	33
3.3.2.3. Evaluación del crecimiento vegetativo.....	34
3.3.2.4. Evaluación de componentes del rendimiento.....	39
3.3.2.5. Evaluación de calidad de frutos.....	40
3.3.2.6. Determinación de la colonización bacteriana y de la micorrización.....	40
4. Resultados y Discusión.....	44
4.1. - Experimentos en vivero.....	44
4.1.1. - Área foliar de plántulas.....	44
4.1.2. - Peso seco de raíces y Peso seco de parte aérea de plántulas.....	46
4.2. – Experimentos en invernaderos.....	48
4.2.1.- Determinación de la colonización bacteriana y de la micorrización	48
4.2.1.1. - Colonización de la rizósfera por <i>Pseudomonas</i> ssp. y caracterización molecular de los desarrollos microbianos.....	48
4.2.1.2. Colonización del suelo y rizósfera por <i>Glomus intraradices</i> .....	50
4.2.2.- Evaluación del crecimiento vegetativo.....	53
4.2.3.- Evaluación de componentes del rendimiento.....	59
4.2.4.- Evaluación de calidad de frutos.....	61
5. Conclusiones.....	64
5.1. Consideraciones finales.....	64
6. Bibliografía.....	66
Anexos.....	78

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>TABLA 1.</b> Cantidad de unidades fertilizantes de N, P, K y Ca aportadas en cada bandeja de cultivo de plántulas.....	<b>26</b>
<b>TABLA 2.</b> Caracterización físico química del horizonte superficial de suelo utilizado para ensayo en experimento 1. ....	<b>31</b>
<b>TABLA 3.</b> Caracterización físico química del horizonte superficial de suelo utilizado para ensayo en experimento 2. ....	<b>31</b>
<b>TABLA 4:</b> Efecto de los tratamientos testigos (Test) e inoculados (Mico, Pf y Mico + Pf) sobre el peso de materia seca de partes aéreas (PA), raíces (PR), y la relación entre ambas (PA/PR) de plántulas. ....	<b>46</b>
<b>TABLA 5:</b> Resultados del recuento de colonias de <i>Pseudomonas</i> totales obtenidas en los dos invernaderos localizados en Pocito (San Juan) (Experimentos 1 y 2). ....	<b>48</b>
<b>TABLA 6:</b> Efecto de los tratamientos sobre el peso de masa seca de la parte aérea de las plantas al final del cultivo en los experimentos 1 y 2. ....	<b>55</b>
<b>TABLA 7:</b> Efecto de los tratamientos sobre la densidad de raíces de las plantas al final del cultivo en los experimentos 1 y 2. ....	<b>55</b>
<b>TABLA 8:</b> Concentración de N, P y K en tejido foliar expresado en porcentaje de masa seca, para los experimentos 1 y 2. ....	<b>56</b>
<b>TABLA 9:</b> Valores medios de los componentes del rendimiento medidos en las plantas de tomate en función de los tratamientos realizados para los experimentos 1 y 2. ....	<b>59</b>
<b>TABLA 10:</b> Efecto de los tratamientos en los experimentos 1 y 2 sobre la concentración de sólidos solubles totales (Brix) y diámetro ecuatorial de los frutos (cm). ....	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>FIGURA 1:</b> Distribución de cultivos hortícolas y florícolas producidos en invernaderos en San Juan, expresada como proporción (%) de la superficie cubierta. ....	7
<b>FIGURA 2:</b> Vista esquemática de las interacciones posibles entre los diferentes componentes de la micorrizósfera. ....	20
<b>FIGURA 3:</b> Observación microscópica en donde se aprecia una densidad de entre 30 a 100 esporas de <i>G. intraradices</i> obtenidas a partir de fragmentos radicales de 1 a 5 mm de longitud. ....	22
<b>FIGURA 4:</b> Inoculación de <i>G. intraradices</i> mediante el empleo del producto comercial Aegis Gránulo®. ....	23
<b>FIGURA 5:</b> Inoculación de <i>P. fluorescens</i> mediante el empleo del producto comercial Rizofos®. ....	24
<b>FIGURA 6:</b> Aspecto que presentaron las plántulas de tomate a los 69 días posterior a la siembra, y disposición al azar de las bandejas. ....	27
<b>FIGURA 7:</b> Procedimiento de estimación del área foliar de las plantas mediante la medición individual con calibre manual, de la longitud y ancho de cada hoja. ....	28
<b>FIGURA 8:</b> Ubicación del Invernadero en que se realizó el experimento 1. ....	29
<b>FIGURA 9:</b> Ubicación del Invernadero en que se realizó el experimento 2. ....	30
<b>FIGURA 10:</b> a- Aspecto que presentaban las plantas de tomate luego del trasplante con una edad de 70 días. b- Aspecto que presentaban las plantas en el experimento 30 días después del trasplante. ....	32
<b>FIGURA 11:</b> Estado de los frutos al momento de cosecha. La cosecha se realizó cortando sólo aquellos frutos del racimo que alcanzaban el estado “rosado”, dejando los que todavía no alcanzaban el color indicado para ser recolectados en la siguiente “pasada”. ....	33
<b>FIGURA 12:</b> Cada unidad experimental estuvo constituida por 9 plantas (1,89 m <sup>2</sup> ), cada tratamiento estuvo debidamente identificado. ....	34
<b>FIGURA 13:</b> Medición del largo de la hoja, desde la base del pecíolo hasta el extremo del folíolo central. ....	35

<b>FIGURA 14:</b> Excavación lateral en cada planta y colocación de una malla metálica de cuadrícula con dimensiones de 5 cm de lado utilizada para efectuar el conteo de raíces según el método propuesto por Böhm (1979). .....	<b>37</b>
<b>FIGURA 15:</b> Exposición de las raíces luego de removido 1 cm de espesor de suelo, lo que permitió su conteo a las profundidades establecidas. ....	<b>38</b>
<b>FIGURA 16:</b> Los frutos se pesaron utilizando una balanza electrónica marca Systel modelo Eclipse BE 80-1998, capacidad de 0,1 kg a 15,0 kg. ....	<b>39</b>
<b>FIGURA 17:</b> Preparación de las raíces para ser teñidas con azul de anilina, para su posterior observación microscópica. ....	<b>43</b>
<b>FIGURA 18:</b> Preparados para observación microscópica y análisis de micorrización. ....	<b>44</b>
<b>FIGURA 19:</b> Efecto de tratamientos testigo (Test) e inoculados con <i>Glomus intraradices</i> (Mico), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf) y combinación de ambos (Mico + Pf) sobre área foliar (AF) en cm <sup>2</sup> de las plántulas de tomate. ....	<b>45</b>
<b>FIGURA 20:</b> Visualización de las bandas de ADN en ultravioleta obtenidos de cepas nativas de <i>P. fluorescens</i> (1 a 17) con el inóculo comercial utilizado (R) analizados por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) aplicando el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). ....	<b>49</b>
<b>FIGURA 21:</b> Distintas estructuras micorrícicas tomadas a partir de los preparados microscópicos: a) hifas externas e internas, b) vesículas, c) punto de entrada, d) arbusculos, e) rulo. ....	<b>51</b>
<b>FIGURA 22:</b> Colonización micorrícica arbuscular (%) en los tratamientos realizados en invernaderos mediante los experimentos 1 y 2. ....	<b>52</b>
<b>FIGURA 23:</b> Evolución del AF de las plantas de tomate a lo largo del ciclo del cultivo en el experimento 1. ....	<b>54</b>
<b>FIGURA 24:</b> Evolución del AF de las plantas de tomate a lo largo del ciclo del cultivo en el experimento 2. ....	<b>54</b>



## RESUMEN

La producción agrícola desde un enfoque que integra la visión ecológica, se propone como objetivos principales, mejorar la calidad de los alimentos, aumentar la productividad de los cultivos de manera sostenible y cuidadosa del medio ambiente. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la inoculación de Micorrizas Arbusculares (MA), *Glomus intraradices* y una Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (RPCV), *Pseudomonas fluorescens* en plántulas de tomate, sobre el desarrollo de raíces y brotes de los plantines y en el crecimiento de las plantas, rendimiento y calidad de frutos del cultivo de tomate en invernadero, en las condiciones de trabajo comúnmente desarrolladas por los productores del Valle de Tulum, provincia de San Juan.

Para ello, se establecieron dos experimentos en invernaderos independientes, con cuatro tratamientos (control, plantas inoculadas con *G. intraradices*, plantas inoculadas con *P. fluorescens* y plantas coinoculadas con ambos microorganismos) y tres repeticiones por tratamiento. El sustrato en el que crecieron las plántulas de tomate fue inoculado con MA mediante la aplicación de un granulado comercial (esporas de *G. intraradices*), y con las RPCV mediante la aspersion de una suspensión de formulado comercial, con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{cm}^{-3}$  de *Pseudomonas fluorescens*. La etapa de vivero se desarrolló durante 70 días, al finalizar se analizaron las variables área foliar, peso seco de raíces y de parte aérea de las plántulas, comprobando que las que fueron inoculadas conjuntamente con *G. intraradices* y *P. fluorescens* tuvieron un mayor desarrollo radical y aéreo. El cultivo comercial bajo cubierta se inició con el trasplante de las plántulas ya inoculadas y se evaluaron las variables: área foliar, peso seco de la parte aérea, densidad de raíces, concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejido foliar, racimos-planta<sup>-1</sup>, frutos-planta<sup>-1</sup>, peso de frutos-planta<sup>-1</sup>, diámetro ecuatorial y sólidos solubles totales de los frutos. Los resultados obtenidos no permitieron confirmar la existencia de diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas.

Se constató colonización micorrícica tanto en las plantas inoculadas como en el tratamiento control, la misma osciló entre el 32 y 41 %, revelando la presencia de MA nativas. El recuento de colonias del género *Pseudomonas spp.* en la rizósfera de las plantas fue similar entre todos los tratamientos (en el orden  $10^6$ - $10^7$  UFC/g), incluso el control sin inocular. Sin embargo el análisis molecular comparativo de las colonias obtenidas mostró que ninguna poseía un patrón genético similar al de la cepa del inóculo utilizado, manifestando la existencia de cepas indígenas.

Considerando los antecedentes en este tema y los resultados obtenidos aquí, se abren nuevas líneas para profundizar la investigación sobre métodos alternativos de inoculación tanto de las MA como de las rizobacterias, así como ajustar diferentes momentos, dosis y técnicas de acuerdo con la

especie vegetal y la cultivar utilizada. Asimismo resulta de interés investigar la adaptación y el desarrollo en el medio cuando se trate de introducir cepas comerciales, como así también trabajar en la obtención y multiplicación tanto de MA como rizobacterias nativas de la zona, a partir de la rizósfera de tomate como fuente de inóculo, que pueden presentar un alto potencial de colonización.

## **PALABRAS CLAVES**

Tomate en invernadero, desarrollo de plántulas, rendimiento, calidad de fruto, *Glomus intraradices*, *Pseudomonas fluorescens*, co-inoculación.

## **ABSTRACT**

The agricultural production that integrates the ecological vision, proposes as main objectives, improve food quality, and plant productivity, in a sustainable and careful way of the environment. The aim of the present study was to evaluate the effects of inoculation of arbuscular mycorrhiza (AM), *Glomus intraradices* and a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), *Pseudomonas flurescens* in tomato seedlings, on root and bud seedling development and on plant growth, yield and fruit quality of tomato under greenhouse, in the work's conditions commonly developed by producers in Tulum Valley, San Juan province.

For this, two experiments were established in different greenhouses, with four treatments (control, plants inoculated with *G. intraradices*, plants inoculated with *P. fluorescens* and plants co-inoculated with both microorganisms) and three replications per treatment. The substrate used to grow tomato seedlings was inoculated with AM through the application of a commercial granulated (spores of *G. intraradices*), and with the PGPR by spraying a suspension of commercial formulation with a concentration  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{cm}^{-3}$  of *Pseudomonas fluorescens*. The nursery stage was developed for 70 days, at the end variables leaf area, dry weight of roots and aerial part of the seedlings were analysed, verifying that those that were inoculated together with *G. intraradices* and *P. fluorescens* had a greater radical and aerial development. The commercial culture under cover began with the transplanting of the inoculated seedlings and the evaluated variables were: leaf area, plant dry weight, root density, concentration of nitrogen, phosphorus and potassium at foliar tissue, bunches-plant<sup>-1</sup>, fruits-plant<sup>-1</sup>, fruits weight-plant<sup>-1</sup>, fruit equatorial diameter and total soluble solids of fruit. The results did not confirm the existence of significant differences for any of the variables analysed.

Mycorrhizal colonization was observed both in the inoculated plants and in the control treatment and, it varied between 32 and 41%, revealing the presence of native AM. The colony count of *Pseudomonas spp.* in the rhizosphere of plants was similar among all treatments (in the order  $10^6$ - $10^7$  cfu/g), even in the non-inoculated control treatment. However, comparative molecular analysis of the colonies showed that none had a genetic pattern similar to that of the inoculated strain, demonstrating the existence of indigenous strains.

Considering the background on this issue and the results here obtained, new lines are opened to deepen the research on alternative methods of inoculation of both AM and rhizobacteria, as well as adjusting different moments, doses and techniques according to the plant species and the cultivar used. It is also interesting to investigate the adaptation and development in the media when it comes to introduce commercial strains, as well as work in obtaining and reproducing both, AM and rhizobacterias natives of the area, from the rhizosphere of tomato as a source of inoculum, which may have a high potential for colonization.

#### **KEY WORDS**

Greenhouse tomato, seedlings development, yield, fruit quality, *Glomus intraradices*, *Pseudomonas fluorescens*, co-inoculation.

## 1. Introducción

### 1.1. Planteo del problema y Justificación del Proyecto

La producción agrícola desde un enfoque que integra la visión ecológica, se propone como objetivos principales, mejorar la calidad de los alimentos, aumentar la productividad de los cultivos de manera sostenible y cuidadosa del medio ambiente. Barea *et al.*, (2005) plantean que para lograr estos objetivos, es necesario realizar estudios básicos y estratégicos que permitan mejorar la comprensión de las interacciones microbianas en la rizósfera, considerando a la agrobiotecnología como una herramienta para aplicar con éxito.

En muchos programas de investigación que se llevan a cabo en todo el mundo se utilizan a los hongos micorrícicos para mejorar el rendimiento de las plantas tanto en la agricultura como en la silvicultura. Además, se ha estudiado la interacción de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, y la interacción hongos micorrícicos arbusculares (HMA)-rizobacterias, con el fin de incorporarlos en las prácticas habituales de producción. Tanto para micorrizas como para rizobacterias, se han desarrollado algunas aplicaciones comerciales (Frey Klett *et al.*, 2007). Aunque dependiendo de la planta y del contexto agrícola, todos ellos implican la inoculación del suelo o sustrato con esporas o micelio de los hongos y formulados con unidades formadoras de colonias de rizobacterias, seleccionados por su eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas (Smith y Read, 2008).

Este es el caso del HMA *Glomus intraradices* y de la rizobacteria del grupo *Pseudomonas fluorescens*, que se encuentran actualmente disponibles como formulaciones comerciales en el mercado en Argentina. Si bien estos microorganismos han sido ampliamente utilizados en cultivos como maíz, trigo y árboles forestales (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Vestberg *et al.*, 2002), aún falta información de su empleo en cultivos hortícolas como el tomate. En particular, se desconocen los efectos sobre el crecimiento y el rendimiento de plantas de tomate, en inoculaciones individuales o combinadas.

Además de las interacciones entre los microorganismos y las raíces de las plantas, y de los diferentes microorganismos entre sí en el desarrollo y establecimiento de estas interrelaciones, se deben considerar también otros factores tales como, el tipo de suelo, la especie de la planta, su estado nutricional, edad, estrés, enfermedad, e incluso otros factores ambientales, que afectan estas interrelaciones entre las comunidades microbianas y las plantas (Yang y Crowley, 2000). En general, la mayoría de los experimentos se llevan a cabo utilizando plantas cultivadas en macetas, y si bien revelan la diversidad funcional de estos microorganismos, sus enfoques experimentales no dejan de ser reduccionistas. Por lo que se necesita diseñar experimentos que contribuyan a mejorar la comprensión de las interacciones entre los microorganismos y las plantas (Smith y Read, 2008).

El presente estudio tiene como objetivo determinar los efectos de la inoculación individual y combinada del hongo micorrícico *Glomus intraradices* y de la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en el crecimiento vegetal, el rendimiento y la calidad de frutos de plantas de tomate. En la etapa de vivero, se medirá el desarrollo radical y aéreo de las plántulas, en la etapa de cultivo en invernadero se evaluará el crecimiento vegetal, rendimiento y calidad de frutos. Para ello, se propone realizar los experimentos bajo las condiciones de trabajo en que comúnmente desarrollan sus cultivos los productores del Valle de Tulum de San Juan. La importancia de utilizar este sistema de producción representativo de la región, es que supera las limitaciones impuestas bajo condiciones controladas. De esta manera permitirá comprobar el comportamiento de *Glomus intraradices* y de *Pseudomonas fluorescens* en suelos con una historia agrícola previa.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. General**

Estudiar los efectos de la inoculación con microorganismos de hábito radical sobre el cultivo de tomate, en etapa de vivero y en cultivo comercial bajo invernadero.

### **1.2.2. Específicos**

- Evaluar los efectos de la inoculación de hongos micorrícicos (*Glomus intraradices*) en el desarrollo radical y aéreo de plántulas de tomate.
- Evaluar los efectos de la inoculación de hongos micorrícicos (*Glomus intraradices*) en plántulas de tomate, sobre el crecimiento vegetal, rendimiento y calidad de frutos del cultivo en condiciones de invernadero en la provincia de San Juan.
- Evaluar los efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), *Pseudomonas fluorescens*, sobre el desarrollo radical y aéreo de plántulas de tomate.
- Evaluar los efectos de la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV), *Pseudomonas fluorescens* en plántulas de tomate, sobre el crecimiento vegetal, rendimiento y calidad de frutos del cultivo en condiciones de invernadero en la provincia de San Juan.
- Evaluar los efectos de la co-inoculación de *Glomus intraradices* y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo de las plántulas de tomate y su cultivo en invernadero.

### **1.2.3. Hipótesis**

- La inoculación con *Glomus intraradices* produce un incremento en el desarrollo radical y aéreo de plántulas de tomate cv. Ichiban. .
- La inoculación de plantines de tomate cv Ichiban con *Glomus intraradices* produce un incremento en el crecimiento y en el rendimiento de las plantas cultivadas en invernadero y produce una mejora en la calidad de los frutos.
- La inoculación con *Pseudomonas fluorescens* produce un incremento en el desarrollo radical y aéreo de plántulas de tomate cv. Ichiban.

- La inoculación de plantines de tomate cv Ichiban con *Pseudomonas fluorescens* produce un incremento en el crecimiento y en el rendimiento de las plantas cultivadas en invernadero y produce una mejora en la calidad de los frutos.
- La co-inoculación con *Glomus intraradices* y *Pseudomonas fluorescens* produce un incremento en el desarrollo radical y aéreo de plántulas de tomate cv. Ichiban, y en el crecimiento, rendimiento y mejora en la calidad de los frutos de las plantas cultivadas en invernadero.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Cultivo de tomate en San Juan**

El tomate es una de las especies hortícolas más importantes entre las cultivadas para consumo en fresco. Su fruto es muy valorado tanto por su gran valor nutricional como así también por presentar sustancias antioxidantes como la vitamina E, provitamina A y vitamina C. Éstas pueden operar de forma conjunta con el licopeno y la quercetina, ampliando así su propiedad anticancerígena y antioxidante (Orna Chavez, 2009).

