



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TITULO:**

**Evaluación de consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de

Ingeniero Agrónomo

**AUTOR:**

Ortiz Navos Washington Benigno

C.I 0350003174

Correo electrónico: [benigno.on95@gmail.com](mailto:benigno.on95@gmail.com)

Yunga Quizhpe Tania Elizabeth

C.I 0106044936

Correo electrónico: [taniaely94@hotmail.com](mailto:taniaely94@hotmail.com)

**DIRECTOR:**

Ing. Eduardo José Chica Martínez, Ph. D

C.I 0912795101

CUENCA, ECUADOR

24/08/2020



## **RESUMEN**

El adecuado funcionamiento de los sistemas agrícolas depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, ya que los microorganismos son los protagonistas de diversas acciones benéficas para las plantas a las que se asocian. El objetivo de este estudio fue, evaluar consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero. El ensayo se realizó en el invernadero de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Se implementó un diseño experimental de Bloques al Azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones, con un arreglo factorial (3 x 2 x 2). Se evaluaron los siguientes factores: factor A, tres sustratos (Suelo mineral, Suelo mineral más Biocarbono y suelo mineral más materia orgánica); factor B, inoculación de los consorcios microbianos (con y sin inoculación) y factor C constituido por la cobertura de mulch de plástico (con y sin cobertura). Las variables de respuesta fueron altura de la planta, diámetro del tallo, tasa de emisión foliar, densidad estomática, conductancia estomática, contenido relativo de agua, contenido de clorofila, contenido de nitrato en la sabia, pH, C.E y D.A. Por último, se caracterizó la estructura y la composición de consorcios funcionales de microorganismos mediante un análisis de DGGE de bacterias y hongos del suelo. Con los datos se realizó un ANOVA, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas a nivel de las comunidades microbianas antes y después de la aplicación de las mismas. Así también al analizar las propiedades físico-químicas del suelo muestreado, no hubo cambios significativos, es decir se registraron resultados similares.

**Palabras Clave:** Biocarbono, Consorcios microbianos, Mulch, Análisis DGGE.



## **ABSTRACT**

The proper functioning of agricultural systems depends largely on the microbial activity of the soil, since microorganisms are the protagonists of various beneficial actions for the plants with which they are associated. The objective of this study was to evaluate microbial consortiums designed on the development of tomato cultivation (*Solanum lycopersicum*) under greenhouse. The test was carried out in the greenhouse of Plant Physiology of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cuenca. An experimental design of Random Blocks was implemented with 12 treatments and five repetitions, with a factorial arrangement (3 x 2 x 2). The following factors were evaluated: factor A, three substrates (Mineral soil, Mineral soil plus Biocarbon and mineral soil plus organic matter); factor B, inoculation of microbial consortia (with and without inoculation) and factor C consisting of plastic mulch coverage (with and without coverage). The response variables were plant height, stem diameter, leaf emission rate, stomatic density, stomatic conductance, relative water content, chlorophyll content, nitrate content in the sage, pH, C.E and D.A. Finally, the structure and composition of functional consortia of microorganisms was characterized by a DGGE analysis of bacteria and soil fungi. With the data an ANOVA was performed, the results obtained did not show significant differences at the level of the microbial communities before and after their application. Also, when analyzing the physicochemical properties of the sampled soil, there were no significant changes, that is, similar results were recorded.

**Keywords:** Biocarbon, Microbial Consortiums, Mulch, DGGE Analysis.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>TABLA DE CONTENIDOS .....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Objetivo general del proyecto (OG) .....	19
3.2. Objetivos específicos (OE) .....	19
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
5.1. Diversidad y funcionalidad de microorganismos en suelos agrícolas .....	20
5.2. Efectos de la actividad microbiana del suelo en el desarrollo de los cultivos .	22
5.3. Aplicación comercial de microorganismos benéficos (o consorcios) en cultivos .....	24
5.4. Efectos de la aplicación de microorganismos y bioproductos en el cultivo de tomate.....	26
5.5. Microorganismos utilizados en el diseño de consorcios microbianos .....	28
5.6. Electroforesis en gradiente con gel desnaturalizantes para el estudio de diversidad de comunidades microbianas .....	31
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
6.1. Área de estudio .....	33
6.2. Metodología de la investigación .....	34
6.2.1. Semillero.....	34
6.2.2. Trasplante .....	34
6.3. Metodología para los parámetros fisiológicos .....	35
6.3.1. Índice de crecimiento y desarrollo.....	35
6.3.2. Índices de estado hídrico .....	36
6.3.3. Índice nutricional.....	37
6.4. Metodología para los parámetros Agronómicos.....	38
6.4.1. Propiedades físicas - químicas del sustrato .....	38



6.5.	Metodología para el análisis molecular .....	39
6.5.1.	Extracción y purificación del ADN metagenómico .....	39
6.5.2.	Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	40
6.5.3.	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) .....	43
6.6.	Determinación de índices de diversidad de comunidades microbianas. ....	44
6.7.	Determinación de la composición de comunidades microbianas. ....	44
6.8.	Diseño experimental .....	45
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
7.1.	Propiedades físicas - químicas del suelo.....	47
7.2.	Índices de crecimiento y desarrollo .....	51
7.3.	Índices de estado hídrico.....	54
7.4.	Índices nutricionales .....	58
7.5.	Propiedades biológicas del suelo .....	63
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
9.1.	Conclusiones .....	71
9.2.	Recomendaciones .....	72
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Descripción de los respectivos tratamientos .....	34
<b>Tabla 2:</b> Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores de la región ITS. ....	41
<b>Tabla 3:</b> Concentraciones de reactivos para PCR anidada con cebadores para la región ITS .....	41
<b>Tabla 4:</b> Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores para el gen 16S .....	42
<b>Tabla 5:</b> Normalidad y Homogeneidad de varianzas .....	47
<b>Tabla 6:</b> ANOVA de la variable pH.....	48
<b>Tabla 7:</b> ANOVA de la variable CE.....	49
<b>Tabla 8:</b> ANOVA de la variable Densidad Aparente del muestreo inicial y final del cultivo .....	50
<b>Tabla 9:</b> ANOVA de la variable altura.....	52
<b>Tabla 10:</b> ANOVA de la variable diámetro del tallo.....	53
<b>Tabla 11:</b> ANOVA de la variable emisión foliar.....	54
<b>Tabla 12:</b> ANOVA de la variable densidad estimativa del final del estado vegetativo del cultivo .....	55
<b>Tabla 13:</b> ANOVA de la variable densidad estomática de la primera cosecha del cultivo .....	55
<b>Tabla 14:</b> ANOVA de la variable conductancia estimativa del final del estado vegetativo del cultivo.....	56
<b>Tabla 15:</b> ANOVA de la variable conductancia estomática de la primera cosecha del cultivo .....	57
<b>Tabla 16:</b> ANOVA de la variable contenido relativo de agua del final del estado vegetativo del cultivo.....	58
<b>Tabla 17:</b> ANOVA de la variable contenido relativo de agua de la primera cosecha del cultivo .....	58
<b>Tabla 18:</b> ANOVA de la variable índice de contenido de clorofila del final del estado vegetativo del cultivo.....	59
<b>Tabla 19:</b> ANOVA de la variable índice de contenido de clorofila de la primera cosecha del cultivo.....	59
<b>Tabla 20:</b> ANOVA de la variable concentración de nitrato en la savia del final del estado vegetativo del cultivo .....	61
<b>Tabla 21:</b> ANOVA de la variable concentración de nitrato en la savia de la primera cosecha del cultivo.....	61
<b>Tabla 22:</b> ANOVA de la variable rendimiento del cultivo de tomate .....	62
<b>Tabla 23:</b> Riqueza de bacterias al inicio y fin de cada uno de los tratamientos. ....	63
<b>Tabla 24:</b> Riqueza de hongos al inicio y fin de cada uno de los tratamientos.....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ubicación a nivel provincial, cantonal y parroquial del área de estudio .....	33
<b>Figura 2:</b> Mapa de la distribución de los tratamientos .....	46
<b>Figura 3:</b> pH del suelo del muestreo inicial y final del cultivo .....	48
<b>Figura 4:</b> CE del suelo del muestreo inicial y final del cultivo .....	49
<b>Figura 5:</b> Densidad Aparente del suelo del muestreo inicial y final del cultivo .....	50
<b>Figura 6:</b> Altura de las plantas de tomate .....	51
<b>Figura 7:</b> Diámetro del tallo de las plantas de tomate .....	52
<b>Figura 8:</b> Emisión foliar de las plantas de tomate durante su ciclo de producción ( 14 semanas) .....	53
<b>Figura 9:</b> Densidad estomática de las plantas de tomate .....	54
<b>Figura 10:</b> Conductancia estomática de las plantas de tomate .....	56
<b>Figura 11:</b> Contenido relativo de agua de las plantas de tomate .....	57
<b>Figura 12:</b> Índice de contenido de clorofila de las plantas de tomate .....	59
<b>Figura 13:</b> Contenido de nitrato en la sabia cultivadas bajo distintos tratamientos. ....	61
<b>Figura 14:</b> Rendimiento por planta de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) cultivadas bajo distintos tratamientos. ....	62
<b>Figura 15:</b> Dendograma de bacterias (16s) de acuerdo al índice de similitud de jaccard .....	64
<b>Figura 16:</b> Dendograma de bacterias (16s) de acuerdo al índice de similitud de jaccard. ....	65
<b>Figura 17:</b> Dendograma de hongos (ITS) de acuerdo al índice de similitud de jaccard	66
<b>Figura 18:</b> Dendograma de hongos (ITS)) de acuerdo al índice de similitud de jaccard .....	66



## **ÍNDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 1:</b> Protocolo de extracción de ADN de suelos.....	79
<b>Anexo 2:</b> Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante. ....	80
<b>Anexo 3:</b> Perfil de diversidad de la región ITS de hongos con gradiente desnaturalizante. ....	80
<b>Anexo 4:</b> Inoculación del consorcio microbiano en cada uno de los tratamientos. ....	81
<b>Anexo 5:</b> Toma de datos de las variables del índice de crecimiento y desarrollo. ....	81
<b>Anexo 6:</b> Toma de datos de las variables del índice hídrico y nutricional de cada uno de los tratamientos.....	82
<b>Anexo 7:</b> Análisis de laboratorio de las variables pH y CE. ....	83
<b>Anexo 8:</b> Extracción de ADN y amplificación por electroforesis en gel de agarosa.....	84
<b>Anexo 9:</b> Equipos utilizados en el laboratorio para PCR y DGGE.....	84



## **ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA**

**C.E:** Conductividad eléctrica.

**D.A:** Densidad aparente.

**DGGE:** Gel con gradiente desnaturalizante.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**UTUS:** unidades taxonómicas operacionales

**μM:** Micrómetro

**ng:** Nanogramo

**μl:** Microlitro

**pb:** Pares de bases



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

**Washington Benigno Ortiz Navos** en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “**Evaluación de consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero**”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de agosto del 2020

---

Washington Benigno Ortiz Navos

C.I: 0350003174



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

**Tania Elizabeth Yunga Quizhpe** en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 24 de agosto del 2020

A handwritten signature in blue ink that reads 'Tania Yunga'.

