

Protocolo para Proyecto de Investigación 2013

Titulo del proyecto

Evaluación de Tomate inoculado con *Azospirillum spp* y *Micorrizas spp* en vermicompost + arena bajo condiciones protegidas.

Introducción

Para la agricultura actual reviste gran importancia la preparación de biopreparados conjuntos, de hongos-rizobacterias, que tengan una acción eficaz sobre las plantas y el agroecosistema, siendo además un mecanismo más viable desde el punto de vista económico (Terry y Leyva, 2006).

El uso de micorrizas en la agricultura implica notables efectos beneficiosos tanto en la productividad como en la calidad de los vegetales, a las asociaciones de micorrizas se le han atribuido múltiples funciones, entre las que destacan el mejoramiento de la superficie absorbente del sistema radicular a través de un aumento significativo de ella, aumento a la tolerancia a las toxinas, resistencia a condiciones adversas (sequia, salinidad entre otras), cierta protección contra los patógenos radicales, y como relevante el hongo formador de micorriza abscular capacita y faculta a la planta asociada para incrementar la captación de iones, principalmente fosfatos, la cual puede ser seis veces superior a la que consigan en su ausencia(Mirabay y Ortega, 2008).

Con la inoculación de *Azospirillum* se observa frecuentemente un mayor desarrollo del sistema radical, el cual se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, así como en mayor desarrollo de la parte aérea de las plantas. También se han observado incrementos en el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales en las plantas inoculadas. Una amplia revisión sobre los resultados de los experimentos desarrollados entre los años 1974-1994 fue realizada por Okon y Labandera (1994). Esta evaluación reveló que el éxito de la inoculación fue en el rango del 60 al 70% de los experimentos realizados en suelos y regiones climáticas diferentes con incrementos significativos, generalmente en el rango de 5 a 30%, en el rendimiento de los cultivos.

La interacción entre los componentes de una comunidad microbiana puede manifestarse de diferentes modos, al respecto, hace algunos años se están haciendo intentos aislados para evaluar los sinergismos entre algunas asociaciones de microorganismos del suelo. La interacción entre Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) y Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), puede ser selectiva y dependiente de la bacteria y el hongo implicado (Azcón, 2000).

Algunas especies de bacterias como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Burkolderias*, y *Azospirillum*; han sido estudiadas en su interacción con micorrizas arbusculares (HMA). *Azospirillum sp* en combinación con hongos HMA, produce un incremento significativo en el crecimiento de algunos cultivos, específicamente en cereales, pero el mecanismo responsable es controversial. Algunas veces los incrementos ocurren sin la evidencia de incrementos en la fijación de N o aumentos del contenido de N en las plantas y más bien puede estar relacionado con la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Terry y Leyva 2006).

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) ocupa el tercer lugar en cuanto a volumen de producción mundial ya que es la hortaliza que más se cultiva bajo condiciones protegidas, se consume en todo el mundo y alcanza precios elevados en el mercado internacional en ciertas épocas del año (Márquez *et al.*, 2009).

En México, el tomate es la segunda especie hortícola más importante en cuanto a superficie sembrada, en sistemas protegidos superan las 2000 ha, con rendimientos entre las 100 y 500 ton ha⁻¹ año⁻¹, en función del nivel de tecnificación del invernadero (Sandoval, 2005; SIAP, 2012). A pesar de cultivarse en todos los estados de la República Mexicana, solo siete concentran en promedio 64.3 % de la producción, destacando Sinaloa como el principal productor, seguido de Baja California Norte, Michoacán, Zacatecas, Jalisco, Baja California Sur y San Luis Potosí (SIAP, 2012).

Objetivos

Evaluar la efectividad agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias como sustitutos parciales de la fertilización mineral sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del tomate.