En Argentina el consumo anual de tomate es de 27 kg por habitante, creando un mercado de 1.134.000 Mg año<sup>-1</sup>. La tendencia marca una demanda creciente de este producto lo que impulsa también el aumento de la superficie con cultivo, la incorporación de tecnología en busca de mejorar los rendimientos y la calidad del mismo (Argerich *et al.*, 2011). Su cultivo puede desarrollarse todo el año en nuestro país, gracias a la gran diversidad de climas que encontramos en su vasto territorio, y a la tecnología de cultivo bajo cubierta (Corvo Dolcet, 2002, Bouzo *et al.*, 2003).

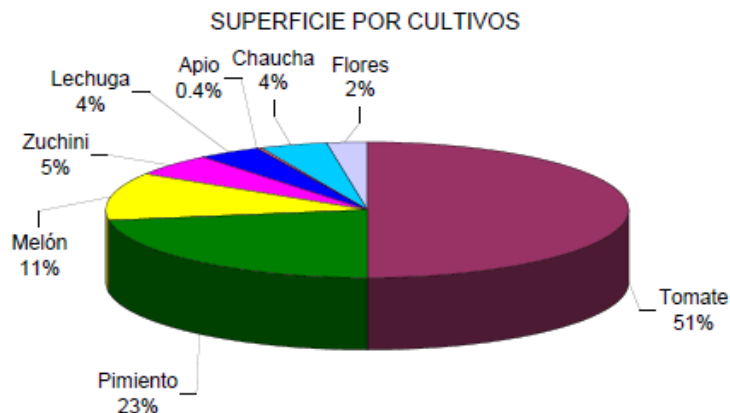
La superficie con cultivos bajo cubierta en Argentina ha registrado un marcado avance en los últimos años, según los relevamientos realizados por López Camelo en el año 2012, y por Lenscak en 2016. Estos autores registraron una superficie de 5.102 ha y 6.517 ha respectivamente, lo que revela un incremento del 27,73 % en 4 años. Estos cultivos se desarrollan en todas las provincias del país, aunque las principales zonas de producción son: el norte del gran Buenos Aires

(La Plata, Florencio Varela y Berazategui) y sudeste de la provincia de Buenos Aires (alrededores de la Ciudad de Mar del Plata) que abarcan 3.884 ha, la provincia de Corrientes que concentra 1.360 ha y Salta y Jujuy que cubren 788 ha, mientras el resto del país suma un total de 485 ha. De éstas, un 84 % se destina al cultivo de hortalizas, principalmente tomate y pimiento, y el 16 % restante a floricultura (Lenschak y Stavisky, 2016).

En la Provincia de San Juan, la construcción de los primeros invernaderos se registra en la segunda mitad de los años '90, lo que introdujo un importante cambio en la modalidad productiva que tuvo como principales consecuencias la modificación en la estacionalidad de la producción y en la tecnología aplicada en el sector, representada principalmente por las innovaciones en materia de plasticultura, fertirriego y nuevos cultivares (Benencia, 1994).

Esta nueva modalidad de cultivo trajo aparejado también un uso más eficiente del agua y los fertilizantes, como resultado de la adopción del riego por goteo y fertirriego. Así mismo provocó la adopción masiva de prácticas culturales como: inicio del cultivo por trasplante con plantines producidos por viveros especializados, introducción de nuevos materiales genéticos, mayor densidad de plantación, uso de mulching plástico, ampliación de la fecha de cultivo, conducción y poda de las plantas y modificación del ambiente en invernaderos (calefacción, ventilación, etc.). Además se introdujeron innovaciones en la presentación de los productos para su comercialización (Lozano Fernández, 2012).





**Figura 1:** Distribución de cultivos hortícolas y florícolas producidos en invernaderos en San Juan, expresada como proporción (%) de la superficie cubierta. (Rizzardi, 2010).

La superficie con cultivos bajo cubierta en la provincia de San Juan en el año 2010 alcanzaba 25 ha, de las cuales 22,75 ha estaban ocupadas por invernaderos y 2,25 ha con construcciones más sencillas denominadas localmente “Telas”, con cobertura de malla media sombra o antigranizo (Rizzardi, 2010). La superficie con cultivos protegidos se encuentra en constante expansión, alcanzando 40 ha en el año 2015 (datos propios). Los principales cultivos bajo cubierta según la superficie cultivada son, tomate con un 51 %, pimiento con 23 % y melón con el 11 % (Figura 1).

El principal destino de la producción son los mercados concentradores de San Juan y Mendoza, especialmente en lo que se refiere a tomate y pimiento, entrando a mercado durante la segunda quincena de octubre hasta fin de diciembre para las primicias, y en junio para las producciones tardías (Rizzardi, 2010).

### **2.1.1. Características generales del cultivo de tomate producido en invernadero en el Valle de Tulum**

Por experiencia de la autora de esta tesis, se realiza la presente descripción del manejo del cultivo de tomate en invernadero en el Valle de Tulum. El cultivo se inicia por trasplante, con plantines producidos en viveros especializados utilizando semillas de materiales genéticos seleccionados por sus características de alta productividad y tolerancia a diversos organismos patógenos. La época de plantación varía según el objetivo de producción, para lograr una cosecha “primicia” el trasplante se realiza a partir de los primeros días de julio con lo que se puede dar inicio a la cosecha durante la segunda quincena de octubre. Este planteo técnico requiere contar con calefacción para el óptimo desarrollo de la planta cuando las temperaturas externas sean inferiores a 10-12 °C (Francescangeli y Mitidieri, 2006). Los productores de la zona suelen encender los calefactores cuando las temperaturas externas bajan de 5°C. Otra práctica generalizada en el Valle de Tulum es el uso de túneles de polietileno o de manta térmica dentro del invernadero, en las primeras etapas del cultivo, como medida pasiva de aumento de la temperatura en el entorno cercano a la planta (Pucheta *et al.*, 2006).

La densidad de plantas en los cultivos de tomate bajo cubierta varía entre 30 mil a 47 mil plantas por hectárea (Rizzardi, 2010). Para la nutrición del cultivo una práctica común consiste en utilizar guano de gallina incorporado al suelo antes del trasplante, también se pueden utilizar productos de base orgánica como ácidos húmicos o fúlvicos u otros productos comerciales disponibles en el mercado. Es usual realizar un plan de fertilización ajustado a las distintas fases del cultivo, con el objetivo de lograr un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductivo. Con respecto a problemas patológicos del suelo, los productores en esta región no suelen implementar prácticas de esterilización de los mismos (Gabriel, 1997; Rizzardi, 2010).

Entre las principales plagas presentes se encuentran la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) que afecta folíolos y frutos disminuyendo tanto el rendimiento como la calidad de los mismos, y

mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) cuyos estadios jóvenes y adultos permanecen en colonias debajo de las hojas donde succionan la savia, provocando la presencia de puntos cloróticos, decaimiento de la planta, menor rendimiento y disminución del valor comercial de los frutos. Esta plaga también es vectora de algunos importantes virus (Francescangeli y Mitidieri, 2006). Los nematodos de mayor importancia son *Meloydogyne incógnita* y *M. hapla*, cuyo daño se puede minimizar utilizando cultivares con resistencia genética (Rizzardi, 2010).

Las principales enfermedades que pueden afectar el cultivo en invernadero son tizón temprano (*Alternaria solani*), hongos de suelo tales como *Fusarium oxysporium* f. sp. lycopersici, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia spp.*, peste negra causada por el virus TSWV (Tomato spotted wilt virus), peca bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. tomato), y mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria), que si bien no es una enfermedad que se manifiesta demasiado en el cultivo, es importante en la producción de plantines (etapa de vivero) (Francescangeli y Mitidieri, 2006; Gracia *et al.*, 1999).

La maleza perenne que afecta al cultivo, de real importancia por su invasión y agresividad es 'Juncia' (*Cyperus rotundus* L.) y su control debe realizarse antes del trasplante debido a que una invasión significativa de ésta, representa un riesgo de pérdidas económicas importantes (Rizzardi, 2010; D'Antoni *et al.*, 2012).

La utilización de mulching es una herramienta adecuada para el control de malezas anuales ya que el uso de herbicidas dentro del invernadero puede causar intoxicaciones al cultivo (Francescangeli y Mitidieri, 2006).

## **2.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento**

De los microorganismos del suelo, las bacterias son los más abundantes, formando poblaciones de más de  $10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo seco, considerando que muchas de ellas presentan la característica de producir estimulación radical,

reviste importancia el estudio de las relaciones que éstas establecen, especialmente con las plantas cultivadas. A las bacterias de la rizósfera que colonizan las raíces se les conoce como rizobacterias (Rojas Contreras, 2010).

Las rizobacterias que tienen un efecto benéfico directo o indirecto sobre las plantas, se han denominado bacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), muchas veces mencionadas con sus siglas en inglés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacterias) (Koeppler *et al.*, 1989; Vessey, 2003). Las RPCV deben cumplir ciertas características como ser capaces de colonizar la raíz, sobrevivir y multiplicarse en la rizósfera, competir con la microbiota natural y ejercer su actividad promotora del crecimiento (Koeppler *et al.*, 1989)

En años recientes, la utilización de RPCV en cultivos agronómicos ha causado cierta controversia, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como promotora del crecimiento vegetal, por lo que fueron propuestas cuatro características que definen este grupo (Jiménez *et al.*, 2001):

- No requieren de la invasión interna de tejidos en plantas, es decir, no incluyen al amplio grupo de micorrizas ni al de bacterias noduladoras.
- Deben tener una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación, es decir, deben competir en forma eficiente con los microorganismos nativos de suelo.
- Deben presentar capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz, lo cual tiene directa relación con las condiciones de humedad y temperatura del suelo.
- No deben producir daños en el hombre ni a otros microorganismos benéficos.

Dentro del grupo de las bacterias RPCV se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcalingenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Díaz Vargas *et al.*, 2001).

En relación al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las RPCV pueden actuar de manera directa o indirecta. Entre los mecanismos directos se mencionan la producción de fitohormonas, la inhibición de síntesis de etileno y el aumento de la permeabilidad de la raíz (Ramos, 1999). Como mecanismos indirectos la producción de sideróforos, el control biológico por antagonismo o competencia, la resistencia sistémica inducida (RSI) y la solubilización de fosfatos inorgánicos, entre otros (Kloepper *et al.*, 1991).

Algunas RPCV se han utilizado como biofertilizantes, los que se definen como una sustancia que contiene microorganismos vivos, tal que luego de aplicados a la semilla, la superficie de la planta o al suelo, colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento vegetal porque incrementan la disponibilidad y absorción de nutrientes, como también la sanidad de la planta hospedera (Vessey, 2003).

### **2.2.1.- *Pseudomonas fluorescens*: generalidades y su papel en la rizósfera**

El género *Pseudomonas*, corresponde a bacterias Gram negativas que pertenecen al dominio Bacteria, Filum Proteobacteria, clase Gamma Proteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonadaceae (Ncbi, 2014).

*Pseudomonas fluorescens* es de distribución ubicua, habitante de la filósfera, puede sobrevivir y multiplicarse en micro hábitats asociados a la rizósfera y el rizoplano, en su mayoría formando biofilms. El biofilm consiste en agrupaciones de bacterias de igual o diferentes géneros, recubiertas por exopolisacáridos, que les permite adherirse a la raíz o a las hifas de los hongos formando agregados (Ordoñez Castañeda, 2009). Esta rizobacteria tiene un metabolismo muy versátil, lo que le permite desarrollarse en la superficie de las raíces utilizando sustratos producidos por éstas, pero no establece una relación simbiótica con la planta. Puede desarrollarse en un rango de temperaturas muy amplio, de 5 a 42°C, aunque el óptimo se encuentra entre 25 y 30°C. Requiere preferentemente medios neutros, su crecimiento se inhibe en medios ácidos con pH inferior a 4,5.

Posee flagelos polares, que le permiten realizar movimientos activos en líquidos. (Martín Amor, 2011).

*Pseudomonas fluorescens* fue una de las primeras especies en ser estudiada por su capacidad promotora de crecimiento vegetal (Siddiqui *et al.*, 2001). Uno de sus mecanismos de acción directa es la liberación de ácido indol-acético (AIA), en la rizósfera, ejerciendo un efecto estimulador del crecimiento especialmente marcado cuando éstas están en estado de plántula (Lugtenberg y Kamilova, 2009). Estas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal estimulan el desarrollo del sistema radical y el crecimiento general de la planta huésped. Al mismo tiempo, el consecuente incremento en la producción de metabolitos vegetales, utilizados por las bacterias para su propio crecimiento, pondría de manifiesto un beneficio recíproco en la relación planta bacteria (Patten y Glick, 2002, citado por Sánchez López, 2011). *Pseudomonas fluorescens*, es capaz de solubilizar fósforo inorgánico (P), mediante la síntesis de ácidos orgánicos como el cítrico, butírico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, fumárico y 2-cetoglucónico, entre otros, que en el suelo logran la generación de microambientes ácidos en los cuales la disponibilidad de P es mayor (Rodríguez *et al.*, 2000; Agarás *et al.*, 2012).

### **2.3. Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA)**

El término micorriza, que literalmente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por Frank en 1885, para definir asociaciones simbióticas, mutualistas, no patógenas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados. (Honrubia, 2009).

Numerosos estudios paleobotánicos, morfoanatómicos y filogenéticos basados en técnicas moleculares evidencian que la coevolución mantenida entre hongos micorrícicos y raíces de plantas se remonta al Paleozoico, hace más de 400 millones de años, con el origen de las primeras plantas terrestres. (Honrubia, 2009).

Schüßler *et al.* (2001), como también Wang y Qiu (2006), confirman que más del 80 %, de las plantas son micorrícicas, estando además presentes entre los grupos vegetales más primitivos, como hepáticas, pteridófitos y las gimnospermas más antiguas.

Se reconocen distintos tipos de micorrizas (Honrubia *et al.*, 2002; Barea y Honrubia, 2004; Smith y Read, 2008), en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación y en función de su estrategia nutricional, que posibilita una penetración intracelular o no, por parte del hongo dentro de las células corticales de la raíz del vegetal. Las asociaciones micorrícicas pueden ser clasificadas en siete tipos diferentes, por ejemplo **ectomicorrizas**, **ectendomicorrizas** que incluyen **arbutoides** y **monotropoides**, y endomicorrizas que a su vez se subdividen en **arbusculares**, **ericoides** y **orquidoides** (Hodge, 2000).

Esta diversidad de interacciones, revelan las profundas interrelaciones existentes en los sistemas edáficos, el dinamismo y la capacidad adaptativa de plantas y hongos, la red nutricional que constituyen los micelios de los hongos formadores de micorrizas (HFM), y puede considerarse que son la base del funcionamiento de los ecosistemas (Honrubia *et al.*, 2002; Pérez-Moreno y Read, 2004).

Los HFM son miembros especializados entre la variada población microbiana que coloniza la rizósfera. Por su carácter heterótrofo, con pocas excepciones, son completamente dependientes del carbono orgánico provisto por la planta, por lo que son simbioses obligados (Smith y Read, 2008). El tipo más común y más antiguo de asociación es la **micorriza arbuscular** (MA). El principal aporte del hongo en esta simbiosis, es contribuir con la planta en la absorción de nutrientes minerales, particularmente fósforo. La fase extra-radical de las MA comprende metros de hifas del hongo que tienen un importante impacto en la estabilidad de los agregados del suelo. Además, los hongos MA reciben de la planta el 100 % del carbono que necesitan, lo que aumenta el flujo de carbono a las raíces estimado en un 20 % de los fotosintatos de las plantas, lo que se traduce en una gran cantidad de carbono en todo el mundo. Es así que la simbiosis de las MA juega un

significativo rol en el ciclo del carbono entre la atmósfera y la biósfera (Harrison, 2005). Según Hodge (2000) existe una capacidad selectiva por parte de las plantas con respecto a la MA según el mayor beneficio que le represente.

La colonización de los sistemas radicales por **hongos micorrícicos arbusculares (HMA)**, le confiere beneficios directos a la planta huésped en su crecimiento y desarrollo mediante el incremento de la absorción de nutrientes y el aumento en la tolerancia a condiciones de estrés y ante el ataque de patógenos que habitan en el suelo (Sharma *et al.*, 2004).

Los HMA, producen esporas asexuales y micelio constituido por hifas cenocíticas distribuido en el suelo o dentro de las raíces (Brundrett *et al.*, 1996). Además de actuar como vehículos de dispersión del germoplasma, las esporas son propágulos iniciadores de nuevos individuos cuando se separan del micelio que las originó o cuando la asociación se vuelve no funcional. Basadas en las características morfológicas de los HMA, se han descrito aproximadamente unas 200 especies. La identificación de las especies de HMA se realiza en base a las características morfológicas de las esporas o mediante el uso de herramientas moleculares (Becerra y Cabello, 2008).

Los HMA existen en el suelo como esporas, luego de su germinación se forma un tubo germinativo que crece a través del suelo en búsqueda de una raíz hospedera. Una vez establecido el contacto entre los simbioses, el hongo forma apresorios sobre la superficie de la raíz que penetran la misma. El hongo crece en el espacio intercelular a lo largo de la pared celular, ocasionalmente una hifa la atraviesa y puede formar un rulo (Harrison, 2005). Una vez dentro del espacio intracelular, el hongo forma estructuras ampliamente ramificadas denominadas “arbusculos”, sitios de intercambio de fosfatos entre ambos participantes de la simbiosis. Estas complejas estructuras se forman dentro de las células de la planta pero se mantienen separadas de su citoplasma. El intercambio de nutrientes entre los organismos, se produce a través de esta compleja interface intracelular (Schüßler *et al.*, 2001). En algunos casos, dependiendo del hongo simbiote y de las



condiciones del medio, también se forman “vesículas” que contienen lípidos y se piensa que son estructuras de almacenamiento de carbono (Hodges, 2000). Generalmente, la simbiosis MA se desarrolla con mayor facilidad bajo condiciones de bajos niveles o escasez de fósforo (Harrison, 2005).

Ha sido ampliamente documentado que los HMA colonizan activamente diversos cultivos y plantas ornamentales, entre los cultivos hortícolas podemos mencionar berenjena, pepino, arveja y tomate, en los que esta simbiosis produce un incremento en el crecimiento de las plantas y en los rendimientos (Tahat *et al.*, 2008; Omorusi y Ayanru, 2011). Además incrementan la biodiversidad en la rizósfera (van der Heijden *et al.*, 1998), contribuyen a reducir la incidencia de plagas como por ejemplo nemátodos y hongos patógenos (Azcon-Aguilar y Barea, 1996), y favorecen la adaptación de las plantas para crecer en ambientes contaminados (Hildebrandt, *et al.*, 1999). Por lo tanto, los HMA tienen una profunda influencia, directa o indirecta, en la vida sobre la tierra (Schüßler *et al.*, 2001).

#### **2.4. Interacción entre HMA y Rizobacterias en la rizósfera**

Como ya mencionamos, la rizósfera es la principal interface para las interacciones planta-microorganismos del suelo (Raaijmakers *et al.*, 2009). En términos generales, hay tres componentes reconocidos en la rizósfera, independientes y que a la vez interactúan entre sí. Se trata de la rizósfera (suelo), el rizoplano y la raíz misma. La **rizósfera** es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de sustratos que afectan la actividad microbiana. El **rizoplano** es la superficie de la raíz, incluyendo las partículas del suelo firmemente adheridas a ella. La raíz en sí misma es una parte del sistema, ya que ciertos microorganismos endófitos, son capaces de colonizar los tejidos de la raíz (Kennedy, 1998; Bowen y Rovira, 1999). La colonización microbiana de los tejidos, ya sea rizoplano o raíz, se conoce como colonización de la raíz, mientras que la colonización del volumen adyacente de suelo bajo la influencia de la raíz se conoce como colonización de la rizósfera (Kloepper *et al.*, 1991; Kloepper, 1994).

El suelo es probablemente uno de los ecosistemas más complejos debido al alto número y diversidad de organismos que lo habitan, que crean densas e interconectadas redes de interacciones. Sin embargo, los mecanismos y las consecuencias de estas interacciones son poco conocidas hasta ahora, en particular en el caso de los hongos ectomicorrízicos. A pesar de ello, a través de los múltiples estudios realizados hasta la actualidad, se ha podido establecer que la simbiosis micorrízica no puede considerarse como una simple interacción bipartita entre los hongos micorrízicos y las raíces (Deveau, 2007).