---

Tania Elizabeth Yunga Quizhpe

C.I: 0106044936



Cláusula de Propiedad Intelectual

---

**Washington Benigno Ortiz Navos**, autor/a del trabajo de titulación “**Evaluación de consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 24 de agosto del 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to be 'Washington Ortiz Navos' with a superscript '2' above the 'O' in 'Ortiz'.

---

Washington Benigno Ortiz Navos

C.I: 0350003174



Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Tania Elizabeth Yunga Quizhpe, autor/a del trabajo de titulación “Evaluación de consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 24 de agosto del 2020

A handwritten signature in blue ink that reads "Tania Yunga".

---

Tania Elizabeth Yunga Quizhpe

C.I: 0106044936



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por iluminar siempre el camino que conduce a cada una de nuestras metas, darnos la sabiduría para enfrentar las dificultades y oportunidades que se nos presentan a lo largo de nuestras vidas.

A nuestros padres: Washington y Mercedes, Eduardo y María porque gracias a su amor, trabajo, constancia y sacrificio que todos estos años nos han dedicado, hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos, siendo un orgullo y privilegio ser sus hijos.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de nuestra preparación universitaria, de manera especial, al Dr. Eduardo Chica, director de nuestra tesis de investigación quien ha guiado con su paciencia y conocimiento nuestro trabajo.

Ortiz Washington; Yunga Tania



## **DEDICATORIA**

La presente tesis de grado está dedicada a todas las personas que nos han apoyado a lo largo de esta etapa, en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos y amistad

A nuestros padres, por apoyarnos en el transcurso del camino, porque somos el reflejo de sus interminables luchas, esfuerzos y sobretodo amor que día con día dedicaron para que nosotros, sus hijos, logremos lo que alguna vez para ellos fue un sueño, porque los triunfos nacen cuando nos atrevemos a soñar y no nos dejamos vencer por los obstáculos para así llegar a ser alguien en la vida.

Ortiz Washington; Yunga Tania



## **1. INTRODUCCIÓN**

A nivel mundial el tomate riñón es el segundo cultivo hortícola más importante después de la papa. Puede ser cultivado a campo abierto o en invernadero, siendo esta última la práctica más común debido a que permite extender el ciclo de producción (SIPA, 2016).

Por ser una hortaliza de consumo masivo, su popularidad aumenta debido a su alta producción y rentabilidad (Pichisaca, 2003). Sin duda, esta alternativa es un rubro significativo en la economía actual de las familias campesinas ecuatorianas, por lo que se encuentra en casi todas las provincias del Ecuador, localizándose su máxima concentración de superficie en las provincias de Manabí y el Guayas (Álvarez et al., 2014). Mientras que en la sierra ecuatoriana las provincias con mayor superficies sembradas son Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Azuay y Loja (SIPA, 2016).

Es así que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2017, menciona que en una superficie de 1,954 hectáreas se produjeron 62,675 toneladas de tomate fresco en el Ecuador. Por otro lado, el Sistema de Información Pública Agropecuaria SIPA (2018) afirma que en el Ecuador existían 1,606 hectáreas sembradas de tomate de mesa. Con estos datos podemos obtener que el rendimiento promedio de tomate de mesa en el Ecuador es de 20.62 toneladas por hectárea.

Sin embargo, ante la importancia de este cultivo a nivel nacional, el agricultor ha sido obligado a la adopción de prácticas agronómicas que aumenten la eficiencia y aporten un mayor rendimiento en los cultivos como por ejemplo el uso de pesticidas y fertilizantes



de síntesis químicos. No obstante, el mal uso y manejo de estos pueden conllevar a provocar un agotamiento significativo del suelo.

Asimismo, estos productos sintéticos pueden ocasionar cambios en la composición vegetal, pérdida de fertilidad y la disminución de la materia orgánica (Izquierdo, 2017). A su vez, estas características del suelo son importantes para mantener la vida de las comunidades microbianas del suelo. Las mismas que cumplen funciones importantes dentro de la salud de los ecosistemas (Olalde & Aguilera, 1998).



## 2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los puntos críticos que afectan la sostenibilidad de la agricultura es el mal manejo de diversas prácticas agrícolas, tales como riego, rotación de cultivos, la labranza y el uso de productos de síntesis química. De esta manera ha sido necesario adoptar estas tecnologías para la obtención de una buena producción y rendimiento de alta calidad. Por lo que es necesario utilizar grandes cantidades de estos productos de síntesis química. Siendo esto un gran problema a nivel mundial, ya que su aplicación continua e indiscriminada conlleva a la degradación de la calidad del suelo perjudicando el adecuado desarrollo de las plantas, lo cual reduce eventualmente los rendimientos agrícolas (Núñez, 2016).

Debido a lo anterior, se está dando mayor importancia al uso de alternativas que permitan recuperar los suelos, de tal forma que se logre una producción óptima sin deterioro del medio. Por lo cual la utilización y el aprovechamiento potencial microbiológico del suelo es necesario para reducir el uso de productos de síntesis y de esta manera mejorar el desarrollo y la sostenibilidad integral del sistema agrícola (Gutiérrez et al., 2014). Permitiendo obtener una producción a bajo costo, que no contamine el medio ambiente y que mantenga la fertilidad y la biodiversidad del suelo.

Es así que, la presente investigación, pretende evaluar el desempeño vegetal en suelos enriquecidos con comunidades microbianas diseñadas en tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) y observar su comportamiento agronómico mediante la inoculación de comunidades microbianas que constituyen una alternativa para la denominada intensificación sostenible, debido a que aumenta la productividad de los cultivos reduciendo el aporte de insumos y favoreciendo la sustentabilidad agrícola.



Estos microorganismos influyen directamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que aportan fuentes de C y N (Ferrera & Alarcón, 2001). Además, cumplen un papel importante en la estructuración y formación del suelo y en la movilización de nutrientes en donde cada tipo de organismo efectúa una función específica (Asociación Vida Sana, 2014). Permitiendo la disminución de los niveles de fertilización y pesticidas de síntesis químicas (Tolosa & Lizarazo, 2014).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general del proyecto (OG)**

Evaluar consorcios microbianos diseñados sobre el desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo invernadero

#### **3.2. Objetivos específicos (OE)**

Evaluar las características agronómicas y fisiológicas del cultivo de tomate de mesa cultivado en sustratos inoculados con los consorcios.

Caracterizar la dinámica de establecimiento y estabilidad de consorcios funcionales de microorganismos bajo condiciones del cultivo de tomate.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existen diferencias en las propiedades fisiológicas del cultivo de tomate riñón y agronómicas del suelo antes y después de la inoculación de consorcios microbianos diseñados?



## **5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **5.1. Diversidad y funcionalidad de microorganismos en suelos agrícolas**

El suelo representa el hábitat apropiado para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, entre los que se incluyen algas, hongos, actinomicetos y bacterias. Estos microorganismos, junto a los componentes de la micro fauna, forman la llamada micro biota del suelo. En donde la actividad y diversidad del micro biota condiciona la fertilidad del suelo, la estabilidad y funcionamiento de ecosistemas naturales y los agroecosistemas (López et al., 2015)

López et al. (2015), mencionan que la gran diversidad microbiana es esencial para garantizar el reciclaje de los nutrientes y los procesos de descomposición del material vegetal en cualquier ecosistema terrestre. Debido a los procesos biológicos como la oxidación, la reducción, la descomposición de la materia orgánica y la mineralización, así como las interacciones intraespecíficas e interespecíficas que se establecen en el suelo.

La población de microorganismos del suelo está entre uno y 100 millones de microorganismos presentes por gramo de suelo, siendo las bacterias y hongos los más predominantes, generando relaciones benéficas entre la diversidad microbiana, el funcionamiento y conservación de los suelos, la calidad de las plantas y la sostenibilidad de los ecosistemas. Por lo tanto, el funcionamiento de estos ecosistemas han demostrado que los microorganismos forman un gran conjunto de interacciones entre suelo y la raíz que da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio (Pedraza et al., 2010).



Según Barea, Azcón & Aguilar (2005) citados por Pedraza et al. (2010) menciona que la mayoría de los estudios microbiológicos de la rizósfera se han centrado su atención en bacterias y hongos, especialmente aquellos que describen interacciones microbianas cooperativas. De acuerdo con sus funciones, estos se han agrupado en degradadores de residuos orgánicos, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, hongos y bacterias antagonistas de patógenos de raíces. Algunos de estos microorganismos, los endofíticos, colonizan internamente los tejidos radicales y desarrollan actividades dentro de la planta que influyen la promoción del crecimiento y protección vegetal. Algunos de ellos son simbiontes mutualistas de las plantas y entre los más importantes se incluyen a las bacterias fijadoras de nitrógeno y a los hongos micorrícicos.

Es así que en un análisis realizado por la FAO (2015), menciona que los organismos del suelo son elementos fundamentales en los ciclos de nutrientes, regulando así la dinámica de la materia orgánica del suelo, la captación de carbono y las emisiones de gases de efecto invernadero, modificando la estructura física del suelo y los regímenes hídricos, aumentando el volumen y eficiencia de la absorción de nutrientes por la vegetación mediante relaciones mutuamente beneficiosas y mejorando la salud vegetal. Estos servicios son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas naturales y constituyen un recurso importante para la gestión sostenible de los sistemas agrícolas. De tal forma que las raíces de las plantas produzcan exudaciones de sustancias pertinentes, para que alrededor de sus rizósferas se desarrollen los microorganismos que más les benefician en la captación de agua y los nutrientes que necesitan para desarrollarse. Además, que actúan como un sistema inmune que las defienden de los patógenos. Es así que sus exudados atraen a sus mejores socios, intentado eliminar de su entorno a los más nocivos (Ibáñez, 2018).