Hipótesis

La coinoculación de micorrizas-rizobacteria en tomate modificara positivamente el crecimiento, desarrollo y el rendimiento del tomate

El desarrollo óptimo de los cultivos demanda una elevada aplicación de fertilizantes minerales y pesticidas. El uso de dichos insumos químicos implica no solo costo y requerimientos energéticos elevados, sino que su aporte indiscriminado pudiera provocar problemas de salinización y contaminación del manto freático. El desarrollo vegetal también puede incrementarse por la utilización de elementos biológicos, que actúan de forma coordinada en la interfase suelo-raíz; entre estos y como factor imprescindible se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares, capaces de colonizar el 95 % de las plantas terrestres. El estudio reciente de la comunidad microbiana asociada a los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) ha contribuido al conocimiento de ellos; se han observado bacterias, hongos filamentosos y levaduras asociadas a las estructuras del HMA. En adición a la bien conocida interacción entre plantas y hongos, las micorrizas ofrecen un excelente nicho ecológico para otros microorganismos (Bonfante, 2003). Los hongos frecuentemente hospedan microorganismos del suelo, los cuales pueden influir de manera beneficiosa en la fisiología y el desarrollo de ellos (Artursson *et al.*, 2006). Los microorganismos pueden ser derivados de la tierra circundante o ser transportados por esporas de hongos. Desde el punto de vista ecológico, muchos estudios muestran que numerosos microorganismos del suelo interactúan con los hongos, promoviendo actividad antagonista, sinérgica o de competencia (Buzzini *et al.*, 2005).

Artursson y Jansson (2003) confirmaron la importancia de las bacterias asociadas a las micorrizas, las que años anteriores Garbaye (1994) había identificado como bacterias que ayudan a la micorrización y las denominó *mycorrhization helper bacteria (MHB)* y propuso cinco mecanismos que explican el comportamiento de las MHB:

Cambios beneficiosos en el suelo rizosférico

Mejoramiento del reconocimiento entre la raíz y el hongo

Incremento de la susceptibilidad de las plantas a la colonización micorrizica

Mejoramiento del estado nutricional del hongo

Estimulación de la germinación de los propágulos del hongo.

Estas poblaciones microbianas tienen un efecto beneficioso en el crecimiento del HMA, no solo porque mejoran la colonización radical y estimulan el crecimiento de la hifa extraradical, sino porque facilitan la germinación de la esporas del HMA. Este efecto ha sido visualizado con *Actinomyces*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y *Bacillus* spp (Xavier y Germida 2023). Después de varias investigaciones, Garbaye y Bowen (1989) señalaron que existían verdaderas bacterias que ayudaban al hongo a adaptarse a vivir en simbiosis, localizándose en la vecindad del hongo en el suelo.

la coinoculación de bacterias y HMA, permite la micorrización temprana lo cual determina a su vez el establecimiento de las rizobacterias y la mejor absorción de elementos solubilizados por ellas (Zambrano y Díaz 2008).

Procedimiento Experimental

Descripción del área de estudio. El trabajo experimental se realizara en el invernadero de 200 m² con cubierta plástica, piso de grava y sistema de enfriamiento automático con pared húmeda y dos extractores, en el ciclo Invierno-verano 2013, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna (UAAAN-UL) situada en 101° 40' y 104° 45' de longitud oeste y los paralelos 25° 05' y 26° 54' de latitud norte en Torreón, Coahuila. Esta región recibe una precipitación media anual de 235 mm, tiene una altitud 1.139 m.s.n.m. y su temperatura media anual es de 18,6°C

Diseño experimental. El diseño experimental será de bloques al azar con dos repeticiones con 24 submuestras en cada repetición por tratamiento; los tratamientos serán los siguientes: 1.- Composta y perlita, 2.- Composta y perlita + *Azospirillum*, 3.- Composta y perlita + Micorriza, 4.- Composta y perlita + *Azospirillum* + Micorrizas y 5.- Arena con solución nutritiva, el *Azospirillum* será a la siguiente siguiente concentración de 10⁹ ufc ml⁻¹ de la bacteria, las *Micorrizas* será de un 1 gr/planta, utilizando el híbrido de tomate Rafaelo. A cada maceta se le aplicara te de vermicompost al 10%. La unidad experimental estará compuesta por una maceta, con una planta por maceta y con 24 repeticiones. Se utilizaran bolsas de plástico de 18 L de capacidad y se acomodaran en doble hilera, con arreglo en tresbolillo y separación entre hileras de 1.6 m, para una densidad de 4 plantas m⁻².