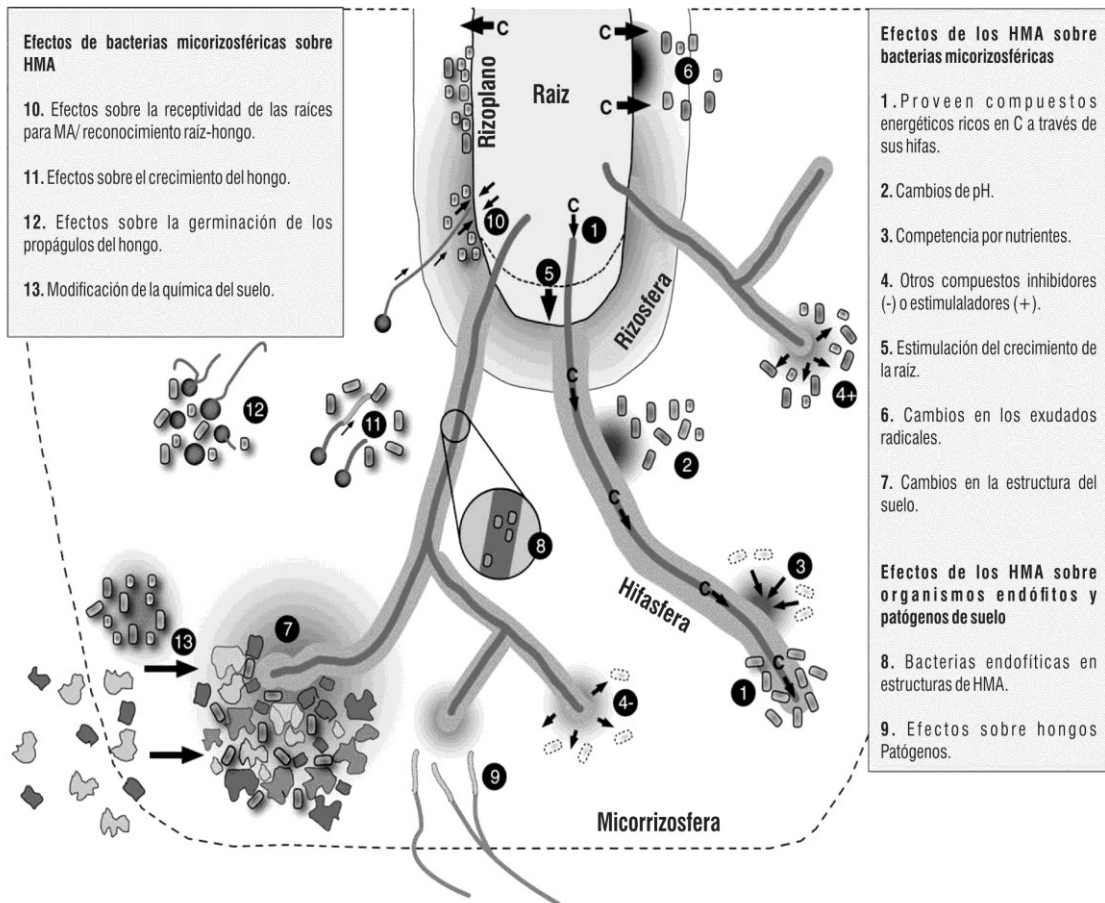
El establecimiento de la relación simbiótica de los hongos micorrízicos con las raíces de las plantas se ve afectada de diversas maneras por los otros microorganismos de la rizósfera, especialmente por las bacterias. Las poblaciones microbianas en la rizósfera pueden interferir a través de la competencia, o bien beneficiar el establecimiento de la simbiosis micorrízica de manera sinérgica (Gryndler, 2000). Un típico efecto beneficioso es el ejercido por las bacterias facilitadoras de la micorrización, conocidas por su nombre en inglés “**Micorrhiza-Helper-Bacteria**” (MHB), término propuesto por Garbaye (1994) quien para su definición sugiere que se trata de bacterias asociadas a raíces y hongos micorrízicos que promueven selectivamente el establecimiento de la simbiosis micorrízica como tal.

Esto aplica tanto a ectomicorrizas (Garbaye, 1994; Founoune *et al.*, 2002; Frey-Klett *et al.*, 2005) como a las asociaciones de micorrizas arbusculares (MA) (Azcón-Aguilar y Barea, 1995; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2004) si bien sólo unos pocos ejemplos de MHB se han divulgado para este tipo de simbiosis (Toro *et al.*, 1997; Singh y Kapoor 1998). Von Alten *et al.*, (1993) han estudiado el potencial de las MHBs en relación con micorrizas arbusculares en cultivos hortícolas, pero los resultados más avanzados obtenidos hasta el momento se refieren a especies forestales, tales como el Abeto de Douglas, también conocido como Pino de Óregon y su combinación simbiótica con *Laccaria laccata* (Garbaye, 1994).

Algunos microorganismos del suelo son conocidos por producir compuestos que aumentan las tasas de exudación de la raíz. Esto, a su vez estimula los micelios de las MA en la rizósfera o facilita la penetración de la raíz por el hongo. Las hormonas vegetales, producidas por el estímulo de microorganismos del suelo, afectan el establecimiento de las MA (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Los microorganismos de la rizósfera también pueden influir en las etapas de desarrollo pre-simbiótico, aumentando la tasa de germinación de esporas y el crecimiento micelial (Azcón-Aguilar y Barea, 1995).

El concepto de MHB da una nueva dimensión a la investigación de las micorrizas mediante la identificación de una categoría de los microorganismos de la rizósfera que no pueden ser ignorados en el estudio de la simbiosis micorrícica en su ambiente natural. Las MHBs son especialmente importantes en el estudio de la competitividad y dinámica de poblaciones de hongos micorrícicos (Garbaye, 1994).

Los principales mecanismos a través de los cuales las MHBs pueden favorecer el establecimiento de la simbiosis micorrícica, según lo estudiado por Johansson y colaboradores (2004) pueden resumirse en: 1) Efecto de MHBs en la receptividad de la raíz (la bacteria, proliferando en la rizósfera previo a cualquier desarrollo del hongo simbiótico, mejora la receptividad de la raíz a la formación de micorrizas. Algunos microorganismos como por ejemplo *Pseudomonas sp.*, mediante la producción de enzimas degradadoras de pared celular promovieron el establecimiento de endomicorrizas arbusculares en raíces de trébol); 2) efecto de las MHBs sobre el reconocimiento hongos – raíz; 3) efecto de las MHBs sobre el crecimiento fúngico (estimulación trófica), 4) modificación de los suelos rizosféricos por MHBs; 5) efecto de MHBs sobre la germinación de los propágulos fúngicos (Figura 2).



**Figura 2.** Vista esquemática de las interacciones posibles entre los diferentes componentes de la micorrizósfera. (Modificado de Johansson *et al.*, 2004)

Las bacterias facilitadoras de la micorrización (MHB) son probablemente bastante comunes en el suelo, ya que fueron encontradas cada vez que se buscaron, bajo condiciones de sitios muy variables y en varias combinaciones de planta-hongo. Por otra parte, parecen estar estrechamente asociadas con los hongos micorrícicos en los órganos simbióticos (Garbaye, 1994).

El establecimiento de inóculos de RPCV en la rizósfera, puede verse afectado por la coinoculación de hongos MA (Ravnskov *et al.*, 1999; Bianciotto y Bonfante, 2002). En particular, la inoculación MA mejora el establecimiento de rizobacterias solubilizadoras de fosfato que actúan como MHBs, tanto inoculadas como indígenas (Toro *et al.*, 1997; Barea *et al.*, 2002). En el caso de bacterias inoculadas, es importante tomar en cuenta una serie de otros factores que definen su

"competencia rizosférica", tales como la capacidad de crecer en exudados de la raíz, la capacidad para sintetizar aminoácidos, vitaminas y el antígeno O de los lipopolisacáridos, al adherirse firmemente a la raíz, y motilidad, los mismos están implicados en el establecimiento de colonización efectiva y duradera por una bacteria introducida. (Lugtenberg y Dekkers, 1999)

Debe tomarse en consideración el hecho que las cepas de MHB son claramente selectivas de las especies de hongos, por lo que puede utilizarse el término hongo-específicas. Trabajando con endomicorrizas, Meyer y Linderman (1986) demostraron que una cepa rizosférica de *Pseudomonas putida* mejoró la infección micorrízica y el crecimiento subterráneo del trébol. De Oliveira (1988) trabajó con ectomicorrizas y encontró que varios aislamientos bacterianos de suelos del bosque estimularon la formación de micorrizas del hongo *Hebeloma crustuliniforme* con plántulas de *Haya obovata*, bajo condiciones controladas. Estos experimentos demuestran que el efecto beneficioso de la microflora del suelo, puede deberse a la presencia de cepas bacterianas específicas. El éxito competitivo de las plantas y hongos depende en parte de MHBs, mecanismo adaptativo crítico considerando la especificidad de la relación (Garbaye, 1994).

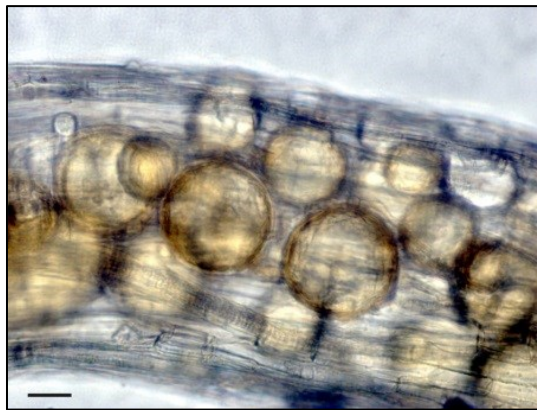
### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Material vegetal e inoculantes**

El trabajo fue realizado utilizando semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) cv. Ichiban (Florensa – De Routier). De acuerdo a la empresa semillera, esta cultivar se caracteriza por tener un crecimiento indeterminado, y por su gran vigor y rusticidad. En condiciones normales de crecimiento, el desarrollo de las plantas es de porte medio, caracterizándose por sus tallos gruesos, con entrenudos cortos, y su alta productividad. Los frutos son redondos de gran calibre, presentando una excelente firmeza. (Anexo 1).

Los microorganismos utilizados para la inoculación fueron un hongo micorrízico (*Glomus intraradices*) y una especie de rizobacteria Gram-negativa (*Pseudomonas fluorescens*).

Como medio de inóculo de *Glomus intraradices* se utilizó un formulado comercial en microgránulos (Aegis Gránulo®), conteniendo 100 propágulos por gramo, con un pH estabilizado entre 6,5 y 7,5 y un peso específico de 0,65 kg litro<sup>-1</sup>. Con el objetivo de confirmar la presencia de hongo, previo al inicio de los experimentos se analizó una muestra del granulado utilizado como inóculo, en el laboratorio del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), en la Universidad Nacional de Córdoba. Mediante la observación del preparado de inóculo bajo microscopio óptico (Nikon, E200) con aumentos de 400X y 1000X, se detectaron fragmentos radicales de 1 a 5 mm de largo que contenían de 30 a 100 esporas cada uno, lo que permitió corroborar los datos aportados por el fabricante (Figura 3). Además, se confirmó que las esporas observadas correspondían a las establecidas para *G. intraradices*, corroborándose su viabilidad al observar presencia de lípidos liberados al aplastar las mismas.



**Figura 3:** Observación microscópica en donde se aprecia una densidad de entre 30 a 100 esporas de *G. intraradices* obtenidas a partir de fragmentos radicales de 1 a 5 mm de longitud.

La fuente de inóculo de *Pseudomonas fluorescens* fue el producto comercial de marca RIZOFOS®, compuesto por un inoculante líquido Rizofós, y un líquido protector y solución

nutritiva específica para las bacterias, denominado Premax R, ambos provistos por el laboratorio Rizobacter Argentina S.A.

### 3.2. Métodos de inoculación

Las plantas de tomate se inocularon con *Glomus intraradices* y *Pseudomonas fluorescens* según lo correspondiente a cada tratamiento. Los inóculos se aplicaron directamente sobre el sustrato en el que se cultivaron las plantas, en el momento de su preparación para la siembra, inmediatamente previo a ésta. La unidad experimental correspondió a una bandeja de poliestireno expandido, de 126 alvéolos o celdas, en las que posteriormente crecieron individualmente las plántulas.

Para la inoculación con *Glomus intraradices*, se aplicó el producto comercial Aegis Gránulo en una dosis equivalente de 1 cm<sup>3</sup> por planta, según lo indicado por el fabricante. La metodología utilizada consistió en esparcir sobre un pliego de polietileno el volumen de sustrato necesario por unidad experimental, y sobre el mismo se espolvorearon 126 cm<sup>3</sup> del formulado granulado, luego se mezcló a mano hasta lograr una mezcla homogénea (Figura 4). Cada bandeja, se llenó con la mezcla de sustrato y formulado granulado descripta, para el tratamiento con *Glomus intraradices* (Mico).



**Figura 4:** Inoculación de *G. intraradices* con el empleo del producto comercial Aegis Gránulo® a una dosis equivalente a 1 cm<sup>3</sup> por planta, mediante mezcla manual del sustrato y el producto sobre un polietileno, previo al llenado de las bandejas de germinación’.

El inoculante Rizofós, se preparó según las indicaciones del fabricante, mezclando 20 % de solución Premax y 80 % de suspensión con *P. fluorescens*, de esta manera se obtuvo una concentración del inóculo de  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{cm}^{-3}$  (Abraham, 2012. Comunic. Pers). Esta suspensión se diluyó en agua a razón de 36  $\text{cm}^3$  en 464  $\text{cm}^3$  de agua potable, con el volumen de 500  $\text{cm}^3$  resultante, se regó el sustrato correspondiente a cada unidad experimental del tratamiento con *Pseudomonas fluorescens* (Pf), agregándose de esta manera 3,97  $\text{cm}^3$  de suspensión inoculante por planta (Figura 5).



**Figura 5:** Inoculación de *P. fluorescens* mediante el empleo del producto comercial Rizofos® con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC  $\text{cm}^{-3}$ , utilizando 3,97  $\text{cm}^3$  de solución inoculante por planta.

Para el tratamiento inoculado con ambos microorganismos (Mico + Pf), se utilizó la mezcla de sustrato con Aegis gránulo a la dosis ya mencionada y se regó cada bandeja con la suspensión de Rizofós, como se describió más arriba, luego se procedió a la siembra.

### 3.3. Conducción de los experimentos

Los experimentos se realizaron en dos etapas, en concordancia con la forma en que se realiza normalmente el cultivo comercial de tomate bajo cubierta:

- 1) De vivero (desarrollo y producción de plántulas de tomate),
- 2) De invernadero (trasplante y cultivo de tomate bajo cubierta).



### 3.3.1. Etapa de Experimento en Vivero

La etapa de producción de las plántulas de tomate se condujo en un vivero comercial en la localidad de Pocito, San Juan, Argentina (31° 41' 21,79" S– 68° 32' 57,90" O).

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) cv. Ichiban originalmente ya tratadas superficialmente con Tiram, se sembraron en bandejas de poliestireno expandido con alvéolos con forma de pirámide invertida y una capacidad de 32 cm<sup>3</sup>. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba *Spaghnum* rubia y perlita en una proporción 80:20 (v:v). El pH del sustrato fue modificado hasta alcanzar un valor medio de 6 a través del agregado de cal dolomita [CaMg(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], a razón de 3 kg por m<sup>3</sup> de sustrato.

Las bandejas se rellenaron con sustrato y se regaron por aspersión, con agua o con solución de inoculación, según correspondió a cada tratamiento. Se sembraron manualmente, y se cubrieron con una fina capa de perlita que fue aplicada con máquina sembradora neumática (Urbinati, modelo Eco, 1997).

Luego de sembradas, las bandejas se introdujeron en una cámara de germinación cuya temperatura se mantuvo en un rango de 18 °C a 25 °C y la humedad relativa entre el 80 y 90 % durante 72 horas. Luego de este período, y coincidiendo con una germinación del 75 %, las plántulas se trasladaron a un invernáculo para su desarrollo inicial y hasta completar la etapa de su crecimiento previo al trasplante.

Durante la etapa de vivero, las plantas fueron regadas por aspersión utilizando una lámina media de 0,63 mm día<sup>-1</sup>, la que contenía una solución de fertilizantes para complementar en cada bandeja la nutrición de las plantas con nitrógeno, fósforo, potasio y calcio (Tabla 1). El manejo sanitario consistió en aplicaciones periódicas de insecticidas, no siendo necesario el uso de productos fungicidas y bactericidas.

**Tabla 1.** Cantidad de unidades fertilizantes de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio aportadas en cada bandeja durante la fase de las plantas en vivero.

<b>Nutriente</b>	<b>g por Bandeja</b>
N	1,54
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1,74
K <sub>2</sub> O	1,36
CaO	0,19

Durante el período de vivero, se procedió a medir la temperatura del aire mediante termómetros de mercurio con registro de máxima y mínima, distribuidos en los invernaderos. En todo este tiempo los valores de temperatura dentro del invernáculo oscilaron entre mínimos y máximos absolutos de 1°C y 40,46°C, respectivamente (Anexo 2).

La etapa de producción de plántulas en vivero se desarrolló durante 70 días y comprendió los meses de mayo a julio de 2012.

### **3.3.1.1. Tratamientos y Diseño experimental**

El experimento consistió en la realización de 4 tratamientos con 3 repeticiones por cada uno: I) sustrato no inoculado (Test); II) inoculado con *Glomus intraradices* (Mico); III) inoculado con *Pseudomonas fluorescens* (Pf); IV) inoculado con *G. intraradices* + *P. fluorescens* (Mico+Pf). La unidad experimental correspondió a una bandeja de poliestireno expandido con 126 plántulas cada una, a las cuales fueron asignados los tratamientos al azar. El diseño experimental se dispuso con una distribución al azar (Figura 6). Se utilizaron en total 12 bandejas en todo el experimento.



**Figura 6:** Aspecto que presentaron las plántulas de tomate a los 69 días posterior a la siembra, y disposición al azar de las bandejas.

### **3.3.1.2. Variables medidas**

Con el objetivo de evaluar los efectos de los tratamientos durante la etapa de vivero sobre el desarrollo de las plántulas de tomate, se procedió a cuantificar el desarrollo radical y aéreo de las mismas a través de las mediciones del área foliar (Figura 7), peso seco de raíces y parte aérea de las mismas. Estas mediciones fueron realizadas a los 69 días de la siembra, cuando las plántulas alcanzaron el tamaño adecuado para su trasplante, teniendo en ese momento 4 hojas verdaderas, indicando la finalización de la etapa de vivero.

Para la medición del área foliar se consideró la alometría existente entre el largo y ancho de cada hoja con su superficie, utilizando la siguiente ecuación

$$AF = 0,3 * (A * L) - 1,71,$$

donde A correspondió al ancho y L al largo del folíolo respectivamente, según el método propuesto por Astegiano *et al.*, (2001). Se midieron 20 plántulas por cada bandeja al azar.



**Figura 7:** Procedimiento de estimación del área foliar de las plantas mediante la medición individual con calibre manual, de la longitud y ancho de cada hoja y posterior cómputo en el ordenador.