## **5.2. Efectos de la actividad microbiana del suelo en el desarrollo de los cultivos**

Las bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) promueven el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos, tanto directos como indirectos, al tiempo que inducen la resistencia sistémica de las plantas tanto a estreses bióticos (ataques de patógenos) como abióticos (sequía, salinidad, temperatura, contaminantes, etc.) (Benjumeda, 2017).

Los mecanismos indirectos pueden incluir aquellos en los que las bacterias producen antibióticos y otros metabolitos con efecto antagónico hacia los fitopatógenos (Angulo et al., 2014). Por otro lado, los directos son aquellos en los que las bacterias tienen un impacto directo en el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la síntesis de sustancias fitoestimulantes (auxinas, gibelinas, citoquininas, ácido indoleacético y etileno) y la excreción de compuestos orgánicos volátiles (acetona, compuestos de azufre, etc.) (Benjumeda, 2017).

Por otra parte, las micorrizas arbusculares han sido ampliamente descritas como favorecedoras del crecimiento vegetal. La colonización micorrízica produce cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las raíces que conducen a un mejor estado general de la planta y contribuyen a aliviar las situaciones de estrés de carácter abiótico (metales pesados, salinidad) y bióticos (ataques de patógenos, cambios microbianos en la rizósfera) (Grageda et al., 2012).

De tal forma que Grageda et al. (2012) indican que los biofertilizantes son productos realizados a base de microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas ayudando a su nutrición y protección. Estos



microorganismos benéficos se encuentran de forma natural en el suelo y forman parte de una gran diversidad de grupos. Además, los biofertilizantes incrementan el abastecimiento de los nutrimentos por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de  $N_2$ , la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos. Armenta Bojorquez et al. (2010) menciona que la utilización de cepas nativas de microorganismos benéficos en la elaboración y fabricación de biofertilizantes, presentan mayores posibilidades de efectividad en el campo, por estar adaptados a las condiciones del suelo de cada región.

También se dice que los biopesticidas son microorganismos benéficos que controlan naturalmente a otros microorganismos o a insectos que se encuentran en cantidades que pueden causar reducciones de rendimiento. Por ende, hay algunos que son específicos para una determinada plaga, aunque la mayoría de los biopesticidas son genéricos y controlan a muchas especies. Por ejemplo, *Trichoderma sp* o *Bacillus subtilis* son microorganismos que controlan muchos tipos de hongos y bacterias (Abecasis, 2018). Sin embargo, las poblaciones de los microorganismos que interactúan como biofertilizantes y biopesticidas son afectados por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos.

Por ende, para poder aprovechar al máximo el potencial microbiológico del suelo es necesario realizar un análisis de sustentabilidad. Donde se requiere de un conocimiento detallado de las interrelaciones que se presentan entre los microorganismos seleccionados incorporados (inoculantes) frente a la compleja comunidad microbiana natural que habita ese microambiente; en este sentido, el mantenimiento de la viabilidad, diversidad de la población y el funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo es esencial para



la agricultura sustentable. Esto se debe a que la fertilidad de un suelo no sólo depende de la composición química, sino también de la naturaleza cualitativa y cuantitativa de los microorganismos que habitan en él (Pedraza et al., 2010).

### **5.3. Aplicación comercial de microorganismos benéficos (o consorcios) en cultivos**

En la agricultura los productos comerciales que están constituidos a base de microorganismos son considerados como bioinsumos. Que son productos de origen biológico, formulados con microorganismos (ej. bacterias, hongos, virus) o con compuestos bioactivos microbianos. Los cuales son utilizados para mejorar la productividad, la calidad y la salud de las plantas, o las características biológicas del suelo. Para realizar una formulación de un bioinsumo, las cepas o metabolitos microbianos son seleccionados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal: de forma directa facilitando la asimilación de nutrientes por la planta o indirecta contribuyendo al manejo sanitario de plagas y enfermedades de impacto económico. Por otra parte, tenemos que los bioinsumos también poseen otras denominaciones alternativas como inoculantes, agentes microbianos de control biológico, bioplaguicidas, entre otros. Cabe destacar que muchas veces una misma cepa microbiana puede interactuar al mismo tiempo como un biofertilizante o biocontrolador (INIA, 2012).

Por tal razón Lira (2018) menciona que existe una gran diversidad de microorganismos utilizados en la agricultura, estos puede ser:

- Fijadores biológicos de nitrógeno como: *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Azotobacter sp.* y *Azospirillum sp.*



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Los solubilizadores de fósforo como: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.*
- Movilizadores de fosfatos como: hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), destacando *Rhizophagus sp.*, *Endogone sp.*, *Gigaspora sp.*, *Acaulospora sp.* y *Scutellispora sp.*
- Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) como: *Pseudomonas sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*, *Azospirillum*, *Streptomyces sp.* y *Xanthomonas sp.*

Además, la producción de bioinsumos se realiza en países desarrollados donde es una práctica adoptada. Se fabrican por empresas gubernamentales o privadas en donde los inoculantes son inocuos y se requiere de un cuidadoso manejo para no disminuir su efectividad (Grageda et al., 2012). Estos productos son elaborados como cualquier otro fertilizante, pueden formularse como concentrado soluble, suspensión concentrada, polvo soluble, polvo mojable o microcápsulas (Soriano, 2012).

Algunos se aplican al suelo directamente antes o después de la siembra del cultivo, mediante aspersión o en el surco de siembra o sobre toda la superficie. Otros se mezclan con la semilla. También existen productos para ser aplicados al follaje. Las dosis y épocas de aplicación durante todo el ciclo del cultivo dependerán de las instrucciones del fabricante del producto y de las concentraciones (Asociación Vida Sana, 2014).

Una de sus limitaciones es que cuestan más y la productividad se ve disminuida al corto plazo, pero la inversión se ve compensada por el aumento en la productividad a largo plazo ya que debe de pasar por un proceso de transición. Tampoco pueden exponerse prolongadamente al sol y algunos incluso requieren refrigeración para su



almacenamiento. Otra limitación es que deben de aplicarse a ciertas horas para mejorar su efectividad y requiere que el suelo tenga una cierta humedad todo el tiempo para que los microorganismos puedan seguir vivos (García, 2017).

#### **5.4. Efectos de la aplicación de microorganismos y bioproductos en el cultivo de tomate**

Poulton, Bryla, Koide & Stephenson (2002), menciona que la aplicación de micorrizas como *Glomus clarum* y *Azospirillum brasilense* en el cultivo de tomate aumenta el número total de flores y la producción de frutos por planta. Permitiendo obtener mayor rendimiento.

Además, Hernández & Chailloux (2004) afirma que la inoculación con *Glomus mosseae* y *Glomus fasciculatum* en plántulas de tomate permiten modificar la arquitectura del sistema radicular a través del desarrollo de las hifas en el suelo. De esta manera transfiere hacia la planta elementos minerales, agua y otras sustancias importantes para el crecimiento vegetal.

Mientras que en un estudio realizado por Terry & Leyva (2006) señala que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), estimulan positivamente el crecimiento de las plantas. Permitiendo contribuir en el estado nutricional de las mismas y generando de esta manera incrementos en el rendimiento y en la eficiencia de la fertilización nitrogenada.

Por otra parte en un estudio realizado por Vera (2010), menciona que las plantas de tomate tratadas con micorrizas se desarrollan mejor que las nutridas químicamente, ya



que las micorrizas indujeron un mayor número de hojas, diámetro de tallo, peso de biomasa húmeda, peso de biomasa seca y precocidad de floración.

Además Simbaqueba (2015), reporta que algunas cepas de *Trichoderma spp.* son capaces de inducir resistencia sistémica en tomate (*Solanum lycopersicum*) frente a un amplio espectro de patógenos y promueven el crecimiento vegetal. Estos fenómenos proveen un importante mecanismo por el cual es posible mejorar la producción del tomate sin recurrir a mayores aplicaciones de insumos y plaguicidas.

Igualmente en plantas de tomate injertadas para lograr mayor resistencia a la salinidad, el uso de portainjertos inoculados con hongos micorrícicos arbusculares incrementó el rendimiento total y comercial, además de mejorar parámetros de calidad como el aumento de los contenidos de vitamina C y la disminución de la acidez (Medina, 2016).

Finalmente Oseas & Antonio (2017) realizaron un análisis donde el uso de los microorganismos estimula positivamente el crecimiento, desarrollo y rendimiento en el cultivo del tomate a partir de una alta colonización. Este resultado apoya el criterio de selección de esta especie como una alternativa eficiente para la producción del cultivo del tomate.



### 5.5. Microorganismos utilizados en el diseño de consorcios microbianos

Un consorcio microbiano es básicamente un grupo de microorganismos que se aplican juntos con la intención de que su acción en conjunto produzca algún efecto beneficioso tanto en el suelo como en la planta. Por ende, en este trabajo se utilizó los siguientes microorganismos:

- ***Trichoderma spp***

Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo, y se encuentran naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (Martinez et al., 2013). Además, las especies de *Trichoderma* no son exigentes con relación al pH del sustrato. Pueden crecer en suelos con pH desde 5,5 a 8,5, aunque los valores óptimos se encuentran entre 5,5 a 6,5 es decir en un ambiente ligeramente ácido. El desarrollo de *Trichoderma* se activa con la presencia de humedad, con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo (Villegas, 2005). A porcentajes mayores de saturación, la colonización y sobrevivencia disminuyen por baja disponibilidad de oxígeno. Los aislamientos de *Trichoderma* ayudan a la descomposición de materia orgánica, además de los hongos a los cuales degrada (Páez, 2006).

De igual forma *Trichoderma* ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, ayudando a la aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta. Además, ayuda a la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, a la estimulación del crecimiento vegetal y a la inducción de resistencia (Martinez et al., 2013). También estos actúan indirectamente sobre los



patógenos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta. El estudio de estos modos de acción en condiciones de campo es complejo, pues *Trichoderma* es un hongo cuyo hábitat es el suelo y la mayoría de estos procesos se efectúan en la rizósfera (Martinez et al., 2013).