El té de composta se elaborará de acuerdo a la metodología de Edwards *et al.* (2010), como se describe a continuación: para eliminar el exceso de cloro que se utiliza para potabilizar el agua, en un tambo de 100 litros se colocaran 60 litros de agua y se generará turbulencia durante tres horas con una bomba de aire. Luego, se colocará 6 kilos de composta en una bolsa de plástico tipo red y se colocara la bolsa con la composta dentro del tanque con agua previamente aireada. Finalmente se agregará 40 gr de piloncillo como fuente de carbono soluble, 15 mililitros de una fuente de nitrógeno, fósforo y potasio orgánico (GREGALIS®, 8 % N, 10 % P, 8 % K, Agroquímicos Versa S. A. de C. V.). La mezcla se dejará fermentar por 24 horas con la bomba de aire encendida. Se aplicará 500 mililitros de té de vermicompost a cada maceta sin diluir con este tratamiento. Por otra parte, para satisfacer las necesidades nutritivas

del tratamiento testigo, se consideraran cuatro etapas de desarrollo del cultivo: a) 1^{er} Cuaje, b) 1^{er}-3^{er} Cuaje, c) 3^{er}-5^o Cuaje y d) >5^o Cuaje. La composición de la solución nutritiva empleada (Tabla 1) fue la recomendada por Castellanos y Ojodeagua (2009).

Tabla 1. Concentración de la solución nutritiva utilizada para producir tomate bajo invernadero.

Ion	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
	1 ^{er} Cuaje	1 ^{er} - 3 ^{er} Cuaje	3 ^o - 5 ^o Cuaje	> 5 ^o Cuaje
mmol L ⁻¹				
NO ₃ ⁻	6	8	10	12
NH ₄ ⁺	0-0.5	0-0.5	0.05	0.5
H ₂ PO ₄ ⁻	1.5	1.5	1.5	1.5
K ⁺	3.5	5.5	7	8.5
Ca ²⁺	4	4	4	4.5
Mg ²⁺	1	1.5	2	2
SO ₄ ²⁻	1.5 a 3	1.5 a 3	1.5 a 3	1.5 a 4
HCO ₃ ⁻	1	1	1	1
Na ⁺	<5	<5	<5	<5
Cl ⁻	1 a 3	1 a 3	3 a 5	3 a 5
CE	1.4	1.8	2.2	2.4

[†]CE = conductividad eléctrica.

Se utilizará un sistema de riego manual diario con solución nutritiva en arena y te de compost en los tratamientos de compost + perlita; el volumen por día variará con la etapa del cultivo, de 300 mL por maceta en la etapa de trasplante a inicio de floración, a 1900 mL de floración a la cosecha.

Las plantas de tomate se podaran a un tallo principal, el cual será sostenido con hilo rafia de la parte superior del invernadero. La polinización se realizará diariamente entre las 12:00 y 13:00 h de manera mecánica con un vibrador eléctrico, al inicio de la apertura de las flores.

Variables a evaluar.

Altura de planta total (APT), número de hojas en la planta (NHP), área foliar (AF), diámetro de tallo (DT), peso del fruto (PF), diámetro polar (DP), diámetro ecuatorial (DE), rendimiento total (RT), espesor de pulpa (EP), número de lóculos por fruto (NLF), materia seca aérea (MSA), índice de cosecha (IC), temperatura del aire (TA), humedad relativa (HR), capacidad antioxidante (CA) y contenido fitoquímico del fruto.