Para la determinación del peso seco de las raíces y la parte aérea, se extrajeron al azar 20 plántulas de cada bandeja. Cada planta se lavó con agua corriente suavemente a fin de separar el sustrato de las raíces sin provocar pérdida de las mismas. Posteriormente, cada uno de estos grupos de 20 plantas se colocó en sobres individuales de papel madera que se secaron en estufa marca Sanjor Serie SLDB, a una temperatura media de 70 °C hasta obtener peso constante (a las 72 hs). Una vez secas las plantas, se separó la parte aérea de las raíces cortando con tijera en la base de cada planta. Se determinó peso seco de las raíces (PR) y peso seco de la parte aérea (PA) utilizando una balanza de precisión marca Marte, modelo AS-F1. Posteriormente, los datos obtenidos de peso seco fueron ingresados en una planilla electrónica, procediéndose a calcular la relación entre el peso de masa seca de la parte aérea y la parte radical.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 %, habiéndose comprobado el cumplimiento de los supuestos de la prueba. Se utilizó el programa estadístico para Windows *Infostat*, Versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

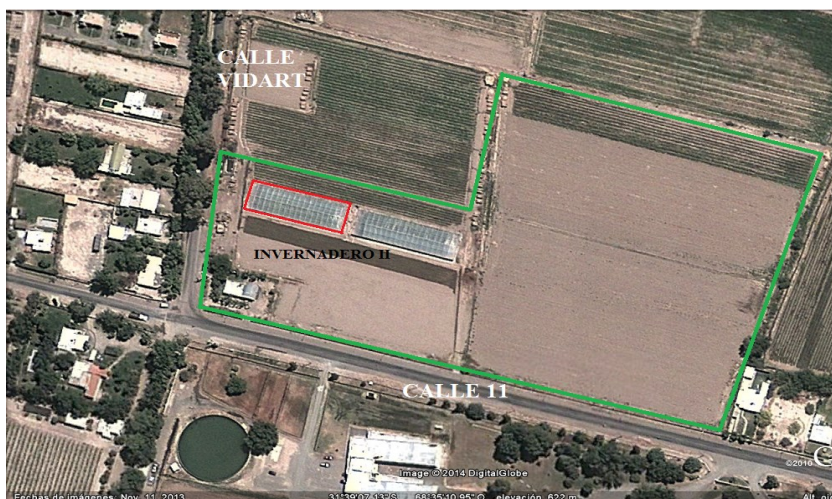
### 3.3.2. Experimentos en invernaderos

#### 3.3.2.1. Localización de los invernaderos y técnicas agronómicas utilizadas

Esta etapa se llevó a cabo mediante dos experimentos simultáneos realizados en diferentes invernaderos durante la misma temporada, en la localidad de Pocito, provincia de San Juan. Los experimentos se desarrollaron en invernaderos de productores de la principal zona hortícola de San Juan, respetando las prácticas normales de manejo del suelo y del cultivo, con la intención de probar en condiciones reales de trabajo, la efectividad de los microorganismos en estudio, sin crear situaciones experimentales ajenas a los ambientes productivos descritos. Uno de los experimentos (experimento 1) se realizó en un invernadero localizado en las coordenadas geográficas  $31^{\circ} 41' 53''\text{S}$   $68^{\circ} 34' 25''\text{O}$  (Figura 8); el otro experimento (experimento 2) en un invernadero situado en las coordenadas  $31^{\circ} 39' 08''\text{S}$ ,  $68^{\circ} 35' 22''\text{O}$  (Figura 9).



**Figura 8:** Ubicación del Invernadero en que se realizó el experimento 1 (destacado en rojo), situado sobre Mendoza entre calles 14 y 15, departamento Pocito, distante a 3,5 km. hacia el sur de Villa Aberastain, cabecera del departamento. Invernadero metálico con techo parabólico. Fuente: Google Earth (2014)



**Figura 9:** Ubicación del Invernadero en que se realizó el experimento 2 (destacado en rojo), situado sobre Vidart y calle 11, departamento Pocito, distante a 1 km. hacia el oeste de Villa Aberastain, cabecera del departamento. Invernadero de madera con techo a dos aguas. Fuente: Google Earth (2014)

Los invernaderos utilizados fueron uno del tipo parabólico, el otro del tipo capilla, ambos cubiertos con polietileno de 150 micrones de espesor. El invernadero en que se realizó el experimento 1 se caracterizó por tener su eje longitudinal orientado de sur a norte, en tanto que el invernadero en que se desarrolló el experimento 2 tenía su orientación este a oeste. En los dos experimentos el cultivo se realizó en suelo, correspondiente al denominado complejo El Salado, compuesto por Entisoles, suborden Fluventes, gran grupo y subgrupo Torrifluventes típico, de la familia franco fina y franco gruesa sobre esquelético arenoso, según la clasificación taxonómica realizada por Liotta (2002). En las tablas 2 y 3 se detalla la caracterización físico-química del suelo (Ce- pH- N – K – Na – Ca – Mg – Ras y textura) de cada invernadero. En los dos invernaderos el cultivo antecesor fue tomate, sin embargo y aún tratándose de un mismo suelo, los dos ambientes fueron considerados diferentes en función del manejo del suelo y abonado que se utilizó en anteriores cultivos.

**Tabla 2.** Caracterización físico química del horizonte superficial de suelo utilizado para ensayo en **experimento 1**. Muestra compuesta (0-0.30mts). CEe-pH-RAS: en extracto de saturación. Fósforo (P): Olsen. K<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>Ac (N, Ph7). Fuente: LAQUI. Laboratorio Químico Integral.

Muestra (N°)	CEe (μS.cm-1)	pH (pasta)	R.A.S.	Cationes (mg/l)		
				Mg+2	Na+	Ca+2
0623411	1.623	7,62	2,3	18	145	260

Muestra (N°)	Nitrógeno total, N (mg/kg)	Fosforo asimilable, P(mg/kg)	Potasio intercambiable K <sub>2</sub> O(mg/kg)	Textura
0623411	963	73	684	Franco a Franco Limoso

**Tabla 3.** Caracterización físico química del horizonte superficial de suelo utilizado para ensayo en **experimento 2**. Muestra compuesta (0-0.30mts). CEe-pH-RAS: en extracto de saturación. Fósforo (P): Olsen. K<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>Ac (N, Ph7). Fuente: LAQUI. Laboratorio Químico Integral.

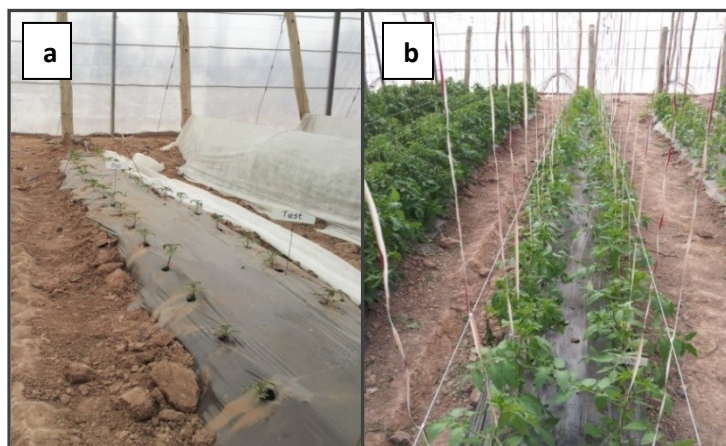
Muestra (N°)	CEe (μS.cm-1)	pH (pasta)	R.A.S.	Cationes (mg/l)		
				Mg <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>
0723421	6.230	7,22	4,1	121	600	1383

Muestra (N°)	Nitrogeno total, N (mg/kg)	Fosforo asimilable, P(mg/kg)	Potasio intercambiable K <sub>2</sub> O(mg/kg)	Textura
0723421	1.011	38	588	Franco

El cultivo se inició por trasplante utilizándose las plantas producidas en vivero, según se describió anteriormente, las que ya se encontraban inoculadas de acuerdo a los tratamientos realizados. El trasplante se realizó el 23 y el 25 de julio en el experimento 1 y 2 respectivamente, sobre el suelo sin esterilizar, bajo la premisa de respetar las condiciones de trabajo comúnmente desarrolladas por los productores del Valle de Tulum de San Juan, en el cultivo de tomate bajo



cubierta. Las plantas se dispusieron en camas de cultivo cubiertas con mulching negro, distantes 1,40 m entre sí, con un marco de plantación de líneas apareadas a 0,40 m y una separación de 0,30 m entre plantas en la línea, representando una densidad de 4,76 plantas m<sup>-2</sup> (Figura 10-a). Se siguió un plan de fertilización y un plan de tratamientos fitosanitarios que se presentan en los anexos 3 y 4, respectivamente.



**Figura 10:** a- Aspecto que presentaban las plantas de tomate luego del trasplante con una edad de 70 días, en la imagen se observan los túneles de manta térmica que se usaron en los primeros 20 días post-trasplante.

b- Aspecto que presentaban las plantas en el experimento 30 días después del trasplante, donde puede apreciarse el tutorado con cinta plástica.

En ambos experimentos el cultivo se condujo a un solo eje, para ello se fueron eliminando los brotes axilares durante el crecimiento de la planta, con una frecuencia de 2 veces por semana. Este eje o tallo principal se fue guiando con una cinta plástica atada a un alambre a 2 metros de altura a modo de tutor (Figura 10-b). Cuando las plantas alcanzaron dicha altura, lo que ocurrió entre los 70 y 75 días desde el trasplante, se procedió a realizar un “pinzamiento” de la yema apical, con el objetivo de favorecer el mejor cuajado y llenado de los frutos del último racimo.

La cosecha se inició los días 26 y 27 de octubre del 2012 en el experimento 2 y 1 respectivamente, cuando los frutos empezaron a alcanzar la madurez, y se prolongó por 45 días. Se consideró como punto de madurez el establecido en la tabla de clasificación por color para tomates



frescos, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (usda-tomato-ripeness-color-chart), como grado 3 “rosado”, entre el 30 y 60 % de la superficie del fruto muestra una coloración rosada o roja (United Fresh Fruit and Vegetable Assosiation & USDA, 2011). La recolección de los frutos se efectuó cada dos días de forma manual (Figura 11), a cada día de recolección se lo denomina popularmente “pasada”.



**Figura 11:** Estado de los frutos al momento de cosecha. La cosecha se realizó cortando sólo aquellos frutos del racimo que alcanzaban el estado “rosado”, dejando los que todavía no alcanzaban el color indicado para ser recolectados en la siguiente “pasada”.

### **3.3.2.2. Tratamientos y Diseño experimental**

Los tratamientos correspondieron a los realizados en la fase de vivero. Cada unidad experimental estuvo constituida por 9 plantas, con una superficie de 1,89 m<sup>2</sup> (Figura 12). El diseño experimental correspondió a bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento lo que determinó un total de 12 unidades experimentales en cada experimento.



**Figura 12:** Cada unidad experimental estuvo constituida por 9 plantas ( $1,89 \text{ m}^2$ ), cada tratamiento estuvo debidamente identificado. Se aprecia además la presencia de una cama de cultivo lateral como bordura, sobre la que no se realizaron mediciones.

### 3.3.2.3. Evaluación del crecimiento vegetativo

Durante el desarrollo del cultivo se midieron las variables:

- i) área foliar total por planta (AF) expresada en  $\text{cm}^2$ ,
- ii) peso de masa seca final de la parte aérea de cada planta (PMS) en g,
- iii) densidad de raíces de cada planta (DR) expresada en  $\text{cm cm}^{-3}$
- iv) Concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejido foliar (NTF, PTF y KTF), expresado en porcentaje de masa seca (% MS).

i) **Área foliar.** El área foliar se estimó utilizando el método alométrico indirecto propuesto por Astegiano *et al.*, (2001). Las mediciones se iniciaron a los 30 días desde el trasplante, la que fue continuada durante 2 meses repitiéndolas con una frecuencia de 15 días, hasta que la última hoja en emerger luego del pinzamiento apical completó su máxima expansión. De esta manera, fueron realizadas 5 mediciones sobre dos plantas por repetición y seleccionadas al azar. En cada oportunidad se midieron el largo y el ancho de la totalidad de las hojas de las plantas de tomate,

tomando como el largo máximo la distancia desde la base del peciolo hasta el extremo del folíolo central (L) (Figura 13) y como ancho máximo la distancia dada entre los extremos laterales de los folíolos (A). Con los datos obtenidos se calculó el área foliar a partir de la siguiente fórmula de regresión lineal, resultante de la propuesta por Astegiano *et al.*, (2001), corregida y ajustada para la cultivar Ichiban:

$$AF = 0,222 \times (L \times A) + 7,952$$



**Figura 13:** Medición del largo de la hoja, desde la base del peciolo hasta el extremo del folíolo central.

Para realizar dicha corrección fueron elegidas al azar 29 hojas de diversas plantas, las que fueron cortadas y tomadas de plantas de la misma cultivar, pero no pertenecientes al experimento. El área foliar de esas hojas se midió con un escaner CI-203 Handheld Laser Leaf Area Meter CID Bio-Science, Inc. (Vancouver Washington State). Mediante un ajuste lineal se obtuvo una recta de regresión entre el producto del largo (L) por la anchura máxima de cada hoja (A) y el área foliar (AF), que establece la relación alométrica. Esta fórmula de regresión permitió luego calcular el área foliar estimada específica para la cultivar Ichiban (Anexo 5). Luego se calculó el AF promedio para cada tratamiento en cada fecha de medición, expresada en  $\text{cm}^2$ . Con estos valores se construyeron curvas de área foliar de cada uno de los tratamientos.

Para el estudio estadístico de esta variable, se realizó un análisis multivariado de medidas repetidas en el tiempo con un nivel de significancia del 5 %, habiéndose comprobado el cumplimiento de los supuestos de la prueba. Este análisis permitió modelar las correlaciones existentes entre las observaciones seriales, poniendo a prueba las siguientes hipótesis: 1) no hay interacción entre tiempo y tratamiento, 2) no hay efecto tratamiento y 3) no hay efecto tiempo. Se utilizó el programa para Windows Infostat, Versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008).

ii) **Peso de masa seca de la parte aérea.** Una vez finalizada la totalidad de la cosecha de los frutos al estado de madurez indicado anteriormente, se procedió a extraer una planta por repetición, separando el tallo, las hojas y los frutos remanentes inmaduros. El tallo y las hojas se introdujeron en una estufa San Jor modelo H701P (Buenos Aires, Argentina) a 70 °C para su secado hasta peso constante (7 días). Para la determinación de los frutos, fueron conformadas muestras de 2 frutos por planta tomados al azar, los que fueron pesados en fresco, y luego secados a 70 °C en estufa durante 10 días. La relación entre el valor obtenido de peso de masa seca y fresca inicial permitió determinar el porcentual de materia seca de los mismos. Este procedimiento se realizó para luego poder estimar el peso de materia seca del total de los frutos por planta, a partir del valor de peso fresco de los mismos. Las plantas y frutos se pesaron utilizando una balanza marca Mettler, modelo P1200 10 mg (Zurich). Para obtener el peso de masa seca final de la parte aérea por planta se sumó el peso seco del tallo, las hojas y los frutos.

iii) **Densidad de raíces.** La densidad de raíces se estimó en una planta por unidad experimental al final del cultivo a través de la metodología adaptada por Böhm (1979). Para ello se realizó una excavación al costado de la planta hasta los 0,60 m de profundidad, en el sentido de las líneas de plantación. Se alisó bien el corte con una espátula y sobre éste se apoyó una cuadrícula de metal con cuadrados de 5 cm de lado (Figura 14).



**Figura 14:** Excavación lateral en cada planta y colocación de una malla metálica de cuadrícula con dimensiones de 5 cm de lado utilizada para efectuar el conteo de raíces según el método propuesto por Böhm (1979).

Sobre esta malla metálica se procedió a contar las raíces en un cuadrado correspondiente a cada una de las profundidades de 5, 10, 20 y 40 cm. En cada cuadrado fue removido 1 cm de suelo, logrando que quedaran expuestas las raíces que habían penetrando este espesor de suelo retirado del perfil y de cada cuadrilátero (Figura 15). La densidad radical ( $\text{cm cm}^{-3}$ ) se estimó aplicando la ecuación (Böhm, 1979):

$$DR = (L \times N) / (A \times p),$$

donde L era la longitud de la raíz y N el número de raíces (raíces transversales al plano de corte). Cuando las raíces se encontraban paralelas al plano de corte, se consideró independientemente de su extensión como equivalente a 1 cm de raíz. A representa el área observada en la cuadrícula y p la profundidad de penetración dentro del perfil (1 cm).



**Figura 15:** Exposición de las raíces luego de removido 1 cm de espesor de suelo, lo que permitió su conteo dentro de los cuadrados de la malla, a las profundidades establecidas.

iv) **Concentración de nutrientes en tejido foliar.** Para determinar la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejido foliar se utilizaron las hojas de las plantas secas en estufa. Estas fueron trituradas hasta obtener un polvo, utilizando una moladora eléctrica. Este material se procesó en laboratorio químico de la Estación Experimental del INTA San Juan. Para la medición de la concentración de nitrógeno (N) se utilizó el método Kjeldahl modificado, la concentración de fósforo (P) se determinó en extracto clorhídrico de cenizas y colorimetría del Molibdato de Amonio, y la de potasio (K) se determinó por Absorción Atómica en extracto clorhídrico de cenizas (AOAC, 1990). Todas las concentraciones fueron expresadas en porcentaje de materia seca.

Las variables peso de masa seca final de la parte aérea, densidad de raíces y concentración de N, P y K en tejido foliar, fueron analizadas mediante análisis de varianza utilizando un nivel de significancia del 5 %, una vez que fue comprobado para cada caso el cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de medias. Para el análisis estadístico se utilizó el programa para Windows *Infostat*, Versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

### 3.3.2.4. Evaluación de componentes del rendimiento

Los componentes de rendimiento se analizaron considerando las siguientes relaciones:

- i) racimos planta<sup>-1</sup>,
- ii) frutos planta<sup>-1</sup>,
- iii) peso de frutos planta<sup>-1</sup> en g.

Durante el período de cosecha se registró el número de racimos presentes en cada planta, también se midió el número de frutos cosechados de cada planta y el peso de los mismos, utilizando 4 plantas por repetición. Los frutos se pesaron utilizando una balanza electrónica marca Systal modelo Clipse BE 80-1998, capacidad de 0,1 kg a 15,0 kg. (Figura 16). Para cada una de estas variables se obtuvo el promedio de los valores medidos en las 4 plantas por parcela, luego de comprobado el cumplimiento de los supuestos, se analizaron los datos mediante un ANOVA para el que se usó el programa para Windows *Infostat*, Versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).



**Figura 16:** Los frutos se pesaron utilizando una balanza electrónica marca Systal modelo Clipse BE 80-1998, capacidad de 0,1 kg a 15,0 kg.

### 3.3.2.5. Evaluación de calidad de frutos

La calidad de frutos se evaluó a través de la determinación de:

i) la concentración de sólidos solubles totales (SST), ( °Brix), y;

ii) el diámetro ecuatorial de frutos (cm).

i) **La concentración de SST** se midió con un refractómetro manual marca Master (Atago Co., LTD) con escala de 0 a 32°Brix, sobre los frutos cosechados de cada racimo de las 4 plantas tomadas como muestras. Los frutos tenían un grado de madurez 3 “rosado”, según lo establecido en la tabla de clasificación por color para tomates frescos, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (usda-tomato-ripeness-color-chart) (United Fresh Fruit and Vegetable Association & USDA, 2011).

ii) **El diámetro de los frutos** de cada racimo resultó de realizar un promedio de dos mediciones tomadas perpendiculares entre sí en la región ecuatorial de cada fruto con un calibre manual marca Vernier Caliper 0 - 200 x 0.02 mm/ 1/1000 in.

El análisis de los valores medios de cada variable se realizó mediante un ANOVA con un nivel de significancia del 5%, previa comprobación del cumplimiento de los supuestos de la prueba, utilizándose el programa estadístico para Windows *Infostat*, Versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

### 3.3.2.6. Determinación de la colonización bacteriana y de la micorrización

Con el objeto de determinar la presencia y tamaño poblacional de los microorganismos inoculados (*Pseudomonas fluorescens* y *Glomus intraradices*), una vez finalizado el cultivo en invernadero se extrajeron muestras de suelo rizosférico (material biológico recuperado a través de lavados manuales de las raíces para remover el suelo levemente adherido) de 3 plantas por parcela al azar. Además se extrajo una muestra de suelo sin cultivo, del borde de cada uno de los invernaderos, hasta una profundidad de 30 cm, para poder determinar la posible presencia de esporas de hongos micorrícicos nativos ya que el mismo no había sido esterilizado, respetando la



modalidad de trabajo de los productores del Valle de Tulum, como se mencionó en la justificación del proyecto.