- ***Lecanicillium spp***

Los hongos en el género *Lecanicillium* (anteriormente clasificado como la especie única *Verticillium lecanii*) son patógenos importantes de insectos y algunos se han desarrollado como bioplaguicidas comerciales. *Lecanicillium spp* utiliza tanto fuerzas mecánicas como enzimas hidrolíticas para penetrar directamente en el integumento del insecto y la pared celular del patógeno fúngico de la planta. Además, las cepas de *Lecanicillium spp*. puede tener un potencial de desarrollo como un único agente de control microbiano eficaz contra varias enfermedades de plantas, insectos plaga y nematodos parásitos de plantas, debido a sus características antagónicas, parasitarias y que inducen resistencia a enfermedades (Goettel et al., 2008).

- ***Beauveria bassiana***

*Beauveria bassiana*, es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase *Deuteromycetes*, de acuerdo con la morfología de la estructura reproductora y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos, por lo que es considerado uno de los patógenos más importantes de insectos. Los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo (Colombo et al., 2012).



- ***Bacillus spp***

*Bacillus* es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos debido a su capacidad de formación de esporas que le da una ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal (Calvo & Zúñiga, 2010). Además, *Bacillus* es secretor de proteínas y metabolitos eficientes para el control de plagas y enfermedades, promueve el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fósforo y la producción de reguladores de crecimiento como el ácido indol acético; así mismo participa en la fijación de nitrógeno cuando hace parte de consorcios microbianos. Como biofertilizante es una opción amigable para el suelo y el ambiente que da respuesta a la necesidad de implementar la agricultura sostenible (Corrales et al., 2016).

- ***Paecilomyces spp***

Es un hongo filamentoso que se puede encontrar naturalmente en el suelo, es altamente adaptable por lo que puede llegar a ser entomopatógeno, micoparásito, saprófito o nematófago. *Paecilomyces* es un hongo especialmente utilizado en la represión de los nematodos principalmente del género *Meloidogyne* (Cañón & Sanabria, 2017).

- ***Pseudomonas spp***

Las cepas de *Pseudomonas* actúan con actividad antagonista frente a fitopatógenos que afectan a los cultivos de importancia económica. Este género bacteriano constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales ejerce un efectivo control biológico, incluyendo el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta. Sin embargo, *Pseudomonas* no tiene la



capacidad de producir esporas de resistencia, lo que limita su formulación para uso comercial (Pérez et al., 2015).

Además, el género *Pseudomonas* tiene una gran capacidad para solubilizar fósforo. La bacteria puede realizar esta actividad a través de dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, glucónico) que actúan sobre el pH del suelo, favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato al suelo. La otra vía es a través de las fosfatasas, estas son enzimas hidrolasas (Monoesterasas y diesterasas fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres, liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica. Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfato, disponible para ser absorbido por las raíces de las plantas (Cornelis, 2008).

Otro aspecto muy importante de este género es la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento. Las principales sustancias de este tipo son hormonas (auxinas, gibelinas y citoquininas). Además, también producen aminoácidos y promotores específicos del crecimiento vegetal. La producción de estas sustancias es posible siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y que en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica (Ramyasmruthi et al., 2012).

## **5.6. Electroforesis en gradiente con gel desnaturalizantes para el estudio de diversidad de comunidades microbianas**

La Electroforesis en DGGE (Gel de Poliacrilamida con Agente Desnaturalizante), se basa en la extracción del ADN metagenómico directamente de muestras de suelo. Su amplificación mediante PCR (Polimerase Chain Reaction), de los genes ribosomales u



otros marcadores moleculares presentes en la muestra. Se realiza usando cebadores universales o específicos y la posterior separación de los fragmentos amplificados en geles de acrilamida en presencia de agentes desnaturalizantes (Llivicura & Pañi, 2017).

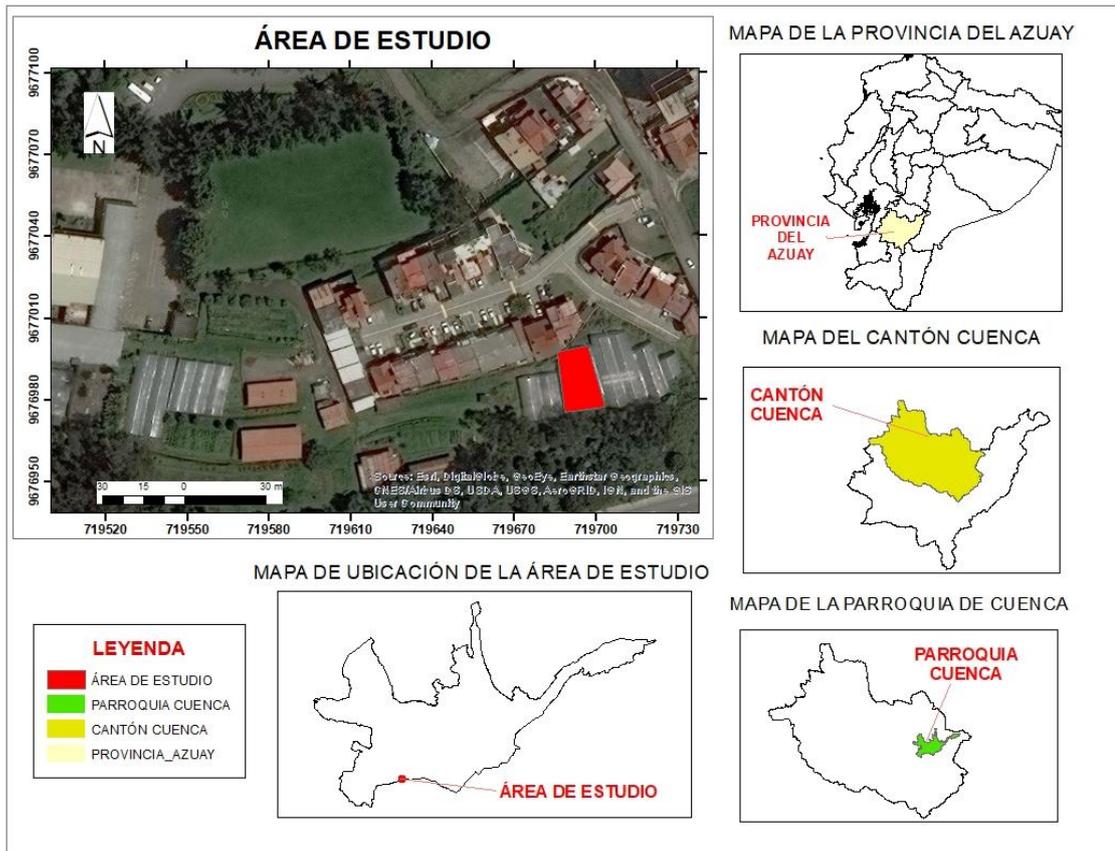
La secuenciación de regiones espaciadoras transcritas (ITS) internas de ADNr son utilizadas para el diseño de cebadores para el estudio de la diversidad ya que estos genes o marcadores se encuentran presentes en todos los microorganismos. Por ende, el análisis de las secuencias de los genes 16S ADNr (procariotas) y 18S ARNr (eucariotas), son necesarios para realizar una identificación rápida a partir de una base de datos pública que contiene un amplio número de secuencias bacterianas y fúngicas (Llivicura & Pañi, 2017).

La técnica DGGE permite determinar índices de diversidad, parámetro que depende de dos componentes: la riqueza o abundancia, que es el número total de especies presentes, y la distribución de individuos entre esas especies (Llivicura & Pañi, 2017).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el invernadero de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca ubicado en las coordenadas UTM Este = 719689 y Norte = 9676987 a una altitud de 2500 ms.n.m.



**Figura 1:** Ubicación a nivel provincial, cantonal y parroquial del área de estudio

**Fuente:** Ortiz & Yunga, 2019



## 6.2. Metodología de la investigación

### 6.2.1. Semillero

Las semillas de tomate fueron sembradas en bandejas germinadoras de polietileno, empleando como sustrato turba. Las plantas permanecieron en el semillero por 30 días, cuando alcanzaron un tamaño de 15 cm fueron trasplantadas.

### 6.2.2. Trasplante

Se utilizaron plántulas de tomate de 15 cm de altura, las cuales fueron trasplantadas en macetas de polietileno de 6 L de volumen. Las macetas fueron llenadas con sustrato a base de suelo mineral, suelo mineral más Biocarbono proveniente de residuos de madera de eucalipto y suelo mineral más residuos orgánicos lignocelulósicos a base de cascarilla de arroz. Los sustratos que contuvieron biocarbono o cascarilla se prepararon mezclando 4 volúmenes de suelo y un volumen de biocarbón o cascarilla, según el caso. Adicionalmente, la mitad de las macetas se mantuvieron cubiertas con una cobertura de acolchado plástico, mientras que la otra mitad se la mantuvo sin cobertura. Las diferentes combinaciones de estas condiciones definieron a los tratamientos que se evaluaron en el experimento según se muestra en la Tabla 1.

*Tabla 1: Descripción de los respectivos tratamientos*

	TRATAMIENTOS	COBERTURA	CONSORCIOS MICROBIANOS
T1	Suelo Mineral	SI	SI
T2	Suelo Mineral	NO	SI
T3	Suelo Mineral	SI	NO
T4	Suelo Mineral	NO	NO
T5	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	SI
T6	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	SI
T7	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	NO
T8	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	NO
T9	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	SI



T10	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	SI
T11	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	NO
T12	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	NO

---

### 6.2.3 Inoculación

Las plantas de tomate fueron inoculadas cada 15 días con una cantidad de 50 ml de consorcio microbiano por planta, el mismo que fue formulado a base de *Trichoderma spp*, *Lecanicillium spp*, *Beauveria bassiana*, *Bacillus spp*, *Paecilomyces spp* y *Pseudomonas fluorescens*. Los cuales fueron diseñados en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

La aplicación se realizaba manualmente en cada uno de los tratamientos (Tabla 2), distribuyendo los 50 ml de la solución microbiana alrededor de la planta en fracciones iguales, dando un total de 1.5 litros de solución microbiana. Este proceso se realizó durante todo el ciclo del cultivo.

## 6.3. Metodología para los parámetros fisiológicos

### 6.3.1. Índice de crecimiento y desarrollo

La toma de datos de las variables (altura, diámetro y emisión foliar) del índice de crecimiento y desarrollo de la planta se tomaron cada 7 días (semanalmente), durante un periodo de tiempo de 5 meses.

#### 6.3.1.1. Altura

La toma de datos de la variable altura se realizó desde el cuello del tallo hacia el brote del ápice de la planta, utilizando un flexómetro.

#### 6.3.1.2. Diámetro

La toma de datos del diámetro se realizó específicamente en el cuello del tallo, mediante la utilización de un calibrador.