Análisis estadístico. Los datos se someterán al análisis de la varianza (ANDEVA) apropiado para el diseño. En la comparación de medias se utilizará la prueba de Tukey al 5 %. Para el análisis estadístico y la prueba de Tukey se utilizará el programa SAS para Windows V. 8 (SAS, 1998).

Cronograma de actividades.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Siembra de charolas en invernadero	x											
Trasplante de las plántulas		x										
Toma de datos agronómicos		x	x	x								
Toma de datos agronómicos		x	x	x	x	x						
Análisis e interpretación de datos						x	x					

5.-Productos esperados

- 2. Ponencias en Congresos
- 2: Publicaciones en revistas con arbitraje

6.-Literatura citada

- Artursson, V.; R. D. Finlay, y J. K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, , vol. 8, p. 1-10.
- Artursson, V. y J. K. Jansson. 2003 Use of Bromodeoxyuridine immunocapture to identify active bacteria associated with arbuscular mycorrhizal hyphae. *Applied and Environmental Microbiology*, , p. 6208-6215.
- Azcon R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. *In: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-Prensa, Mexico. 15 p.
- Bonfante, P. 2003 Plants, mycorrhizal fungi and endobacteria: dialog among cells and genomes. *Biol. Bull*, , vol. 204, p. 215-220.
- Buzzini, P.; C. Gasparetti, B. Turchetti, M. R. Cramarossa, V. A. Martini, U. M. Pagnoni, y L. Forti, L. 2005 . Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Arch microbial.*, vol. 184, p. 187-193.
- Castellanos, J. Z.; Ojodeagua, J. L. 2009. Formulación de la solución nutritiva. P 131-156. *In: Manual de producción de tomate en invernadero*. J. Z Castellanos (Ed.). Intagri. México.
- Edwards C. A., A. Askar., M. Vasko-Bennet., and N. Arancon. 2010. The Use and Effects of Aqueous Extracts from Vermicompost or Teas on Plant Growth and Yields. P 235 – 248. *In: Vermiculture Technology*, ed. C.A. Edwards, N. Arancon and R. Sherman (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL
- Garbaye, J. T. 1994. Review No.76. Helper Bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, , vol. 128, no. 2, p. 197-210.
- Garbaye, J. y Bowen, G. D. 1989 Stimulation of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, , vol. 112, p. 383-388.
- Márquez, H. C., P. Cano R., N. Rodríguez, A. Moreno R., E. de la Cruz L., J. L. García H., P. Preciado R., G. Castañeda G. y C García P. 2009. Producción en invernadero de tomate orgánico. *In: I Simposio de Producción Moderna de Melón y Tomate*. XIII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Torreón Coahuila. México. p.1-24.
- Mirabay, L. A. y E. Ortega. 2008. Comunidad microbiana asociada a los hongos micorrizógenos arbusculares (hma). *Cultivos tropicales*, 29 (4). pp. 13-20.
- Okon, y C. A. Labandera Gonzalez. 1994. agronomic applications of *azospirillum*—an evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. *soil biol. biochem.* 26:1591-1601
- Sandoval, v. m. 2005. Densidad de plantas. un dilema técnico en la producción de tomate rojo en hidroponía e invernaderos. *Productores de hortalizas. Especial de tomate. Número especial.* p. 14-17.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2012. Producción de jitomate rojo. [Fecha de consulta: 14 de diciembre de 2012] Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/>
- Terry, A. E. y G. A. Leyva. 2006. Evaluación agro biológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73.
- Xavier, L. J. C. y J. J: Germida. 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity.

Soil Biol. Biochem., , vol. 35, p. 471-478.

Zambrano, J. A. y L. A. Díaz. 2008. Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. *Univ. Sci.* [online]. 2008, vol.13, n.2 [cited 2012-12-14], pp. 162-170 . Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-7483>.