Para la determinación de *Pseudomonas fluorescens*, las muestras de suelo rizosférico conteniendo bacterias tanto de las partículas adheridas a las raíces como de las micro colonias presentes en la superficie de las raíces, fueron analizadas en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología e Interacciones Biológicas en el Suelo, Departamento de Ciencia y Tecnología de Universidad Nacional de Quilmes.

Aproximadamente 2 g de raíces y suelo rizosférico fueron suspendidos en 20 mL de solución salina (NaCl 0.9% p:v), agitado vigorosamente durante 15 minutos sobre una plataforma rotativa a 250 rpm para facilitar el desprendimiento de las células bacterianas adheridas a la superficie radical y tratado posteriormente con ultrasonido durante 1 minuto. Seguidamente, los tubos con muestras de raíces fueron centrifugados a 50xg a temperatura ambiente durante 1 minuto, recuperándose luego el sobrenadante en un nuevo tubo limpio de 50 mL. Para el recuento de colonias se sembraron diluciones seriadas de la suspensión de rizófera en placas Gould's S1, realizando tres repeticiones. Para el recuento del total de bacterias heterótrofas mesofílicas, se sembraron sobre un medio de 10 % TSA (Agar tripton de soja, Biokar). Ambos medios fueron suplementados con cicloheximida ( $100 \text{ ug/mL}^{-1}$ ) para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. El recuento de colonias se realizó después de 48 h de incubación a 28°C (Agaras, *et al.*, 2012).

A partir de las colonias de *Pseudomonas* spp. se obtuvieron suspensiones como fuentes de ADN para ser analizadas por el método de reacción en cadena de polimerasa, conocido por su sigla en inglés PCR (polymerase chain reaction) y comparar su estructura molecular con aquella obtenida de una muestra del inóculo utilizado, aplicando el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en mezclas de 25 u 11- que contenían 1 x buffer (Embiotec, Argentina), 0.2 mM dNTPs (Embiotec, Argentina), 0.8 M de Primers (Invitrogen, USA), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 U de Taq Pegasus

polimerasa (Embiotec, Argentina). El ciclo PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1min a 92 °C, 0,75 min a 57 °C y 0,75 min a 72 °C; y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Después de la amplificación, 2 u de 1 l de cada reacción fueron corridas en geles de agarosa al 1% en 0.5 × Tris, borato-EDTA (TBE) a 10 V/cm durante 50 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. El análisis de restricción de los amplicones oprF se llevó a cabo en un volumen final de 20 u l, que contiene 10 u l de la mezcla PCR y 2 U de la endonucleasa HaeIII (Promega). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 3 h. Los productos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% en 0.5 × TBE a 6 V/cm para 2 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los patrones de bandas de ADN se visualizaron bajo luz UV (Agaras, et al., 2012).

En el caso de las micorrizas *Glomus intraradices*, a los fines de evaluar el porcentaje de micorrización, se separaron las raíces de las muestras de suelo utilizando agujas histológicas y se lavaron con agua corriente, para posteriormente ser cortadas en trozos de 8 a 10 cm de largo y fijadas en alcohol al 70 % hasta su posterior estudio. La presencia de colonización micorrícica en las raíces se determinó mediante observación microscópica, previa clarificación y teñido siguiendo la técnica de Phillips y Hayman (1970) y Grace y Stribley (1991). Brevemente, las raíces se clarificaron en una solución de KOH 10% 15 minutos, acidificadas en HCl 1% (1 minuto) y luego teñidas con azul de anilina (Soteras *et al.*, 2013) (Figura 17).

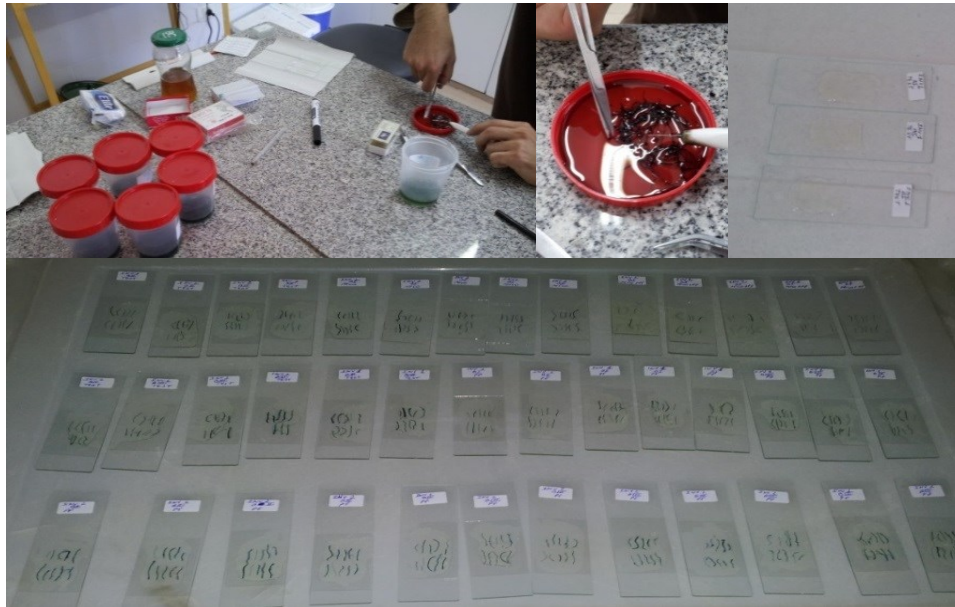
De cada muestra de raíces, se realizaron 5 preparados permanentes montados en PVA (Polivinil alcohol) y se cuantificó el porcentaje de colonización micorrícica arbuscular y de estructuras intracelulares (arbúsculos, rulos, vesículas e hifas), siguiendo la técnica propuesta por Mc Gonigle *et al.*, (1990) utilizando un microscopio óptico (Arcano, CM 2000) a 40X de aumento. Las estructuras intracelulares fueron fotografiadas en el microscopio Axiophot Zeiss con película Agfa (Becerra y Cabello, 2008). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA del

arcoseno del % de colonización con un nivel de significancia del 5 %, utilizándose el programa estadístico para Windows *Infostat*, Versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).



**Figura 17:** Preparación de las raíces para ser teñidas con azul de anilina, para su posterior observación microscópica.

Las muestras de suelo se dividieron en 3 sub muestras de las que se tomaron 100 g, los que fueron tamizados empleando mallas de distinto tamiz (500, 125 y 38  $\mu\text{m}$ ), siguiendo la metodología propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963). Posteriormente, los contenidos retenidos en los tamices fueron centrifugados en sacarosa al 80 % (Walker *et al.*, 1982). Las esporas obtenidas se colocaron en caja de Petri con base cuadrada de 9 cm de diámetro. Se realizaron preparaciones microscópicas de las esporas y esporocarpos, montándolos en polivinil-alcohol (PVA) y PVA + Melzer (Omar *et al.*, 1979). Las morfoespecies fueron identificadas utilizando un microscopio (Nikon, E200), siguiendo los manuales de identificación de Schenk y Perez (1990), INVAM ([http://invam.caf.wvu.edu/Myc\\_Info/Taxonomy/species.htm](http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/species.htm)) y Schübler y Walker (2010).



**Figura 18:** Preparados para observación microscópica y análisis de micorrización.

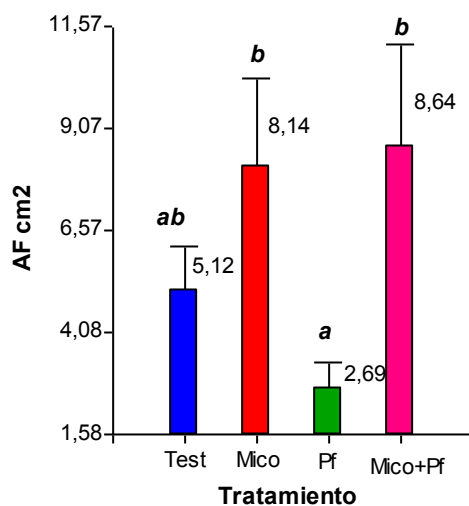
## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. - Experimentos en vivero

#### 4.1.1. - Área foliar de plántulas

El análisis de varianza realizado sobre los valores promedio de área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>) de las plántulas de tomate, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos control (Test) y plantines inoculados con *Pseudomonas fluorescens* (Pf), en comparación con los tratamientos inoculados con *Glomus intraradices* ya sea sólo (Mico), o en combinación con *Pseudomonas fluorescens* (Mico+Pf). En la figura 19 se puede observar que las plántulas de tomate que fueron coinoculadas (Mico+Pf) presentaron un AF 40,74 % mayor que el testigo y 68,87 % mayor que los tratados únicamente con *P. fluorescens* (Pf), asimismo los plantines micorrizados (Mico) alcanzaron un AF 37,10 % mayor que el tratamiento control (Test) y 66,95 % más que los tratados sólo con las rizobacterias (Pf). Estos resultados son similares a los obtenidos por Rojas

Contreras (2010), quien trabajó con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, no obtuvo los resultados esperados según la hipótesis inicialmente planteada. Según la autora, esto pudo deberse a varios factores: que no existiera gran reproducción de las rizobacterias empleadas; que requieran ser inoculadas a la semilla o bien que requieran dosis mayores de inoculación. Barea y Azcón, (1982) quienes también obtuvieron un bajo o nulo efecto de algunas cepas en el crecimiento del cultivo, señalan que esto pudo deberse a que éstas no detectaron el medio adecuado en la rizósfera, ya que en general, para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento.



**Figura 19:** Efecto de los tratamientos testigo (Test) e inoculados con *Glomus intraradices* (Mico), *Pseudomonas fluorescens* (Pf) y combinación de ambos (Mico + Pf) sobre área foliar (AF) en cm<sup>2</sup> de las plántulas de tomate. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2. - Peso seco de raíces y Peso seco de parte aérea de plántulas

De acuerdo al análisis de varianza de las tres variables en estudio, peso seco de raíces (PR), peso seco de parte aérea (PA) y de la relación partes aérea y radical (PA/PR), se observó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos a un nivel de  $P \leq 0,05$  (Tabla 4).

**Tabla 4:** Efecto de los tratamientos testigos (Test) e inoculados (Mico, Pf y Mico + Pf) sobre el peso de materia seca de partes aéreas (PA), raíces (PR), y la relación entre ambas (PA/PR). Letras distintas indican diferencias significativas en el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Tratamientos</b>	<b>PR</b>	<b>PA</b>	<b>PA/PR</b>
p-valor	0,0001	0,0001	0,0253
Test	1,05 <b>b</b>	2,49 <b>b</b>	2,38 <b>ab</b>
Mico	1,12 <b>bc</b>	2,83 <b>b</b>	2,53 <b>ab</b>
Pf	0,68 <b>a</b>	1,52 <b>a</b>	2,22 <b>a</b>
Mico+Pf	1,23 <b>c</b>	3,50 <b>c</b>	2,84 <b>b</b>

Al igual que en el caso del AF, para las variables peso de masa seca de raíces y de parte aérea, nuevamente se observó que el tratamiento en el que sólo se inoculó *P. fluorescens* fue el que obtuvo los menores valores (Tabla 4). Estos resultados contradicen los beneficios reportados acerca de la inoculación con esta bacteria sobre la rizosfera (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Siddiqui *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2000; Agarás *et al.*, 2012). Sin embargo, en otros trabajos han obtenido resultados dispares en cuanto a la acción de *P. fluorescens* en la promoción del crecimiento de raíces y tallos de plántulas de tomate (Almaghrabi *et al.*, 2013; Rojas Solís *et al.*, 2016).

León Jara (2014) en su trabajo con cepas nativas de *Burkholderia* y *Pseudomonas spp.*, aisladas de rizósfera de cultivos de tomate en la región de Lambayeque, Perú, determinó actividad enzimática, producción de ácido indol acético (AIA), y solubilización del fósforo, pero al evaluar su efecto sobre el poder germinativo de semillas de tomate obtuvo resultados dispares, ya que sus

resultados presentaron incremento, disminución o ningún efecto respecto del testigo. El 50 % de las rizobacterias disminuyó el poder germinativo, el autor sugiere que este resultado pudo deberse a la competencia por nutrientes entre semillas y bacterias. Por su parte, Persello Cartieux *et al.* (2003) demostraron que demasiado AIA puede afectar negativamente el desarrollo de las raíces laterales, debido a que las plantas carecen de un sistema regulador que mantenga los niveles de AIA fisiológicamente apropiados en sus tejidos, tal que este compuesto bacteriano exógeno, podría anular la síntesis de otros metabolitos de la ruta, inhibiendo el desarrollo de la planta.

El mayor peso de masa seca se obtuvo en el tratamiento co-inoculado con *Glomus intraradices* y *Pseudomonas fluorescens* (Mico+Pf) (Tabla 4). Incluso, en relación a este tratamiento, algunos autores sugirieron que una aplicación anterior de inóculo de HMA en el sustrato dedicado a desarrollar los plantines de tomate puede representar una ventaja (Lax *et al.*, 2010). Otros estudios señalan que el efecto individual de los microorganismos fue potenciado con la inoculación conjunta de ambos, funcionando exitosamente la trilogía simbiótica hongo-bacteria-planta (Alfonso y Leyva Galán, 2006).

Asimismo, trabajando con otros cultivos se han encontrado efectos similares. Recientemente, Minaxi *et al.*, (2013), reportaron que la inoculación de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) con cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* conjuntamente con *Glomus etunicatum*, mostraron un incremento significativo en el peso seco de los brotes, en comparación con el tratamiento de fertilización química con Super fosfato simple (0-21-0), pero no fue así en los tratamientos en que sólo inocularon rizobacterias. Estos autores atribuyeron estos resultados a la interacción positiva entre las rizobacterias y las micorrizas inoculadas, ya que ambas cepas producen hormonas que al parecer estimulan la infección por HMA.

## 4.2. – Experimentos en invernaderos

### 4.2.1.- Determinación de la colonización bacteriana y de la micorrización

#### 4.2.1.1. - Colonización de la rizósfera por *Pseudomonas ssp.* y caracterización molecular de los desarrollos microbianos

A través de los recuentos de colonias en placas, se comprobó una abundante presencia de *Pseudomonas sp.* en la rizósfera de las plantas de tomate de todos los tratamientos (Tabla 5).

**Tabla 5:** Resultados del recuento de colonias de *Pseudomonas* totales obtenidas en los dos invernaderos localizados en Pocito (San Juan) (Experimentos 1 y 2) luego de efectuar la dilución rizosférica en placas y su cuantificación en Unidades Formadoras de Colonias (UFC g<sup>-1</sup>) relativas a material rizosférico fresco de las unidades experimentales asignadas a cada tratamiento. Se consigna el promedio y su desvío estándar (DS).

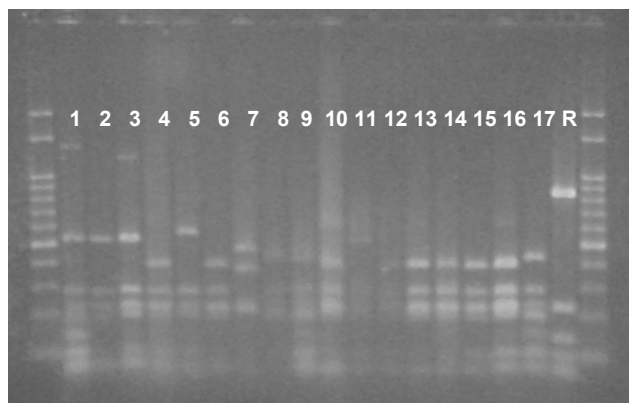
Tratamientos	Experimento 1		Experimento 2	
	Promedio	DS	Promedio	DS
Test	1,61e <sup>7</sup>	2,05 e <sup>7</sup>	4,71e <sup>6</sup>	2,37e <sup>6</sup>
Mico	1,30 e <sup>7</sup>	1,23 e <sup>7</sup>	2,21e <sup>7</sup>	1,76e <sup>7</sup>
Pf	2,54e <sup>7</sup>	2,88e <sup>7</sup>	3,38e <sup>6</sup>	2,89e <sup>6</sup>
Mico + Pf	2,67e <sup>7</sup>	1,76e <sup>7</sup>	9,12e <sup>6</sup>	1,04e <sup>7</sup>

En la figura 20 se muestran los resultados del análisis molecular del patrón génico de un marcador característico del género *Pseudomonas*, que a través del número y posición de bandas, permite deducir si dos bacterias comparten o no relación de parentesco.

Se observa que los desarrollos de bacterias en las placas de recuento que corresponden a las especies de *Pseudomonas* más abundantes presentes en las muestras de rizósfera analizadas,



identificadas con los números 1 a 17, no tienen un patrón génico similar al de la cepa del formulado comercial, denominado aquí “R”.



**Figura 20.** Visualización de las bandas de ADN en ultravioleta obtenidos de cepas nativas de *P. fluorescens* (1 a 17) con el inóculo comercial utilizado (R) analizados por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) aplicando el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Experimento 1 (bandas 1 a 5, 11, 12 y 17); Experimento 2 (bandas 6 a 10 y 13 a 16).

Estos resultados indican, que al final de los experimentos, las cepas de *Pseudomonas* más abundantes en la rizósfera no eran derivadas del inoculante utilizado, si no que muy probablemente correspondían a poblaciones nativas presentes en el suelo y que fueron capaces de colonizar la rizósfera de las plantas y hasta competir exitosamente sobre el inóculo utilizado.

Los resultados obtenidos permitirían corroborar la presencia de cepas nativas de *Pseudomonas*, dado que según se observa en la tabla 5, existió una importante concentración de estas rizobacterias en las raíces, además en la figura 20, se observa que ninguna de las colonias analizadas, correspondientes a las más abundantes en las raíces, tiene el perfil genético de la cepa comercial inoculada. Por lo tanto, es posible afirmar que al momento del final del cultivo, había una relativamente escasa presencia en la rizósfera de las plantas de la cepa de *P. fluorescens* inoculada.

Una posible causa de la ineficiente colonización en las raíces de plantas por las bacterias inoculadas es la falta de esterilización del suelo, ya que pueden existir especies nativas que ejerzan

mayor competencia y no permitan expresar el máximo de su potencial de acción a cepas exógenas inoculadas (Rojas Contreras, 2010). Sin embargo el presente estudio presenta una situación interesante, en cuanto a las relaciones que se establecieron entre las plantas y las bacterias autóctonas en condiciones reales de cultivo. Las raíces de las plantas juegan un papel importante ya que pueden determinar la composición bacteriana de la rizósfera por secreción activa de compuestos que estimulan o reprimen específicamente los miembros de la comunidad microbiana. La producción de exudados específicos de la raíz es un mecanismo que les permite a las plantas ‘seleccionar’ bacterias, ya que estos compuestos específicos pueden estimular o deprimir el desarrollo de distintos miembros de la comunidad microbiana del suelo (Berendsen *et al.*, 2012). La relativamente menor concentración de la cepa inoculada de *P. fluorescens* con respecto a las cepas nativas, puede haber ocurrido debido a que esta bacteria podría requerir ser inoculada en la raíz y no en el sustrato como se realizó en este ensayo, tal como fuera sugerido por Rojas Contreras (2010).