### **6.3.1.3. Tasa de emisión foliar**

Esta variable se evaluó contabilizando el número de hojas completas que emitía la planta durante una semana y posteriormente se marcaba con un marcador permanente la última hoja contabilizada para reiniciar el conteo desde esa hoja la semana posterior.

### **6.3.1.4. Duración de las fases fenológicas**

En cuanto a esta variable solo se contabilizó el número de días de la aparición del primero, segundo y tercer racimo floral y el número de días a la cosecha de estos.

## **6.3.2. Índices de estado hídrico**

La toma de datos de las variables (densidad estomática, conductancia estomática y contenido relativo de agua) del índice del estado hídrico de la planta se tomó en dos ocasiones, al final del estado vegetativo del cultivo y después de la primera cosecha del primer racimo floral.

### **6.3.2.1. Densidad estomática**

Esta variable se analizó a través de la técnica de esmalte, que consiste en depositar una capa de esmalte transparente sobre la superficie del envés de las hojas muestreadas, previa eliminación de tricomas. En cuanto se secó el esmalte, se colocó encima un trozo de cinta adhesiva transparente y con cuidado se extrajo arrastrando la capa de esmalte con la impresión foliar.

Posteriormente se pegó la cinta adhesiva con la impresión foliar en un portaobjeto para realizar la respectiva observación y conteo de estomas. Mediante la utilización de un microscopio óptico marca Olympus®, objetivo 40X. Este proceso se realizó para todos los tratamientos respectivamente.



### **6.3.2.2. Conductancia estomática**

Los datos de la conductancia estomática se tomaron con un porómetro (Decagon devices, SC-1), que mide en  $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de las hojas en los diferentes tratamientos. Tomando en cuenta la última hoja joven completa de la planta. Para esta variable se consideró registrar datos desde las 12:00 hasta las 14:00.

### **6.3.2.3. Contenido relativo de agua (CRA)**

Para determinar CRA se recolectó un foliolo de la última hoja joven completamente expandida de la planta. Las muestras recolectadas fueron selladas y etiquetadas individualmente en fundas herméticas para posterior a esto ser pesadas en el laboratorio y de esta forma obtener el peso fresco (PF). Una vez pesadas se volvió a colocar las hojas en sus respectivas fundas y se las incubó en agua por 24 horas para alcanzar la máxima imbibición. Luego de esta incubación, las hojas se secaron superficialmente sin presionar con papel absorbente y se obtuvo el peso turgente (PT). Después se secaron las muestras por 24 horas a 72 °C y se determinó el peso seco (PS). Finalmente el CRA se calculó mediante la siguiente fórmula según lo indicado por Sade, Galkin & Moshelion (2015):

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100.$$

### **6.3.3. Índice nutricional**

La toma de datos de las variables (contenido de clorofila y contenido de nitrato en la sabia) del índice nutricional de la planta se tomó en dos ocasiones, al final del estado vegetativo del cultivo y después de la primera cosecha del primer racimo floral.



### **6.3.3.1. Contenido de clorofila**

Estos datos se midieron mediante el medidor de índice de contenido de clorofila, marca OPTI-SCIENCES modelo CCM-200 PLUS, en los respectivos tratamientos. Para esto se consideraron la última hoja joven completa de la planta.

### **6.3.3.2. Contenido de nitrato en la sabia**

Se procedió a recolectar la última hoja joven completa de los diferentes tratamientos. Para luego proceder a extraer el respectivo peciolo de la hoja y guardarle en fundas herméticas para su respectivo análisis en el laboratorio. Luego en el laboratorio se extrajo la sabia de cada uno de los peciolos y se procedió a medir con un medidor de nitrato en savia marca HORIBA modelo LAQUAtwin.

## **6.4. Metodología para los parámetros Agronómicos**

### **6.4.1. Propiedades físicas - químicas del sustrato**

Para las variables químicas de pH y conductividad eléctrica se tomó 100 g de suelo de cada uno de los tratamientos y para las variables físicas como la densidad aparente se tomaron muestras con anillos de Kopecki. Las mismas que fueron llevadas al laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca para sus respectivos análisis. Basándose en la metodología empleada por la USDA (1999). Además, estos fueron evaluados antes y después de la inoculación de consorcios microbianos, para determinar cuáles fueron los cambios que pudieron haber ocurrido en el suelo.

#### **6.4.1.1. pH**

En el laboratorio se pesaron 20 g de suelo de cada uno de los tratamientos, en un vaso de precipitación se colocó 50 ml de agua destilada, luego se colocó los 20 g de suelo y se formó una solución la cual se movió durante 15 minutos. Después mediante el filtrado



se obtuvo una solución de 20 ml, para finalmente realizar la medición con un potenciómetro marca (Horiba).

#### **6.4.1.2. Conductividad eléctrica**

En el laboratorio se pesó 10 gr de suelo de cada uno de los tratamientos, en un vaso de precipitación se colocó 50 ml de agua destilada, luego se colocó los 10 g de suelo y se formó una solución la cual se movió durante 15 minutos. Después mediante el filtrado se obtuvo una solución de 20 ml para finalmente realizar la respectiva medición con el conductímetro (Horiba).

#### **6.4.1.3. Densidad Aparente**

Se tomó sola una muestra de suelo por tratamiento y repetición, usando un cilindro de acero de volumen conocido denominado anillo de Kopecki, de los primeros 20 cm de suelo en la zona rizosférica de la planta. Luego estas muestras fueron posteriormente trasladadas al laboratorio de suelos, donde se determinó la densidad aparente a través de la relación entre el peso seco de la muestra de suelo y el volumen del anillo.

### **6.5. Metodología para el análisis molecular**

Para este análisis se tomaron muestras del sustrato de cada uno de los tratamientos, antes y después de la inoculación con los respectivos consorcios microbianos. Para posteriormente ser llevadas al laboratorio para su correspondiente análisis.

#### **6.5.1. Extracción y purificación del ADN metagenómico**

El ADN metagenómico de cada muestra recolectada se consiguió por extracción a partir de 0.25 gramos de suelo, usando el protocolo desarrollado por Laurent et al. (2001) (Anexo 1), y modificado en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Anexo 1). Además, Se verificó el éxito de la extracción del ADN total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v)



con amortiguador TAE 1X. Para cargar en la lámina de gel, a cada muestra se le agregó 0,3 µl de SYBER GREEN™, y 2 µl de ADN metagenómico obteniendo un total de 5 µl de muestra. Las condiciones de separación fueron a 120 voltios por 30 minutos y finalmente se observó la amplificación en un foto-documentador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

### **6.5.2. Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Para el estudio de la diversidad de las comunidades bacterianas y fúngicas asociados a la zona rizosférica de los tratamientos aplicados consorcios microbianos, se requirió la optimización de las condiciones de desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

#### **6.5.2.1. PCR Hongos (región ITS ADNr)**

El ADN metagenómico aislado se usó como molde para amplificar, mediante Touchdown PCR la región ITS ADNr de la comunidad fúngica; para ello se utilizaron cebadores universales ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'), e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Tabla 2), que amplifican una región de aproximadamente 1400 pb. La amplificación se realizó en un Termociclador Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de hibridación (touchdown) a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos (disminuyendo 1°C por cada ciclo), seguido por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Liu et al., 2015).



**Tabla 2:** Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores de la región ITS.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM
dNTPs	10 mM	0.5 mM
Cebador ITS1F	10µM	0.2 µM
Cebador ITS4	10µM	0.2 µM
Taq_polimerasa	1U/µl	1U

A partir del producto de la primera amplificación se realizó un segundo PCR (PCR anidado) utilizando los cebadores ITS1FGC (5'-CGC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA -3') e ITS2 (5'- GCT GCG TTC ATC GAT GC-3'). El volumen final para cada reacción fue de 50 µl (Tabla 3). El perfil térmico programado para la amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de hibridación a 94°C por 45 segundos, 55°C por 75 segundos, 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos (Wu et al., 2013).

**Tabla 3:** Concentraciones de reactivos para PCR anidada con cebadores para la región ITS

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.5 mM
dNTPs	10 mM	0.5 mM
Cebador ITS1F	10µM	0.2 µM
Cebador ITS4	10µM	0.2 µM
Taq_polimerasa	1U/µl	1U



### 6.5.2.2.PCR Bacterias (gen 16S ADNr)

Al igual que en los hongos, el ADN metagenómico aislado se utilizó como molde para amplificar por PCR un fragmento interno del gen ADNr 16S que codifica la región variable V6 y V8 de aproximadamente 420 pb. Se utilizaron cebadores universales F968 (5'- GC-CGC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CGC CCC CGC CCC AAC GCG AAG AAC CTT AC -3' y 1401R (5'- CGC CCG CGC CCC GCC CGG CCC GCC CCC GCC CCA ACG CGA AGA ACC TTAC -3').

Para la amplificación se utilizó los componentes de Platinum® PCR SuperMix, para un volumen total de 50 µl (Tabla 4). Se utilizó el perfil térmico descrito por (Brons & Van Elsas, 2008) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 10 ciclos de amplificación (touchdown) a 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos (disminuyendo 1°C por cada ciclo); seguido por 25 ciclos de amplificación (estándar) a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos; seguido de una extensión final a 72°C por 30 minutos.

**Tabla 4:** Concentraciones de reactivos para PCR con cebadores para el gen 16S

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Platinum® PCR SuperMix		1x
Cebador F968GC	50 µM	0.2 µM
Cebador 1401R	50 Mm	0.2 µM
ADN metagenómico		< 500 ng

En todas las reacciones se incluyó una muestra sin ADN metagenómico como control negativo de amplificación. La amplificación por PCR de la región ITS ADNr y del gen 16S ADNr se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) con buffer TAE 1X. A cada muestra se le incluyó 0.5 µl de SYBER GREEN, 1 µl de Blue



Juice 10X y 5 $\mu$ l de ADN. Las condiciones de separación fueron a 80 voltios por 30 minutos. Para conocer los tamaños moleculares de las bandas se utilizó un marcador de longitud molecular (TrackIt 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen); se observó y fotodocumentó los geles utilizando un transiluminador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

### **6.5.3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)**

La separación de los fragmentos amplificados por PCR, en función de la secuencia de nucleótidos se llevó a cabo mediante DGGE.

Para la corrida electroforética en ambos casos se preparó y ensambló el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones descritas por (Janse et al., 2004). Cada gel estuvo constituido por tres secciones: zona de sellado o tapón para las fugas ubicado en la parte inferior (contiene 1.5 ml de solución al 0% de desnaturizante, 9  $\mu$ l de persulfato de amonio y 1.5  $\mu$ l de TEMED); gradiente químico desnaturizante (contiene 13 $\mu$ l de solución de mayor o menor concentración, 78 $\mu$ l de persulfato de amonio y 13  $\mu$ l de TEMED) y stacking (contiene 3 ml de solución al 10% de desnaturizante, 18  $\mu$ l de persulfato de amonio y 3  $\mu$ l de TEMED).

El gradiente químico desnaturizante se preparó utilizando urea-formamida siguiendo las indicaciones descritas por (Muyzer et al., 1993); en el caso de los hongos se preparó y cargó el gel de poliacrilamida al 8 % (w / v) de acrilamida: bisacrilamida (37.5: 1) en un tampón TAE 0,5X con diferentes gradientes desnaturizantes de urea/formamida. Las soluciones contienen desde 20% a 35% de desnaturizante [donde el 100% desnaturizante contiene urea 7 M y 40% (v / v) de formamida]. Igualmente, con las mismas condiciones se preparó el gel para las bacterias con poliacrilamida al 7 % (w/v) de acrilamida: bis acrilamida (37.5: 1) en un tampón TAE 0.5X con diferentes



gradientes desnaturalizantes de urea-formamida. Las soluciones contienen desde 35% a 55 % de desnaturalizante [donde el 100% desnaturalizante contiene urea 7 M y 40% (v / v) de formamida].

Una vez ensamblado el equipo, se procedió a cargar las muestras de ADN amplificado al gel; para ello se hicieron mezclas de 3µl de Bluejuice 6X más 15µl de ADN en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml. La corrida electroforética se realizó durante 14 horas a un voltaje constante de 80 V con una temperatura de 60°C (Llivicura & Pañi, 2017).

Transcurrido el tiempo de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos utilizando SYBR Green 2X en tampón TAE 0.5X durante 30 minutos, a temperatura ambiente en un lugar oscuro; posteriormente las imágenes se visualizaron y documentaron con un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System para su posterior análisis.

#### **6.6. Determinación de índices de diversidad de comunidades microbianas.**

A través del procesamiento de imágenes de los perfiles de DGGE en el programa bioinformática PyElph se calculó la riqueza de unidades taxonómicas operacionales (UTOs); siendo la riqueza de UTOs equivalente al número de bandas registradas en cada muestra.

#### **6.7. Determinación de la composición de comunidades microbianas.**

Las similitudes de los perfiles electroforéticos se analizaron a partir de matrices de presencia/ausencia para cada UTO detectada en el gel (Palacio et al., 2020). A partir de esta matriz se calculó el índice de Jaccard para cada combinación de tratamientos tanto al inicio como al final del experimento usando el software R (Dia et al., 2017). Los



resultados de la composición de bacterias y hongos fueron representados en forma de dendogramas realizando un análisis de agrupamiento jerárquico a partir de la matriz de similitud de Jaccard usando el algoritmo de ligamiento completo (Palacio et al., 2020). Debido al número máximo de muestra que se pueden correr en paralelo, el análisis de la estructura de la composición de las comunidades de bacterias y hongos se tuvo que realizar en dos grupos de 12 muestras cada una.

### **6.8. Diseño experimental**

Los factores estudiados en el ensayo fueron tres:

- El factor A, fueron los tres sustratos (Suelo mineral, Suelo mineral más Biocarbono realizado a base de residuos maderables de eucalipto y el suelo mineral más materia orgánica como la cascarilla de arroz).
- El factor B, fue la inoculación de los consorcios microbianos (con y sin inoculación) y finalmente el factor C, estaba constituido por la cobertura de mulch plástico (con y sin cobertura).

De la combinación de los factores se obtuvieron 12 tratamientos. El experimento se implementó utilizando un diseño experimental de bloques completos al azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones, con un arreglo factorial de (3 x 2 x 2). La unidad experimental estuvo representada por un maceta con una separación entre plantas de 50 cm, dando un total de 60 unidades experimentales. Para la distribución aleatoria de los tratamientos se utilizó el software Excel y se definió un mapa de tratamientos como se muestra en la Figura 2.



		TRATAMIENTOS											
REPETICIONES	1	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
	2	T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1
	3	T3	T5	T4	T6	T7	T8	T11	T12	T1	T2	T9	T10
	4	T5	T6	T7	T8	T11	T12	T1	T2	T9	T10	T3	T4
	5	T10	T9	T1	T12	T3	T2	T5	T11	T4	T8	T6	T7

TRATAMIENTOS		CONSORCIOS MICROBIANOS	COBERTURA
FACTOR	A	B	C
T1	Suelo Mineral	SI	SI
T2	Suelo Mineral	SI	NO
T3	Suelo Mineral	NO	SI
T4	Suelo Mineral	NO	NO
T5	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	SI
T6	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	NO
T7	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	SI
T8	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	NO
T9	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	SI
T10	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	NO
T11	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	SI
T12	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	NO

**Figura 2:** Mapa de la distribución de los tratamientos

Posteriormente se estudiaron las características de los datos en relación con la normalidad de su distribución (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas entre tratamientos (prueba de Levene). Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se utilizaron análisis de varianza (ANOVA). En los casos en que la distribución de las variables no fue normal, se aplicó la prueba de Friedman para comparar las medianas de ambos tratamientos.



## 7. RESULTADOS

Al realizar la prueba de “Shapiro – Wilks” se determinó que todas las variables evaluadas en el ensayo cumplen con el supuesto de normalidad y que las varianzas de los tratamientos son homogéneas según la prueba de “Levene” como se indica en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Normalidad y Homogeneidad de varianzas

VARIABLES	SHAPIRO - WILKS (NORMALIDAD)	LEVENE (HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS)
pH	0.4157	0.9306
CE	0.1036	0.3614
Densidad Aparente	0.3428	0.6851
Altura	0.0396	0.5420
Diámetro	0.0186	0.9062
Emisión foliar	0.0963	0.9934
Densidad estomática - final vegetativo	0.1273	0.3862
Densidad estomática - primera cosecha	0.2165	0.9401
Conductancia estomática - final vegetativo	0.2385	0.9788
Conductancia estomática - primera cosecha	0.0113	0.6417
Contenido relativo de agua - final vegetativo	0.6221	0.7926
Contenido relativo de agua - primera cosecha	0.9946	0.3878
Contenido de clorofila - final vegetativo	0.8482	0.6776
Contenido de clorofila - primera cosecha	0.0864	0.8326
Nitrato en la sabia - final vegetativo	0.4637	0.7312
Nitrato en la sabia - primera cosecha	0.6764	0.8013
Rendimiento	0.7986	0.8860

El ( $P > 0.05$ ) Indica normalidad en los residuos y homogeneidad de varianzas.

### 7.1. Propiedades físicas - químicas del suelo

Analizando los resultados de pH (Figura 3), al inicio y final del cultivo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, pero al finalizar el cultivo si se pudo evidenciar una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0,05$ ) para la interacción sustrato

– mulch (Tabla 6). Producto de esta interacción, los tratamientos con mulch tendieron a registrar valores más altos de pH en el suelo con cascarilla, pero valores más bajos de pH en el suelo, y ninguna diferencia aparente en el suelo con carbón.

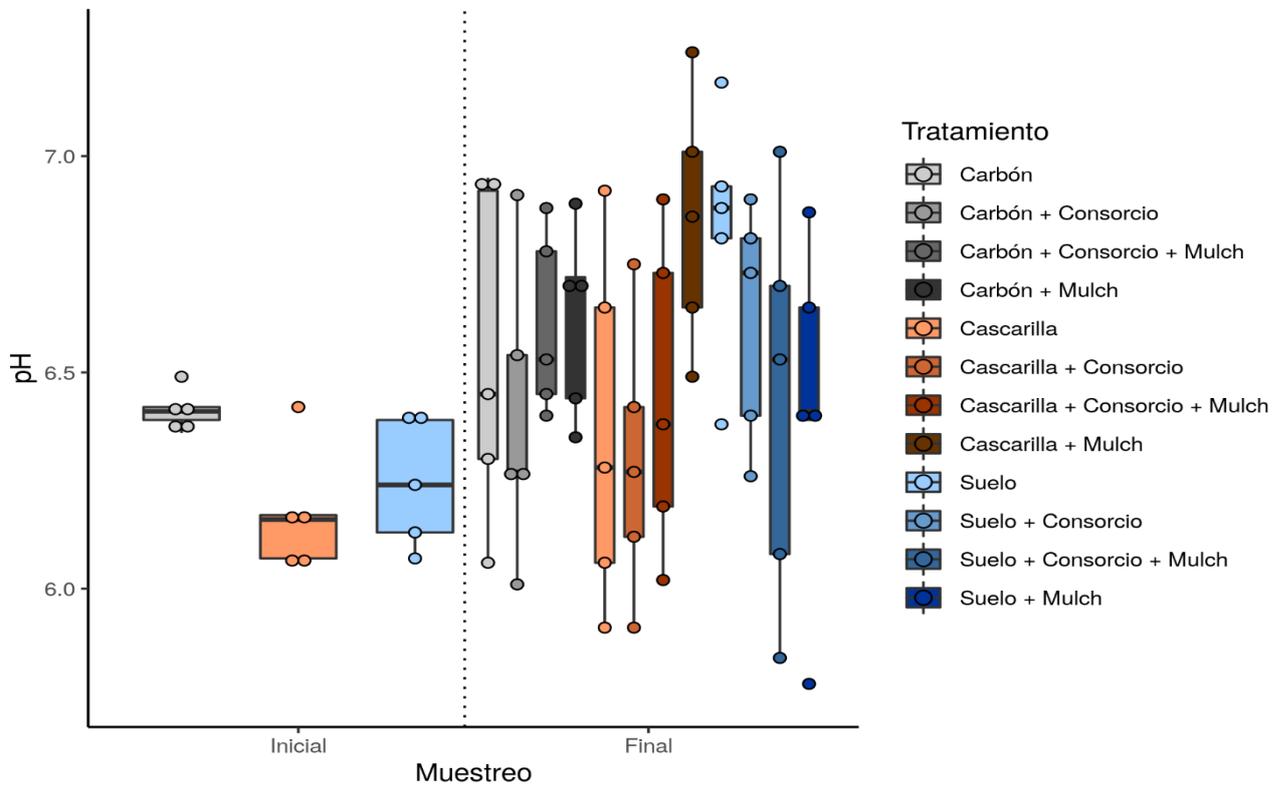
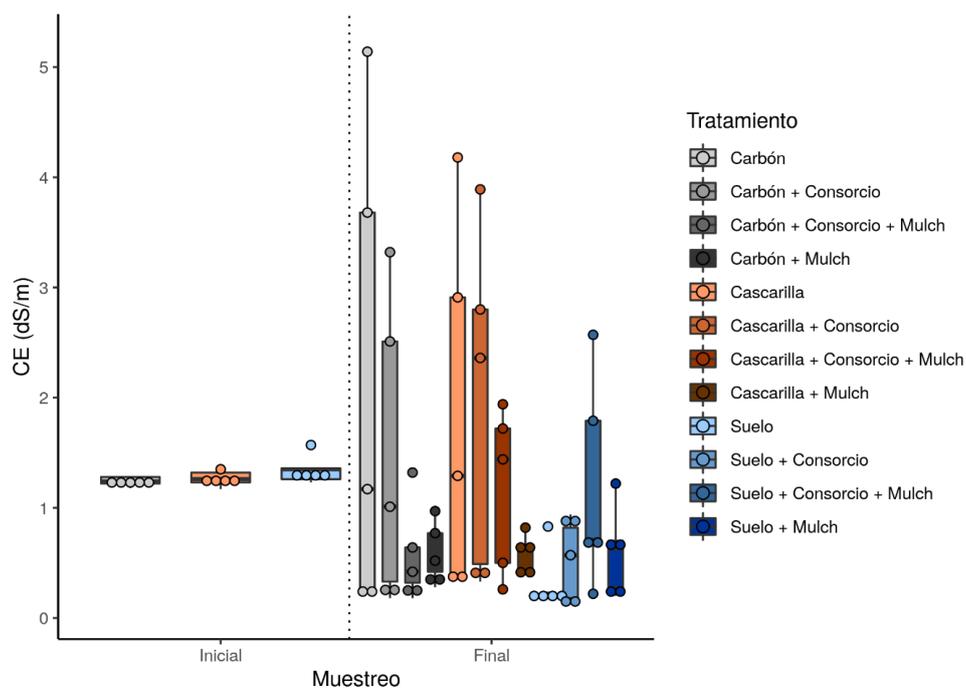