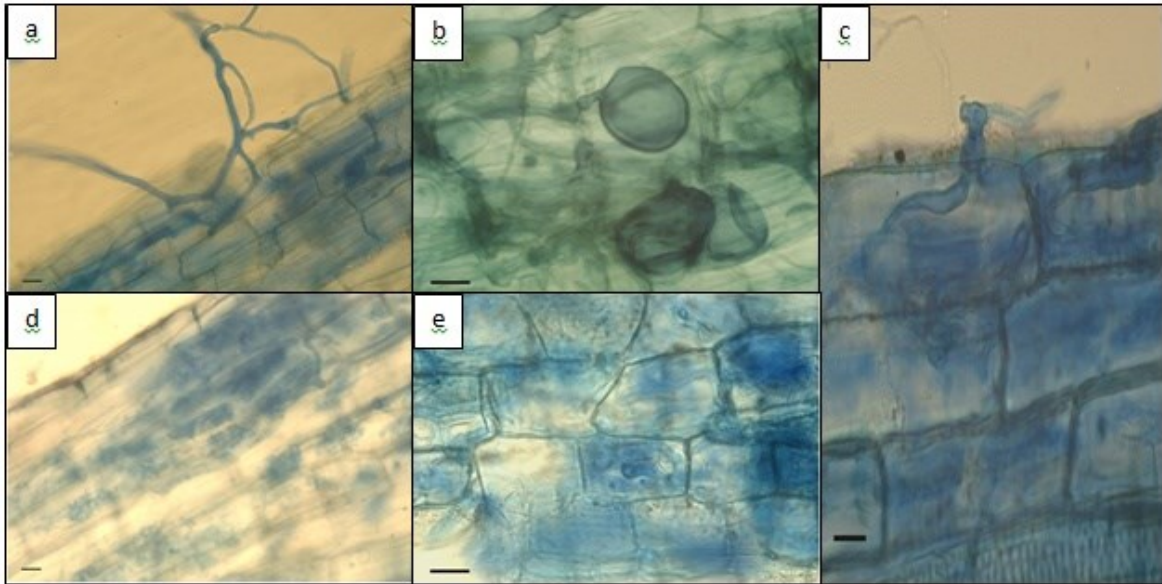
#### **4.2.1.2. Colonización del suelo y rizósfera por *Glomus intraradices***

De la observación microscópica de los preparados de raíces extraídas de las plantas de tomate, se pudo determinar la presencia de estructuras micorrícicas (Figura 21). Tales estructuras fueron observadas en todos los tratamientos (tanto en las plantas inoculadas con *G. intraradices* – Mico y Mico+Pf- como en las del tratamiento testigo –Test- y el tratamiento Pf en el que sólo se había inoculado *P. fluorescens*) y correspondieron a hifas externas e internas, puntos de entrada del hongo en la raíz, arbuscúlos, vesículas y rulos. El porcentaje de micorrización varió del 32 al 41 % (Figura 22). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

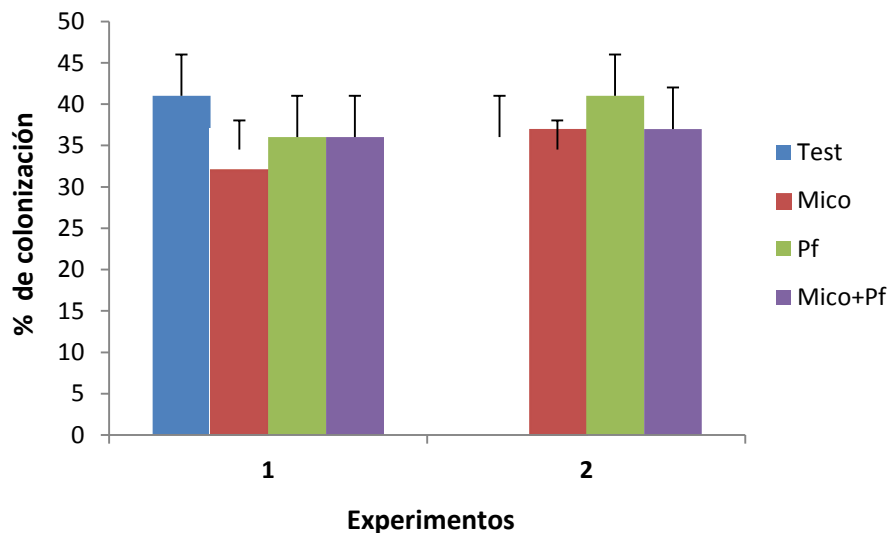
Si bien estos resultados muestran una colonización por micorrizas, no prueban que se trate de *G. intraradices* porque se observaron también esporas de otras especies presentes en el suelo sin cultivo. Del recuento de las mismas se obtuvieron los siguientes resultados:

**Experimento 1:** 16 esporas  $100\text{g}^{-1}$  de suelo seco.

**Experimento 2:** 10 esporas  $100\text{g}^{-1}$  de suelo seco.



**Figura 21:** Distintas estructuras micorrícicas tomadas a partir de los preparados microscópicos: a) hifas externas e internas, b) vesículas, c) punto de entrada, d) arbusculos, e) rulo.



**Figura 22:** Colonización micorrizica arbuscular (%) en los tratamientos realizados en invernaderos mediante los experimentos 1 y 2.

Los resultados obtenidos del análisis de las raíces, en donde se observaron porcentajes de colonización entre el 32 y 41 % (Figura 22) son similares a los encontrados por otros investigadores. Lax *et al.*, (2010), lograron resultados positivos mediante la colonización con micorrizas entre 30,0 y 47,5% al inocular plantas de tomate de la cv. 'Platense' con *G. intrarradices*. La colonización por parte de las micorrizas arbusculares (MA) sólo se efectuó cuando las plantas fueron inoculadas, a diferencia de lo observado en el presente estudio, en el que se manifestó la presencia de micorrizas nativas, de acuerdo a lo determinado en el tratamiento testigo (Test). La presencia de estas micorrizas nativas en el suelo podrían haber ejercido una competencia en la colonización de la rizósfera de las plantas de tomate con las MA exógenas inoculadas interfiriendo en su proceso de colonización. Este es un punto relevante para dejar constancia de cómo se comportan estas micorrizas en condiciones reales de cultivo donde le coexisten una gran

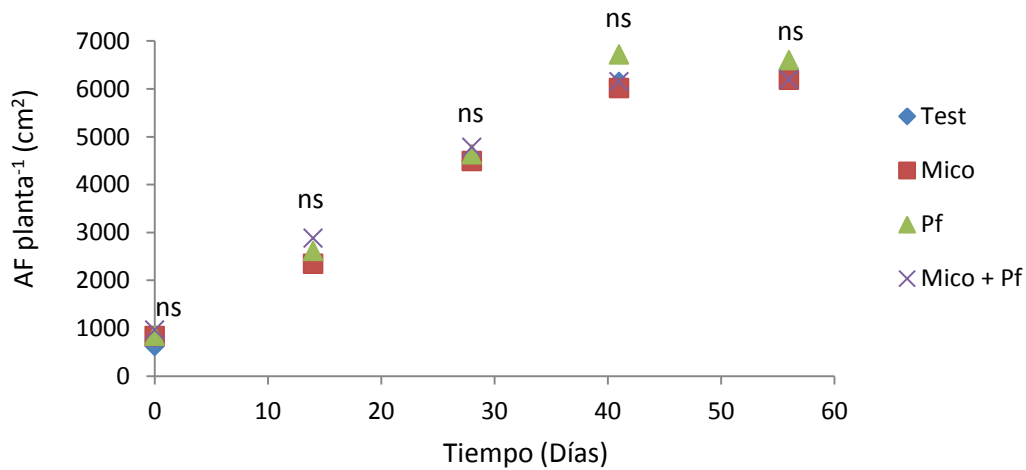
cantidad de factores ambientales y biológicos que ejercen influencias en su comportamiento y desarrollo.

Barrer (2009) propone dos métodos importantes para manejar las MA, uno de ellos es trabajar con cepas nativas o silvestres, estimulando uno o varios de los géneros después de que han sido estudiados y determinados, y el otro es introducir o inocular MA seleccionadas. El problema de este último método radica en que la inoculación puede alterar la acción de las MA nativas eficientes, al tener que competir con los hongos seleccionados. Sin embargo, es una opción importante en sistemas de monocultivos ya que la abundancia de las especies fúngicas en estas condiciones se reducen significativamente. El mismo autor cita estudios realizados por Castillo y colaboradores (2009), desarrollados en cultivos en invernadero en Chile, en los que se emplearon MA nativas y comerciales para inocular el suelo en cultivos de pimiento. Los resultados obtenidos les permitieron concluir que las plantas sometidas al tratamiento con MA nativas presentaron mejores resultados que aquellas inoculadas con MA comerciales.

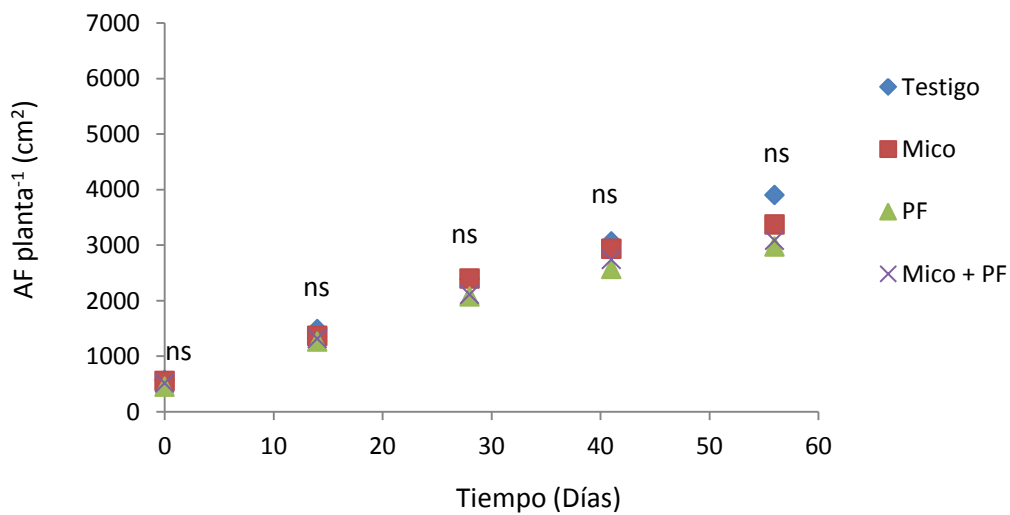
#### **4.2.2. Evaluación del crecimiento vegetativo**

##### **i) Área foliar (AF)**

El análisis de varianza multivariado de los valores promedio de área foliar (AF) (cm<sup>2</sup>) de las plantas, considerando las 5 mediciones realizadas en fechas sucesivas en cada unidad experimental, permitió comprobar que no existió interacción entre tiempo y tratamientos, no se presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamientos en el experimento 1 (Figura 23), como tampoco en el experimento 2 (Figura 24). A su vez los valores obtenidos en el estadístico de Wilks para ambos experimentos, permitieron rechazar la hipótesis de efecto tiempo, por lo tanto los perfiles de los 4 tratamientos cambiaron con el factor, lo que es lógico debido al crecimiento de las plantas.



**Figura 23:** Evolución del AF de las plantas de tomate a lo largo del ciclo del cultivo en el experimento 1. Tiempo expresa los días de cultivo, donde el día 0 de medición correspondió al día 30 desde el trasplante. No significativo (ns) según test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 24:** Evolución del AF de las plantas de tomate a lo largo del ciclo del cultivo en el experimento 2. Tiempo expresa los días de cultivo, donde el día 0 de medición correspondió al día 30 desde el trasplante. No significativo (ns) según test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## ii) Peso de masa seca final de parte aérea (PMS)

Al analizar el peso de la masa seca de la parte aérea conformada por los órganos tallo, hojas y frutos, obtenido al final del cultivo, no se encontraron diferencias estadísticas según la comparación de medias por el Test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) entre tratamientos en los experimentos 1 y 2 (Tabla 6).

**Tabla 6:** Efecto de los tratamientos sobre el peso de masa seca de la parte aérea de las plantas al final del cultivo en los experimentos 1 y 2. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas según test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamientos	Peso Masa Seca (g)			
	Experimento 1		Experimento 2	
	Medias	DS	Medias	DS
Test	475,40 a	166,30	317,14 a	11,68
Mico	286,29 a	96,98	323,39 a	26,42
Pf	389,41 a	119,58	294,77 a	12,72
Mico+Pf	398,47 a	7,64	325,70 a	31,84

## iii) Densidad de raíces (DR).

Luego de efectuado el análisis de varianza de los valores medios de la densidad de raíces (DR) ( $\text{cm cm}^{-3}$ ) de las plantas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para los dos experimentos realizados según la comparación de medias por el Test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7:** Efecto de los tratamientos sobre la densidad de raíces de las plantas al final del cultivo en los experimentos 1 y 2. Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas según test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamientos	Densidad de raíces ( $\text{cm cm}^{-3}$ )	
	Experimento 1	Experimento 2
	Medias	Medias
Test	0,40 a	0,37 a
Mico	0,33 a	0,50 a
Pf	0,39 a	0,36 a
Mico+Pf	0,45 a	0,36 a

#### iv) Concentración de nitrógeno (NTF), fósforo (PTF) y potasio (KTF) en el tejido foliar

Luego de efectuado el análisis estadístico de la concentración de los principales macronutrientes en los tejidos foliares (nitrógeno, fósforo y potasio), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y experimentos, según el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) (Tabla 8).

**Tabla 8:** Concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejido foliar expresado en porcentaje de masa seca, para los experimentos 1 y 2. Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas según test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Se consigna la media y su desvío estándar (DS) para cada tratamiento.

##### Experimento 1

Tratamientos	N		P		K	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Test	2,41 a	0,09	0,31 a	0,04	2,51 a	0,13
Mico	2,22 a	0,26	0,29 a	0,05	2,53 a	0,20
Pf	2,36 a	0,21	0,28 a	0,04	2,64 a	0,21
Mico+Pf	2,38 a	0,22	0,32 a	0,05	2,64 a	0,34

##### Experimento 2

Tratamientos	N		P		K	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Test	2,18 a	0,42	0,22 a	0,04	0,96 a	0,34
Mico	2,16 a	0,32	0,22 a	0,04	0,91 a	0,17
Pf	2,13 a	0,18	0,21 a	0,03	0,98 a	0,13
Mico+Pf	2,32 a	0,27	0,21 a	0,01	0,97 a	0,12

La evaluación del crecimiento vegetativo, especialmente en los cambios medidos en el área foliar de las plantas inoculadas tanto con *Glomus intraradices* (Mico) como con *Pseudomonas fluorescens* (Pf) y el tratamiento con la combinación de ambos microorganismos (Mico+Pf) no presentaron diferencias en cada momento de medición durante el ciclo de cultivo en comparación con el tratamiento testigo (Test) (Figuras 23 y 24). Estos resultados discrepan con los obtenidos en



el trabajo de Sánchez López (2011) quien evaluó *P. fluorescens* en cultivo de tomate bajo invernadero, en éste se evidenció un mayor área foliar del tratamiento con inoculación de la bacteria y aplicación del 50 % de fertilizantes químicos que el tratamiento testigo, a lo largo de 3 meses de medición. La autora señala que esta diferencia podría deberse a la propiedad de solubilización del fósforo que tiene la bacteria, lo que interviene sobre la captación del mismo por la planta, especialmente en suelos pobres en este nutriente (Sánchez López, 2011). No obstante, este efecto de solubilización del fósforo y su captación por la planta, no se manifestó aquí por los microorganismos utilizados, dado que no solo no se registraron diferencias en el área foliar sino tampoco en la concentración de P en las hojas (Tabla 8). Por otra parte, la mayor dotación de P del experimento 1 (Tabla 2), tampoco se reflejó en un incremento en la concentración foliar de P (Tabla 8).

Según lo enunciado por Bashan (1986), la respuesta a la inoculación podría variar según la relación que se establece entre la cepa bacteriana y la cultivar de la especie vegetal. Esto explicaría que no se haya manifestado un incremento del área foliar debido a la inoculación de la rizobacteria utilizada en este estudio. Los resultados del análisis molecular mostraron que la cepa de *Pseudomonas* comercial, no alcanzó efectivamente la rizósfera de los cultivos de tomate en estudio (Figura 20). Por medio de este análisis se comprobó que en todos los tratamientos existían cepas nativas de *Pseudomonas* propias de las rizósfera de los sitios de ensayo, inclusive en mayor proporción que la bacteria comercial (Tabla 5). La falta de respuesta observada en el crecimiento del área foliar de las plantas, concuerda con Santillana Villanueva (2006) que en su estudio no evidenció diferencia en la parte aérea con la inoculación de distintos tipos de aislamientos de *Pseudomonas sp.* La supervivencia de las especies nativas en la rizósfera del cultivo, podría ser beneficiosa debido a que lograron coexistir en las condiciones características del lugar. De esta forma, podrían aislarse y multiplicarse para su uso. Tal es el caso del estudio realizado por Echeverría Landeta (2012), quien trabajó con aislamientos nativos de HMA y *Pseudomonas*

*fluorescens*, tanto en tratamientos individuales como combinados, inoculados sobre tomate árbol (*Solanum betaceum*), y obtuvieron diferencias significativas en el área foliar de las plantas inoculadas sólo con HMA y en tratamiento combinado con *P. fluorescens*, en comparación con las plantas control.

Los resultados obtenidos aquí tanto para peso de masa seca final de la parte aérea de las plantas, como para densidad de raíces, difieren de los obtenidos por Echeverría Landeta (2012), sin embargo coinciden con los obtenidos por Santillana Villanueva (2006). Según Sánchez López (2011) la síntesis bacteriana de auxinas puede tener un efecto importante sobre el desarrollo de raíces secundarias y de pelos radicales, variables que no están relacionadas con un aumento en la longitud de la raíz sino del peso de la planta. Sin embargo, a juzgar por las mediciones realizadas en densidad radical, este efecto no fue observado en el presente trabajo, lo que pudo deberse a la acción ejercida por la microflora nativa.

En un trabajo realizado en tomate con *Pseudomonas fluorescens* y *Glomus mosseae* se pudo observar un efecto sinérgico de la inoculación conjunta (Gamalero *et al.*, 2004). A diferencia de lo medido en el presente trabajo a través de la densidad radical (Tabla 7) y concentración foliar de nutrientes (Tabla 8), este autor registró mayor longitud total de las raíces y un contenido de P foliar más alto en plantas de tomate inoculadas conjuntamente con ambos microorganismos, que en los tratamientos con cada uno en forma individual. Estos resultados fueron justificados por la utilización de una cepa de *P. fluorescens* a la que se atribuyó una mayor colonización micorrícica (Gamalero *et al.*, 2004). A partir de estos resultados se justificó el uso potencial de *Pseudomonas fluorescentes* y *G. mosseae* como inoculantes mixtos para tomate, habiéndose sugerido que la mejora en el crecimiento de las plantas de tomate podría estar relacionado con el aumento en la adquisición de fósforo. Sin embargo, en el estudio realizado aquí, se registró colonización por hongos micorrícicos y *Pseudomonas* en todos los tratamientos, incluyendo el testigo, pudiendo ser ésta una de las causas por las cuales no se evidenció un cambio sustancial tanto en el crecimiento de

las raíces como de la parte aérea de las plantas, y en la concentración de nutrientes en el tejido foliar.

#### 4.2.3.- Evaluación de componentes del rendimiento

Los resultados del análisis de las tres variables medidas como componentes del rendimiento no permitieron apreciar diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para los experimentos 1 y 2 (Tabla 9).