Figura 3: pH del suelo del muestreo inicial y final del cultivo

Tabla 6: ANOVA de la variable pH

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	0.079	0.0395	0.337	0.7153
Consortorio	1	0.283	0.2829	2.415	0.1267
Mulch	1	0.044	0.0437	0.373	0.5440
Sustrato: Consortorio	2	0.078	0.0390	0.333	0.7185
Sustrato: Mulch	2	1.020	0.5100	4.354	<b>0.0183</b> *
Consortorio: Mulch	1	0.000	0.0002	0.001	0.9701
Sustrato: Consortorio: Mulch	2	0.226	0.1130	0.964	0.3885
Residuals	48	5.622	0.1171		

Analizando los resultados de CE (Figura 4), al inicio y final del cultivo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Pero al finalizar el cultivo si se observó un comportamiento diferente entre los tratamientos, evidenciándose diferencias altamente significativas para la interacción sustrato - mulch ( $p < 0.04$ ) (Tabla 7), sugiriendo, de forma similar a los resultados de pH, que el efecto del mulch es dependiente del sustrato sobre el cual se lo aplica.

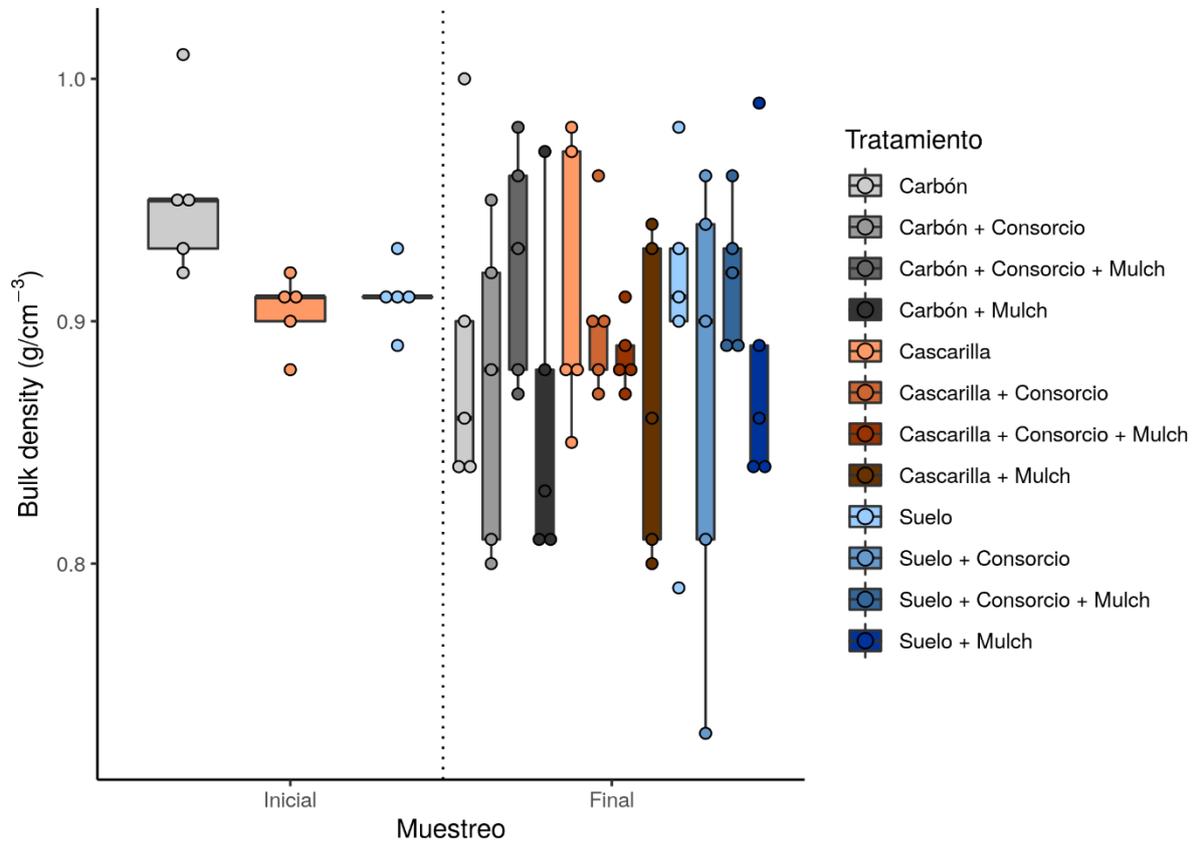


**Figura 4:** CE del suelo del muestreo inicial y final del cultivo

**Tabla 7:** ANOVA de la variable CE

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	5.25	2.6253	2.961	0.0613
Consorcio	1	0.61	0.6067	0.684	0.4122
Mulch	1	0.42	0.4164	0.470	0.4964
Sustrato: Consorcio	2	1.13	0.5651	0.637	0.5331
Sustrato: Mulch	2	5.74	2.8716	3.239	<b>0.0479</b> *
Consorcio: Mulch	1	0.12	0.1159	0.131	0.7193
Sustrato: Consorcio: Mulch	2	0.07	0.0333	0.038	0.9631
Residuals	48	42.55	0.8865		

En la variable densidad aparente (Figura 5), no se observaron diferencias estadísticas significativas ni al inicio ni al final del muestreo.



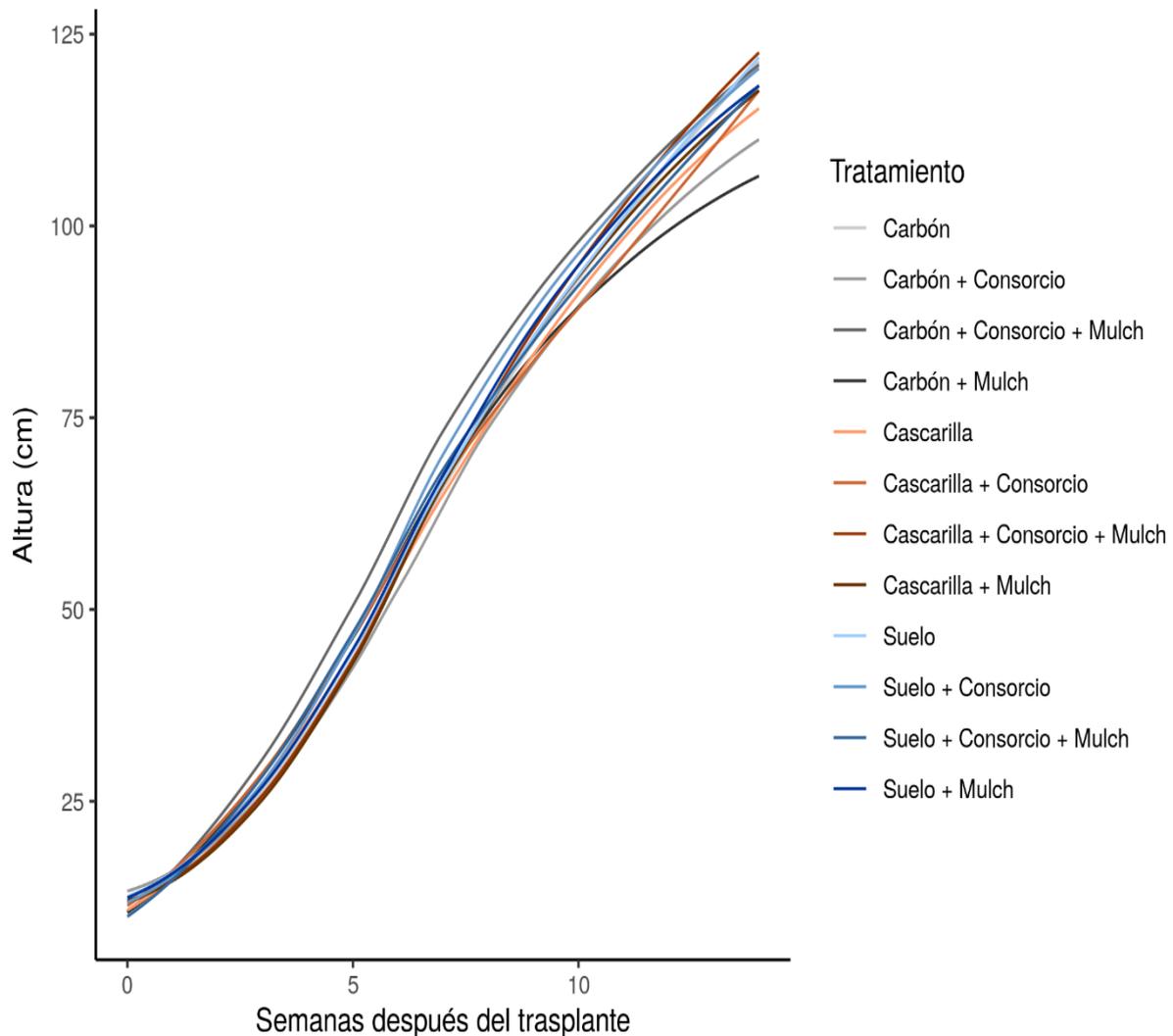
**Figura 5:** Densidad Aparente del suelo del muestreo inicial y final del cultivo