**Tabla 9:** Valores medios de los componentes del rendimiento medidos en las plantas de tomate en función de los tratamientos realizados para los experimentos 1 y 2. Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas según test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Experimento 1</b>			
<b>Tratamientos</b>	<b>Racimos Planta<sup>-1</sup></b>	<b>Frutos Planta<sup>-1</sup></b>	<b>Peso frutos Planta<sup>-1</sup> (g)</b>
Test	5,67 a	20,08 a	3557,92 a
Mico	5,58 a	22,25 a	3589,83 a
Pf	5,83 a	22,50 a	3641,25 a
Mico+Pf	5,75 a	23,42 a	3815,42 a

<b>Experimento 2</b>			
<b>Tratamientos</b>	<b>Racimos Planta<sup>-1</sup></b>	<b>Frutos Planta<sup>-1</sup></b>	<b>Peso frutos Planta<sup>-1</sup> (g)</b>
Test	6,17 a	20,25 a	3086,25 a
Mico	5,50 a	18,58 a	2885,42 a
Pf	5,83 a	18,33 a	2882,08 a
Mico+Pf	6,17 a	20,50 a	3242,50 a

Carrillo Castañeda y colaboradores (2000) reportaron un incremento en el rendimiento (peso total de frutos por planta) en plantas de tomate variedad Río Grande cultivadas en invernadero que fueron inoculadas con aislamientos de *P. fluorescens*. Por su parte, Cuervo y Rivas-Platero (1997), demostraron que la inoculación de *P. fluorescens* en tomate, estimula la colonización micorrízica en la raíz e incrementa la producción del cultivo. Estos resultados se diferencian con los

obtenidos aquí, en donde no se manifestaron diferencias en el peso de frutos por planta entre las plantas inoculadas (Pf, Mico y Mico+Pf) y el tratamiento control (Test) (Tabla 9).

También Reybet y sus colaboradores (2012) obtuvieron un rendimiento 55 % mayor en plantas de tomate inoculadas con *P. fluorescens* en combinación con la desinfección del suelo mediante solarización, en comparación con el tratamiento sin solarizar y sin inoculación de bacterias, mientras el rinde fue un 15 % mayor respecto del testigo, cuando sólo se realizó la solarización y en el tratamiento sin solarizar y con inoculación de *P. fluorescens* P190. La solarización realizada podría tener gran importancia para lograr una exitosa colonización del microorganismo inoculado. El efecto de competencia o antagonismo entre cepas inoculadas y nativas se reduciría si se considera que existen además otros antecedentes en los que se demostró que el tratamiento de solarización del suelo previo al cultivo significó una disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC) (Mitidieri *et al.*, 2009). En este trabajo se determinó que la disminución de estas poblaciones se observó incluso hasta 35 cm de profundidad. Esta práctica de esterilización del suelo previo al inicio del cultivo ayudaría a la disminución de microorganismos propios del suelo y por ende la competencia con las rizobacterias inoculadas, lo que permitiría que la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento *P. fluorescens* lograra una eficacia mayor en su establecimiento y una elevada densidad poblacional, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo en donde no se efectuó ningún tipo de desinfección del suelo previo al trasplante del cultivo. De esta manera, mediante la realización de esta práctica se podría alcanzar una efectiva colonización de cepas inoculadas, ya que los resultados obtenidos aquí (Tabla 5) demostraron que no hubo colonización por la cepa inoculada. Además vale la pena destacar que esta práctica que no fue realizada en este estudio, no es una tarea habitual entre los productores del Valle de Tulum, en la producción de cultivo de tomate bajo cubierta.

Introducir artificialmente un microorganismo exógeno en el suelo es siempre un desafío debido a la competencia ejercida por la microflora residente y de las propiedades fisico-químicas

específicas del suelo que determinan el equilibrio de su comunidad microbiana. Estas circunstancias han dado a menudo resultados inconsistentes y engañosos en ensayos en cultivos a nivel comercial (Garbaye, 1994; Rainey, 1999). Otra circunstancia que puede explicar el hecho de que no se manifestaran diferencias entre tratamientos, es que las bacterias y los HMA nativos, adaptados a las condiciones propias del sitio de ensayo, pudieron ser más eficaces en la competencia con los microorganismos inoculados, por lo que las cepas inoculadas no lograron establecerse adecuadamente en el suelo. Según Deveau (2007), debemos considerar que las interacciones en la rizósfera son de tal complejidad que no ocurre sólo una interacción entre hongos micorrícicos y bacterias asociadas, sino que la misma incluye otras poblaciones bacterianas y fúngicas y los depredadores como amebas, nematodos o colémbolos (Deveau, 2007). Esta situación resalta la importancia de realizar estudios que permitan analizar la complejidad de estas interacciones, lo que supone asimismo una limitación para su estudio en vivo, tal como se realizó en este trabajo. Estos antecedentes justifican estas apreciaciones, si se considera que en otros trabajos se concluyó que las respuestas en los incrementos de los rendimientos por la aplicación de biofertilizantes fueron variables e impredecibles (Hegde y Dwivedi, 1994; Katyal *et al.*, 1994, extraído de Díaz Vargas, 2001). Esto enfatiza la necesidad de profundizar el conocimiento en la producción de los mismos, como también en su distribución y uso de las técnicas apropiadas para su empleo. Rubí Arriaga y colaboradores (2009), mencionan que en el caso de los hongos micorrícicos, el período de inoculación, el tipo de aislado del hongo, así como la fuente y concentración del fertilizante químico aplicado, deben considerarse para maximizar los beneficios de la simbiosis.

#### **4.2.4.- Evaluación de calidad de frutos**

En la estimación de la calidad de los frutos en los experimentos 1 y 2 mediante la determinación de la concentración de sólidos solubles totales (Brix) y el diámetro ecuatorial de los frutos (cm), no se observaron diferencias estadísticas significativas según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) entre los tratamientos (Tabla 10).

**Tabla 10:** Efecto de los tratamientos en los experimentos 1 y 2 sobre la concentración de sólidos solubles totales (Brix) y Diámetro ecuatorial de los frutos (cm). Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas en el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Tratamientos	Experimento 1					
	Racimo 1		Racimo 2		Racimo 3	
	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Test	3,64 a	7,00 a	3,80 a	6,94 a	4,15 a	7,24 a
Mico	3,63 a	6,91 a	3,82 a	6,99 a	3,90 a	7,98 a
Pf	3,47 a	7,35 a	3,92 a	6,95 a	4,23 a	6,97 a
Mico+Pf	3,48 a	7,23 a	3,83 a	6,83 a	4,03 a	7,42 a

Tratamientos	Experimento 2					
	Racimo 1		Racimo 2		Racimo 3	
	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)	SST (° Brix)	Diam Frutos (cm)
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Test	4,04 a	7,39 a	4,56 a	6,94 a	5,02 a	6,86 a
Mico	4,43 a	6,91 a	4,64 a	6,43 a	4,91 a	6,73 a
Pf	4,22 a	7,53 a	4,70 a	6,87 a	5,03 a	6,84 a
Mico+Pf	4,33 a	6,81 a	4,88 a	6,79 a	4,71 a	6,71 a

El tamaño del fruto, expresado a través del diámetro ecuatorial, es un parámetro de calidad importante en la comercialización de tomate en fresco. De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, el tamaño correspondió a la categoría de mediano, según la resolución ex-SAG N° 297/1983 que reglamenta las Condiciones Generales de Presentación y Tipificación de Hortalizas Frescas.

Para este parámetro no se observaron diferencias significativas, coincidiendo con Solís Guevara (2010) que al probar plantas sin tratar y plantas inoculadas con HMA a distintas

concentraciones, los frutos no presentaron diferencias en sus diámetros. Serge Gagné *et al.* (1993), probaron los efectos de 4 cepas de *Pseudomonas fluorescens*, sobre el rendimiento y tamaño de frutos de tomate cultivado en invernadero. Realizaron sus ensayos en dos épocas, primavera y otoño, en ésta última temporada trabajaron bajo condiciones desfavorables para el desarrollo del cultivo. Sus resultados fueron diferentes en cada época, ya que no obtuvieron diferencias significativas para esta variable en los ensayos de primavera, y sin embargo en otoño el tamaño de los frutos de las plantas tratadas con la cepa 23-68 de *Pseudomonas fluorescens* fue un 11,1 % mayor que para el tratamiento control (Gagné *et al.*, 1993).

El contenido de sólidos solubles es otra variable de gran importancia en la determinación de la calidad de los frutos maduros del tomate. De acuerdo con el análisis de varianza, los microorganismos inoculados tanto en forma individual como combinados, no tuvieron un efecto significativamente favorable en la concentración de sólidos solubles totales (SST) en ninguno de los dos experimentos realizados (Tabla 10). De todas maneras cabe destacar que los valores de SST obtenidos, se encuentran dentro de los parámetros de calidad deseables, según lo mencionado por Santiago *et al.* (1998), quienes establecieron que el tomate para consumo en fresco debe tener contenidos mayores a 4.0 °Brix.

Las dos variables estudiadas para evaluar la calidad de los frutos, están íntimamente relacionadas a los parámetros de crecimiento y desarrollo, al no haberse manifestado cambios en éstos, resulta una consecuencia esperable que no aumentara la cantidad de azúcares en el fruto. (Coutinho *et al.*, 2014; Copetta *et al.*, 2011; Deaquiz Oyola, 2014).

## 5. Conclusiones

- Las plántulas de tomate inoculadas conjuntamente con *G. intraradices* y *P. fluorescens* tuvieron un mayor desarrollo radical y aéreo.
- Los microorganismos inoculados en la etapa de vivero, en el sustrato utilizado para la producción de las plántulas de tomate, no lograron colonizar el suelo donde se realizó el cultivo en invernadero.
- La inoculación de las plántulas de tomate con los microorganismos en estudio, no produjo un incremento en el crecimiento de las plantas cultivadas en invernadero.
- No se observó un aumento en los rendimientos del cultivo de tomate en invernadero que pudiera explicarse por la inoculación de las plántulas con *G. intraradices*, con *P. fluorescens*, ni con la coinoculación de ambos.
- De la inoculación de plántulas de tomate con *G. intraradices* y *P. fluorescens* no se observó un incremento de la calidad de los frutos del cultivo en invernadero.

### 5.1. Consideraciones finales

Considerando los antecedentes en este tema, y aunque algunas de las hipótesis no han podido ser confirmadas en esta tesis, a partir de los resultados obtenidos, se propone realizar una profundización en la investigación sobre métodos alternativos de inoculación tanto de las MA como de las rizobacterias, así como ajustar diferentes momentos, dosis y técnicas, de acuerdo con la especie vegetal y la cultivar utilizada. También la inclusión de una mayor diversidad de ambientes productivos.



Asimismo, se sugiere que puede resultar de interés investigar la adaptación y el desarrollo en el medio cuando se trate de introducir cepas comerciales, como así también trabajar en la obtención y multiplicación tanto de MA como rizobacterias nativas de la zona, a partir de la rizósfera de tomate como fuente de inóculo, que pueden presentar un alto potencial de colonización.

Los resultados obtenidos no desalentarían el empleo y uso de *G. intraradices* en las producciones agrícolas, ya que es posible que sus efectos benéficos estén limitados a ciertas circunstancias y se expresen mejor en condiciones donde algún factor de producción resulte ser limitante, como pueden ser bajos niveles de fertilidad. Del mismo modo, es relevante remarcar que el uso de la rizobacteria *P. fluorescens* en condiciones reales de producción en los invernaderos de la zona, permitió conocer la gran riqueza de microorganismos existentes, y que el efecto esperado de la inoculación con cepas foráneas depende de la existencia de los mismos en el suelo.

Finalmente, y también para el caso de *P. fluorescens* como PGPR, aunque los resultados aquí no fueron los esperados, no debe desalentarse su posible viabilidad, por lo que se debería profundizar en nuevos estudios para considerar adecuadamente tales condiciones preexistentes.

## 6. Bibliografía

- AGARAS, B., WALL L. G., VALVERDE, C. 2012. Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied Soil Ecology* 61: 305-319.
- ALFONSO, E. T. y LEYVA GALÁN, A., 2006. Evaluación agrobiológica de la coinoculación Micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73. ISSN: 0377-9424/2006.
- ALMAGHRABI, O. A., MASSOUD, S. I., ABDELMONEIM, T. S., 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 57–61. 2013.
- ARGERICH, C., TROILO L., RODRÍGUEZ FAZZONNE M., IZQUIERDO J., STRASSERA M.E., BALCAZA L., DAL SANTO S., MIRANDA O., RIVERO M. L., GONZALES CASTRO G., IRIBARREN M. J., 2011. Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Representación de FAO en Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 264 pp.
- ASTEGIANO E.D., FAVARO J.C. y BOUZO C.A., 2001. Estimación del área foliar en distintos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) utilizando medidas foliares lineales. *Revista FAVE, Sección Ciencias Agrarias* 16 (2): 249-256.
- AZCÓN-AGUILAR, C. y BAREA, J.M., 1995. Saprophytic growth of arbuscular–mycorrhizal fungi. En: Varma A. y Hock B. (eds.) *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. P. 391–407.
- AZCÓN-AGUILAR, C. y BAREA, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* (1996) 6: 457–464.
- AZCÓN-AGUILAR, C., JAIZME-VEGA, M.C. y CALVET, C. 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. En: Gianinazzi S, Schüepp H., Barea J.M., Haselwandter K. (eds.) *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, P. 187-198.

- BAREA, J.M., AZCÓN, R. y AZCÓN-AGUILAR, C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 343–351.
- BAREA, J.M. y HONRUBIA, M. 2004. La micorrización dirigida de la planta forestal. En: Vallejo, V.R. y Alloza, J.A. (eds.), *Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo*. CEAM., Valencia, España. P. 215-260.
- BAREA, J.M., POZO, M.J., AZCÓN, R. y AZCÓN-AGUILAR, C., 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (457): 1761-1778.
- BARRER, S. E., 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 7(1): 123-132.
- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology* 51(5): 1089-1098.
- BECERRA, A. y CABELLO, M. 2008. Hongos micorrízico arbusculares presentes en bosques de *Alnus acuminata* (Betulaceae) de la yunga argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 43 (3-4): 197 - 203.
- BENENCIA, R. 1994. La horticultura bonaerense: lógicas productivas y cambios en el mercado de trabajo. *Desarrollo Económico* 34(133): 53-73.
- BERENDSEN, R. L., PIETERSE, C.M.J. y BAKKER, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17(8): 478-486.
- BIANCIOTTO, V. y BONFANTE, P., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:365–371.
- BÖHM, W. 1979. *Methods of studying root systems*. Ecological Studies 33. Ed. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 188 pp.
- BOUZO, C., PILATTI R., FAVARO J C. y GARIGLIO N F., 2003. Cultivo de tomate en invernadero. Alternativas para el Control de Temperaturas Extremas. *Revista IDIA XXI, Cadena Hortícola y Florícola* 4: 137-151.

- BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D., 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102.
- BRUNDRETT, M., BEEGHER, N., DELL, B., GROOVE T. y MALAJCZUK N. 1996. Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32, Camberra. 374 pp.
- CARRILLO CASTAÑEDA, G.; MUÑOZ, J.; JUÁREZ, D., RUIZ, L. R. y MÜLLER G., 2000. Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. *Biotechnología Aplicada* 17: 171-176.
- COPETTA, A., BARDI, L., BERTOLONE, E. y BERTA, G. 2011. Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Biosystems* 145(1): 106–115.
- CORVO DOLCET, S., 2002. Zonas de producción de tomate en Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección de agricultura. 15 pp.
- COUTINHO E.L.M., ORIOLI J.V., SILVA E.J. DA, COUTINHO NETO A.M. y CARDOSO S.S. 2014. Nutrición, producción y calidad de frutos de tomate para procesamiento en función de la fertilización con fósforo y potasio. *Agrociencia Uruguay* 18(2). <http://www.scielo.edu.uy>  
Consulta: mayo 2017.
- CUERVO, J. y RIVAS-PLATERO, G. 1997. Biota rizosférica: un recurso para promover el crecimiento y la protección de las plantas. *Manejo integrado de plagas. Hoja técnica* 21: 1-4.
- D'ANTONI, M.J., VENTO, B., MORENO, G. y PORRA, C., 2012. Determinación del período crítico de interferencia de malezas en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*), San Juan, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de La Plata* 111(1): 23-30.
- DE OLIVEIRA, V.L., 1988. Interactions entre les microorganismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne chez le hétéro (*Fagus sylvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus*. Ph.D. thesis of the University of Nancy, France. 118 pp.
- DEAQUIZ OYOLA, Y.A. 2014. Los frutos y su fotosíntesis. *Conexagro JDC* 4(1): 39-47.
- DEVEAU, A., 2007. Déterminisme moléculaire des interactions entre le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N et des bactéries du sol. Ph.D. thesis of the University

of Nancy, France. Laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes. Sciences et Techniques Biologiques Ecole Doctorale. 320 pp.

DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M. y ROBLEDO C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, U.N.C. Argentina.

DÍAZ VARGAS P., FERRERA CERRATO R., ALMARAZ SUÁREZ J.J., ALCÁNTAR GONZÁLEZ G., 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamérica*. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 19(4): 327-335

EICHEVERRÍA LANDETA, E. J., 2012. Efecto de la interacción de hongos micorrícicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate árbol (*Solanum betaceum*) durante las primeras fases de crecimiento. Tesis de grado. Escuela Politécnica del Ejército – Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador. 78 pp.

FOUNOUNE, H., DUPONNOIS, R., BÂ, A.M., SALL, S., BRANGET, I., LORQUIN, J., NEYRA, M., CHOTTE, J.L., 2002. Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus albus*. *New Phytologist* 153: 81–89.

FRANDESCANGELI, N. y MITIDIERI, M., 2006. El invernadero hortícola, estructura y manejo de cultivos. INTA, Estación Experimental Agropecuaria San Pedro, Argentina. 2 da edición. 35 pp.

FREY-KLETT, P., CHAVATTE, M., CLAUSSE, M.L., COURRIER, S., LE ROUX, C., RAAIJMAKERS, J., MARTINOTTI, M.G., PIERRAT, J.C. y GARBAYE, J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist Review* 165: 317–328.

FREY-KLETT, P., GARBAYE, J., TARKKA M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist Review* 176: 22–36.

GABRIEL, E., 1997. Prospección de los cultivos protegidos en Mendoza y San Juan, Argentina. *Avances en Horticultura* 2(1).1997. Edición on-line. <http://www.horticulturaar.com.ar>. Consulta: octubre de 2016.

GAGNÉ, S., DEHBI, L., LE QUÉRÉ, D., CAYER, F., y MORIN, J. L., 1993. Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing Media. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 25, No. 2, pp. 269-212, 1993.

RICHARD LEMAY and NIC~LE FOURNIER

- GAMALERO, E., TROTTA, A., MASSA, N., COPETTA, A., MARTINOTTI, M.G. y BERTA, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* (2004) 14:185–192.
- GARBAYE, J. 1991. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. En: Strullu, D. G. (ed.), *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*. Editions Lavoisier, Paris, Francia. pp. 197-248.
- GARBAYE, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytologist. 128(1): 197-210.
- GERDEMANN, J. W. y NICHOLSON, T. H., 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 84: 679-684.
- GRACE, C. y STRIBLEY, D.P. (1991). A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95:1160–1162.
- GRACIA, O., DE BORBON, C.M., GRANVAL DE MILLAN, N y CUESTA, G.V., 1999. Occurrence of Different Tospoviruses in Vegetable Crops in Argentina. *Journal of Phytopathology*. 147(4): 223–227.
- HARRISON, M. J., 2005. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59:19-42
- HILDEBRANDT, U., KALDORF, M. y BOTHE, H., 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* 154: 709-717.
- HODGE, A. 2000. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology* 32(2): 91-96.
- HONRUBIA, M., 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 66S1: 133-144.
- HONRUBIA, M., MORTE, A. y DÍAZ, G. 2002. Dinamismo del componente fúngico micorrícico y su incidencia en la regeneración del bosque mediterráneo. En: Charco, J. (Ed.), *La regeneración natural del bosque mediterráneo en la península Ibérica: evaluación de problemas y propuesta de soluciones*. ARBA-Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España. Pp: 87-113. <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1064/cuf0112s.pdf>. Consulta: diciembre 2016.

- JIMÉNEZ, R., VIRGEN, G., TABARES, S. y OLALDE, V. 2001. [On-line]. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Disponible en: <http://www.redepapa.org/delgadillo.pdf>. Consulta: Abril 2014
- JOHANSSON, J.F., PAUL, L.R. y FINLAY, R.D., 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 1–13.
- KAPULNIK, Y., GAFNY, R. y OKON, Y. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO<sub>3</sub> uptake in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Miriam) in hydroponic systems. *Canadian Journal of Botany* 63: 627-631.
- KENNEDY, A.C., 1998. The rhizosphere and spermosphere. En: Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., Zuberer D.A. (Eds.) *Principles and applications of soil microbiology*. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall. Pp. 389–407.
- KOEPLER, J.W., LIFSHITZ, K. y ZABLOTOWICZ, R.M., 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology Advances* 7: 39-44.
- KLOEPPER, J.W., ZABLOTOWICZ, R. M., TIPPING, E. M. y LIFSHITZ, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: Keister, D. L. y Cregan, P. B. (Eds.), *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 315–326
- KLOEPPER J.W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). En: Okon, Y. (Ed.) *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 111–118.
- LAX, P., BECERRA, A.G., SOTERAS, F., CABELLO, M. y DOUCET, M. E. 2010. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils* 47(5): 591-597.
- LENSCAK, M.P. y STAVISKY, A. 2016. Situación actual de la Plásticultura en Argentina. Conferencia. 39° Congreso Argentino de Horticultura: Valorización para nuevas oportunidades. – Santa Fe. Asociación Argentina de Horticultura.
- LEON JARA, C.I. 2014. *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y su potencial como promotoras del crecimiento de plantas en Lambayeque,

2012. Tesis de grado. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas - Departamento Académico De Microbiología y Parasitología. Lambayeque, Peru. 104 pp.
- LIOTTA, M. 2002. Los suelos en los Valles de Tulúm, Ullúm y Zonda. San Juan. 18 pp. <http://inta.gob.ar/documentos/los-suelos-en-los-valles-de-tulum-ullum-y-zonda> Octubre 2014.
- LÓPEZ CAMELO, A.F. e IGLESIAS, N. 2012. La utilización del Google Earth™ para el relevamiento de la superficie bajo cubierta en el Gran Buenos Aires, provincias de Corrientes, Salta y Jujuy. 35° Congreso Argentino de Horticultura – Corrientes. ASAGO.
- LOZANO FERNÁNDEZ, J., 2012. La producción de hortalizas en argentina. Secretaría de comercio interior. [http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la\\_produccion\\_de\\_hortalizas\\_en\\_argentina.pdf](http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf) Consulta: octubre 2014.
- LUGTENBERG, B. y KAMILOVA, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiolgy 63: 541-556.
- LUGTENBERG, B.J.J. y DEKKERS, L.C., 1999. What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent? Environmental Microbiolgy 1:9–13.
- MARTÍN AMOR, A., 2011. Efectos de la inoculación del hongo de micorrización *Tuber Melanosporum* y la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de plántula de *Pinus Halepensis*. Universidad politécnica de Madrid, Escuela universitaria de ingeniería técnica forestal, España. 60 pp.
- MC GONIGLE, T.P., MILLER, M., EVANS, D.G., FAIRCHILD, G.L. y SWAN, J.A., 1990. A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist Journal 115: 495–501.
- MEYER, J.R. y LINDERMAN, R.G., 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. Soil Biology and Biochemistry 18: 185-190.
- MINAXI, J. SAXENA, S. CHANDRA, y L. NAIN, 2013. Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13 (2): 511-525
- MITIDIERI, M.; BRAMBILLA, V.; SALIVA, V.; PIRIS, E.; PIRIS, M.; CELIÉ, R.; PEREYRA, C.; DEL PARDO, K.; CHAVES, E. Y GONZÁLEZ, J., 2009. Efecto de distintas secuencias de



- tratamientos de biofumigación sobre parámetros físicoquímicos y biológicos del suelo, el rendimiento y la salinidad de cultivos de tomate y lechuga bajo cubierta. *Horticultura Argentina* 28(67): 5-17.
- NCBI - National Center for Biotechnology. 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax> Consulta: Abril 2014.
- OMAR, M. B., BOLLAND, L. y HEATHER, W. A., 1979. P.V.A. (polivinil alcohol). A permanent mounting medium for fungi. *Bulletin of the British Mycological Society* 13:31-32.
- OMORUSI, V.I. y AYANRU, D.K.G. 2011. Effect of NPK fertilizer on diseases, pests and mycorrhizal symbiosis in cassava. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 391–395.
- ORDÓÑEZ CASTAÑEDA, Y. M., 2009. Interacción sinérgica entre hongos formadores de micorrizas arbusculares-*pseudomonas fluorescens* y su relación en la nutrición vegetal de fósforo. Tesis de maestría. Universidad Nacional De Colombia - Facultad de Ciencias. Maestría en Microbiología. 90 pp.
- ORNA CHAVEZ, A.R., 2009. Evaluación del efecto de la aplicación de micorrizas en la evaluación de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero. Tesis. Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica. Ríobamba, Ecuador. 58 pp.
- PÉREZ-MORENO, J. y READ, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F., NUSSAUME L. Y ROBAGLIA C. 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* 26: 189–199.
- PHILLIPS, J.M. y HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158–161.
- PUCHETA, J.A., SCHUGURENSKY, C., FULLANA, R., PATIÑO, H. y KUCHEN, B., 2006. Optimal greenhouse control of tomato-seedling crops. *Computers and Electronics in Agriculture* 50(1): 70–82.

- RAAIJMAKERS, J.M., PAULITZ, T.C., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C. y MOENNE-LOCCOZ, Y., 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361.
- RAMOS, B. 1999. Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género *Bacillus* para promover el crecimiento vegetal. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad San Pablo CEU, Facultad de ciencias experimentales y técnicas. Madrid, España. 241 p.
- RAVNSKOV, S., NYBROE, O. Y JAKOBSEN, I. 1999. Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hyphosphere soil. *New Phytologist* 142: 113-122.
- RAYNEY, P.B., 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental Microbiology* 1(3): 243–257.
- REYBET, G.E.; BUSTAMANTE, A.P.; REYBET; C.M.; BRAMARDI, S. y ESCANDE, A.R., 2012. Efecto sinérgico de la solarización del suelo y la aplicación de *Pseudomonas fluorescens* P190, sobre el rendimiento de tomate en invernadero. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue y Unidad Integrada Balcarce Área Sanidad Vegetal. 11 pp.
- RIZZARDI, M. V., 2010. Cultivos forzados en la provincia de San Juan. Proyecto Desarrollo Sustentable de la Horticultura Regional. Jornadas de Actualización Hortícola. INTA-EEA San Juan, Argentina.
- RODRIGUEZ, H., GONZALEZ, T. y SELMAN, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology* 84: 155-161.
- ROJAS CONTRERAS, T., 2010. Efecto de sustratos enriquecidos con rizobacterias promotoras de crecimiento en plantines de tomate. Tesis de grado. Universidad de Chile – Facultad de Ciencias Agronómicas. 65 pp.
- ROJAS SOLÍS, D., HERNÁNDEZ PACHECO, C. E., y SANTOYO, G. 2016. Evaluation of *Bacillus* and *Pseudomonas* to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22(1), 45-57. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.06.009.

- RUBÍ ARRIAGA M., GONZALEZ HUERTA, A., OLALDE PORTUGAL, V., REYES REYES, B.G., CASTILLO GONZALEZ, A.M., PEREZ LOPEZ, D.J., y AGUILERA GOMEZ, L.I. 2009. Influence of *Glomus fasciculatum* in growth and development of *Lilium* sp. Cv. Orange pixie. *Agricultura Técnica* 35(2): 201-210.
- SÁNCHEZ LÓPEZ, D. B., 2011. Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum* var. Sofía) bajo invernadero. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana - Facultad De Ciencias. Bogotá, Colombia. 77 pp.
- SANTIAGO, J., MENDOZA, M. y BORREGO F., 1998. Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana* 9(1): 59-65.
- SANTILLANA VILLANUEVA N., 2006. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecología Aplicada*, 5(1-2): 87-91., Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. <http://www.redalyc.org/articulo.oa.id=34150212> Consulta: septiembre 2014.
- SHARMA M.P., GAUR, A., TANU, U. y SHARMA, O.P., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhiza in sustainable management of root- and soil-borne diseases of vegetable crops. En: Mukerji, K.G. (Ed.) *Disease management of fruits and vegetables: fruit and vegetable diseases*, vol 1. Kluwer, Alphen aan den Rijn, pp. 501–539.
- SCHENCK, N. C. y PEREZ Y., 1990. *Manual for the identification of Mycorrhizal Fungi*. Synergistic Publications, Gainesville. 286 pp.
- SCHÜBLER A. y WALKER C., 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 56 pp.
- SCHÜBLER, A., SCHWARZOTT, D. y WALKER, C., 2001. A new fungal phylum, the glomeromycota: phylogeny and evolution. *The British Mycological Society. Mycological Research* 105 (12): 1413-1421.
- SIDDIQUI, Z. A., IQBAL, A. y MAHMOOD, I., 2001. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Applied Soil Ecology* 16: 179–185.

- SINGH, S. y KAPOOR, K.K., 1998. Effects of inoculation of phosphate solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza* 7:249–253.
- SMITH, S.E. y READ, D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition). Ed. Academic Press. Chapter 17: Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Pp. 611-636.
- SOLÍS GUEVARA, S. R., 2010. Efecto de los hongos micorrizógenos arbusculares (*Glomus fasciculatum*) en el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) variedades Alambra y Fortuna en la zona Urcuquí provincia de Imbabura. Tesis de grado para optar Título de Ing. Agrónomo. Universidad Técnica de Babahoyo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica, Ecuador. 55 pp.
- SOTERAS, F., RENISON, D. y BECERRA, A.G., 2013. Growth response, phosphorus content and root colonization of *Polylepis australis* Bitt. Seedlings inoculated with different soil types. *New Forests* 28: 173-186.
- TAHAT, M.M., KAMARUZAMAN, S., RADZIAH, O., KADIR J. y MASDEK, H.N., 2008. Response of (*Lycopersicum esculentum* Mill.) to Different arbuscular mycorrhizal fungi species. *Asian Journal of Plant Sciences* 7: 479–484
- TORO, M., AZCÓN, R. y BAREA, J.M., 1997. Improvement of arbuscular development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4408–4412
- UNITED FRESH FRUIT AND VEGETABLE ASSOCIATION & UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2011. Color classification requirements in United States. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do> Consulta: octubre 2014.
- VAN DER HEIJDEN, M.A.G., KLIRONOMOS, J.N., URSIC, M., MOUTOGLIS, P., STREITWOLF-ENGEL, R., BOLLER, T., WIEMKEN, A. y SANDERS, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- VESSEY, J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586.

- VESTBERG, M., CASSELLS, A.C., SCHUBERE, A., CORDIER C. y GIANINAZZI, S. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi and micropropagation of high value crops. En: *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J.M. y Haselwandter, K. (Eds.) Birkhauser Verlag, Switzerland. Pp. 223-233.
- VON ALTEN, H., LINDEMANN, A. y SCHONBECK, F., 1993. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* 2:167-173.
- WALKER, C., MIZE, W., MCNABB, H.S., 1982. Populations of endogonaceous fungi at two populations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60: 2518–2529.
- WANG, B. y QIU, Y.L., 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16(5): 299-363.
- YANG, C.H. y CROWLEY, D. 2000. Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 345-351.

**ANEXO 1:** Características de la cultivar Ichiban.

<b>TOMATE INDETERMINADO</b>			
<b>CV.</b>	<b>Destacado por</b>	<b>Características</b>	<b>Resistencias</b>
<b>I C H I B A N</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Gran calibre y calidad</li> <li>✚ Variedad con alto poder de adaptación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Frutos redondos de color rojo brillante, ligeramente achatados, sin hombro verde y levemente acostillados</li> <li>✚ Variedad rústica y vigorosa</li> <li>✚ Sus hojas dan excelente cobertura de frutos al aire libre o bajo plástico o malla</li> <li>✚ Flores grandes y homogéneas, ideal para la aplicación de hormonas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Virus del Mosaico del tomate</li> <li>✚ Virus del torrado del tomate</li> <li>✚ Marchitez por <i>Verticillium</i></li> <li>✚ <i>Fusarium</i></li> <li>✚ Nematodos</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia a partir de la página [www.seminis.com](http://www.seminis.com)

**ANEXO 2:** Registro de temperatura en etapa de crianza de plantines

Fecha	Temperatura (°C)			Fecha	Temperatura (°C)		
	promedio	mínimo	Máximo		promedio	mínimo	Máximo
16/05/2012	20,5	11	30	20/06/2012	17,365	2,25	32,48
17/05/2012	19,5	11	28	21/06/2012	22,405	8,61	36,2
18/05/2012	18	13	23	22/06/2012	18,86	8,58	29,14
19/05/2012	19	10	28	23/06/2012	17,045	8,41	25,68
20/05/2012	19,5	10	29	24/06/2012	20,005	8,01	32
21/05/2012	17	9	25	25/06/2012	21,475	8,19	34,76
22/05/2012	17,5	7	28	26/06/2012	18,8	7,64	29,96
23/05/2012	21	8	34	27/06/2012	20,915	8,51	33,32
24/05/2012				28/06/2012	18,83	9,46	28,2
25/05/2012				29/06/2012	18,225	8,7	27,75
26/05/2012				30/06/2012	21,315	9,46	33,17
27/05/2012	23	11	35	01/07/2012	20,705	9,19	32,22
28/05/2012	23	12	34	02/07/2012	12,415	10,87	13,96
29/05/2012	20	12	28	03/07/2012	17,835	7,75	27,92
30/05/2012	21	6	36	04/07/2012	17,705	7,57	27,84
31/05/2012	18,5	8	29	05/07/2012	18,07	8,98	27,16
01/06/2012	19,5	9	30	06/07/2012	19,805	9,07	30,54
02/06/2012	18	11	25	07/07/2012	20,96	8,91	33,01
03/06/2012	19,5	9	30	08/07/2012	15,56	7,03	24,09
04/06/2012	20,5	11	30	09/07/2012	18,95	8,55	29,35
05/06/2012	17,5	8	27	10/07/2012	17,89	9,53	26,25
06/06/2012	12	3	21	11/07/2012	19,64	7,51	31,77
07/06/2012	15	1	29	12/07/2012	17,45	8,29	26,61
08/06/2012	17,63	7,28	27,98	13/07/2012	19,07	9,77	28,37
09/06/2012	18	7,82	28,18	14/07/2012	18,89	10,17	27,61
10/06/2012	20,77	8,03	33,51	15/07/2012	17,235	9,69	24,78
11/06/2012	16,11	7,53	24,69	16/07/2012	18,055	7,82	28,29
12/06/2012	22,77	9,25	36,29	17/07/2012	19,645	9,29	30
13/06/2012	26,675	12,89	40,46	18/07/2012	18,76	9,52	28
14/06/2012	18,585	9,34	27,83	19/07/2012	19,485	9,86	29,11
15/06/2012	19,29	8	30,58	20/07/2012	17,34	9,57	25,11
16/06/2012	16,685	8,46	24,91	21/07/2012	17,545	9,98	25,11
17/06/2012	19,425	7,92	30,93	22/07/2012	20,38	9,19	31,57
18/06/2012	16,7	7,85	25,55	23/07/2012	17,785	9,34	26,23
19/06/2012	17,865	8,13	27,6	24/07/2012	17,855	9,6	26,11
				25/07/2012	18,095	8,59	27,6

### ANEXO 3: Plan de fertilización

#### Experimento 1.

Momento	Fertilizantes	Dosis	Aporte
Fertilización de base (antes del trasplante)	Guano de gallina	1,70 kg/m <sup>2</sup>	N: 5,2 g/m <sup>2</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : 2,1 g/m <sup>2</sup> K <sub>2</sub> O: 6,3 g/m <sup>2</sup>
	Fertidal (Fertilizante orgánico a base de guano de gallina 2,5-1-3).		
A los 65 días del trasplante por riego por goteo	Sol KS fertilizante líquido (0-0-25 + 17 S)	0,004 L/m <sup>2</sup>	K <sub>2</sub> O: 1 g/m <sup>2</sup> S: 0,68 g/m <sup>2</sup>
Desde el día 66 hasta el día 80 después del trasplante	Sol KS	0,014 L/m <sup>2</sup>	K <sub>2</sub> O: 3,5 g/m <sup>2</sup> S: 2,4 g/m <sup>2</sup>
A los 100 días	Sol KS	0,004 L/m <sup>2</sup>	K <sub>2</sub> O: 1 g/m <sup>2</sup> S: 0,68 g/m <sup>2</sup>
	Foliar P + K (0-28-8)	0,3 g/m <sup>2</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : 0,09 g/m <sup>2</sup> K <sub>2</sub> O: 0,024 g/m <sup>2</sup> + microelementos
En cuaje de frutos	Fetrilon (Mg, B, Cu, Zn, S, Fe, Mn, Mo).	250 cm <sup>3</sup> /100L	Micronutrientes

#### Experimento 2.

Momento	Productos	Aporte
De base	Hidrocomplex (12-11-18 + S:8) 100 kg en 1700 m <sup>2</sup>	N: 0,7 g/m <sup>2</sup> P <sub>s</sub> O <sub>5</sub> : 0,66 g/m <sup>2</sup> K <sub>2</sub> O: 1g/m <sup>2</sup> S:0,48 g/m <sup>2</sup>
Desde el día 60 hasta el día 90	Ácidos Fúlvicos* 12 L en 1700 m <sup>2</sup>	0,007 L/m <sup>2</sup>
Desde el día 50 hasta el día 100	Nitrógeno 25 L	0,015 L/m <sup>2</sup>
Desde el día 50 hasta el día 110	Potasio 148 L	0,087 L/m <sup>2</sup>

\*Ácidos fúlvicos. Son compuestos orgánicos, que poseen poder estimulante en el crecimiento de la raíz. Por esta razón son utilizados como enraizantes. Poseen la capacidad de formar quelatos con otros elementos nutritivos, aumentando su biodisponibilidad para la planta.



#### ANEXO 4: Plan sanitario

##### Experimento 1.

Momento	Producto	Dosis
Una aplicación en fructificación	Trifloxistrobin + Tebuconazole+ Macrosorb foliar (aminoácidos, Boro 0,2 g/L, Manganeso 0,5 g/L, Zinc 0,7 g/L, Nitrógeno total 2,1 % p/p)	50 g/L 250 cm <sup>3</sup> .
A partir de fructificación	Clorfenapir*	50 cm <sup>3</sup> /100 L
	Cartap*	100 g/100 L
	Imidacloprid	90 cm <sup>3</sup> /100 L (2 veces en el ciclo)

\*Se realizaron aplicaciones semanales alternando los productos Clorfenapir y Cartap.

##### Experimento 2.

Momento	Producto	Dosis
A los 40 días	Clorpirifos 50% + Cipermetrina 5%	150 cm <sup>3</sup> /100 L
A los 47 días	Lambda – cialotrina 5% Macrosorb foliar (aminoácidos, Boro 0,2 g/L, Manganeso 0,5 g/L, Zinc 0,7 g/L, Nitrógeno total 2,1 % p/p)	1 cm <sup>3</sup> /L 250 cc
A los 51 días	Deltametrina	10g = 30 cm <sup>3</sup> /100 L
Desde los 55 hasta los 75 días	Sulfato de cobre pentahidratado.	300 cm <sup>3</sup> /100 L
A los 70 días	Mancozeb 80% + Abamectina 1,8%	200 g/100 L
Desde los 77 días hasta los 120 días.	Clorfenapir* Cartap* Imidacloprid	50 cm <sup>3</sup> /100 L 100 g/100 L 90 cm <sup>3</sup> /100 L 2 veces en el ciclo

\*Se realizaron aplicaciones semanales alternando los productos Clorfenapir y Cartap.

Al definir los productos fitoterápicos a utilizar, se tomó la precaución de no usar fungicidas incompatibles con el desarrollo de las MA, acorde con lo recomendado por la empresa Giten, proveedores de las MA comerciales utilizadas en el ensayo.

**ANEXO 5:** Curva de regresión alométrica.