**Tabla 8:** ANOVA de la variable Densidad Aparente del muestreo inicial y final del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	0.00057	0.000287	0.078	0.9248
Consorcio	1	0.00131	0.001307	0.357	0.5531
Mulch	1	0.00001	0.000007	0.002	0.9661
Sustrato: Consorcio	2	0.00165	0.000827	0.226	0.7988
Sustrato: Mulch	2	0.00649	0.003247	0.886	0.4187
Consorcio: Mulch	1	0.01291	0.012907	3.524	0.0666
Sustrato: Consorcio: Mulch	2	0.00185	0.000927	0.253	0.7775
Residuals	48	0.17580	0.003662		

## 7.2. Índices de crecimiento y desarrollo

En cuanto a la variable altura (Figura 6) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los tratamientos (Tabla 9). Pero si se pudo evidenciar que entre la semana cero, hasta la semana ocho existe un crecimiento homogéneo entre los tratamientos. Pero a partir de la semana ocho en adelante se verifica diferencias numéricas más grandes entre los tratamientos. Las plantas del tratamiento carbón + consorcio + mulch alcanzaron mayor altura que las de los demás tratamientos; no obstante, como ya se mencionó, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de ellos.

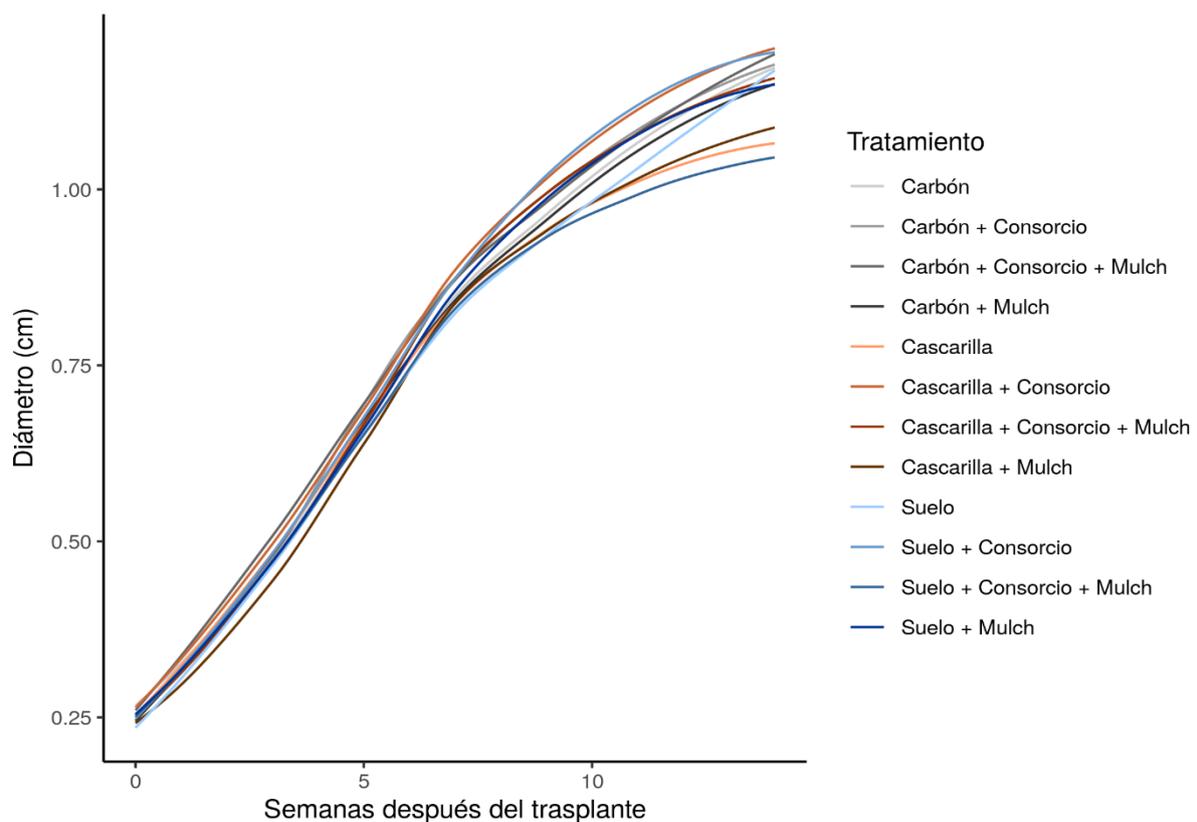


*Figura 6: Altura de las plantas de tomate*

**Tabla 9:** ANOVA de la variable altura

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	170	84.86	0.738	0.483
Consortorio	1	85	85.01	0.739	0.394
Mulch	1	13	13.36	0.116	0.735
Sustrato: Consortorio	2	112	56.23	0.489	0.616
Sustrato: Mulch	2	133	66.71	0.580	0.564
Consortorio: Mulch	1	268	267.63	2.328	0.134
Sustrato: Consortorio: Mulch	2	411	205.32	1.786	0.179
Residuals	47	5403	114.97		

Con respecto al diámetro del cuello de la planta (Figura 7) nuevamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la interacción entre el sustrato y el consorcio ( $p < 0.05$  (Tabla 10)). En donde sí se puede evidenciar que a partir de la semana ocho en adelante existe un cambio brusco entre los tratamientos.

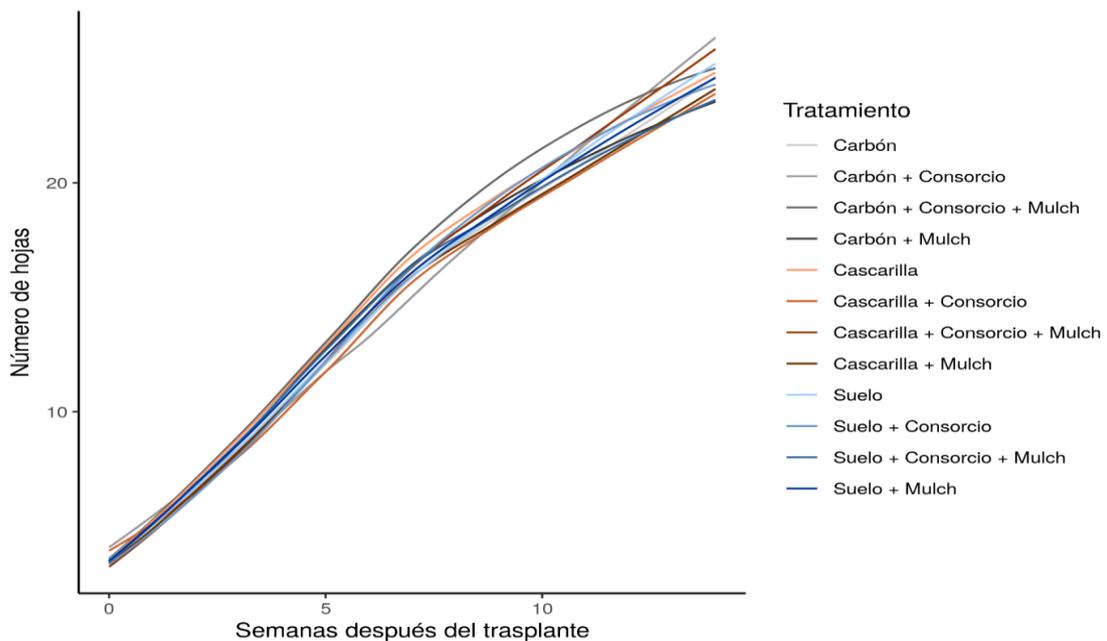


**Figura 7:** Diámetro del tallo de las plantas de tomate

**Tabla 10:** ANOVA de la variable diámetro del tallo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	0.00924	0.004618	0.816	0.4482
Consortio	1	0.01129	0.011290	1.996	0.1643
Mulch	1	0.01802	0.018016	3.185	0.0808
Sustrato: Consortio	2	0.04259	0.021295	3.764	<b>0.0305</b> *
Sustrato: Mulch	2	0.01531	0.007655	1.353	0.2683
Consortio: Mulch	1	0.01203	0.012029	2.126	0.1514
Sustrato: Consortio: Mulch	2	0.01065	0.005327	0.942	0.3972
Residuals	47	0.26587	0.005657		

Para la emisión foliar (Figura 8) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos (Tabla 11). Sin embargo, se logró evidenciar que los tratamientos (carbón + consorcio) y (cascarilla + consorcio + mulch) fueron los que mayor número de hojas lograron tener en todo su ciclo de cultivo. Mientras que los tratamientos (carbón + mulch) y (suelo + mulch) fueron los que menor número de hojas obtuvieron en todo su ciclo de cultivo.



**Figura 8:** Emisión foliar de las plantas de tomate durante su ciclo de producción ( 14 semanas)

Tabla 11: ANOVA de la variable emisión foliar

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	3.81	1.906	0.477	0.624
Consortio	1	0.60	0.600	0.150	0.700
Mulch	1	2.47	2.466	0.617	0.436
Sustrato: Consortio	2	15.36	7.678	1.200	0.158
Sustrato: Mulch	2	8.07	4.036	1.009	0.372
Consortio: Mulch	1	1.97	1.970	0.493	0.486
Sustrato: Consortio: Mulch	2	8.28	4.142	1.036	0.363
Residuals	47	187.95	3.999		

### 7.3. Índices de estado hídrico

Analizando los resultados de la densidad estomática (Figura 9), al final del estado vegetativo del cultivo y durante la primera cosecha no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos (Tabla 12 y 13).

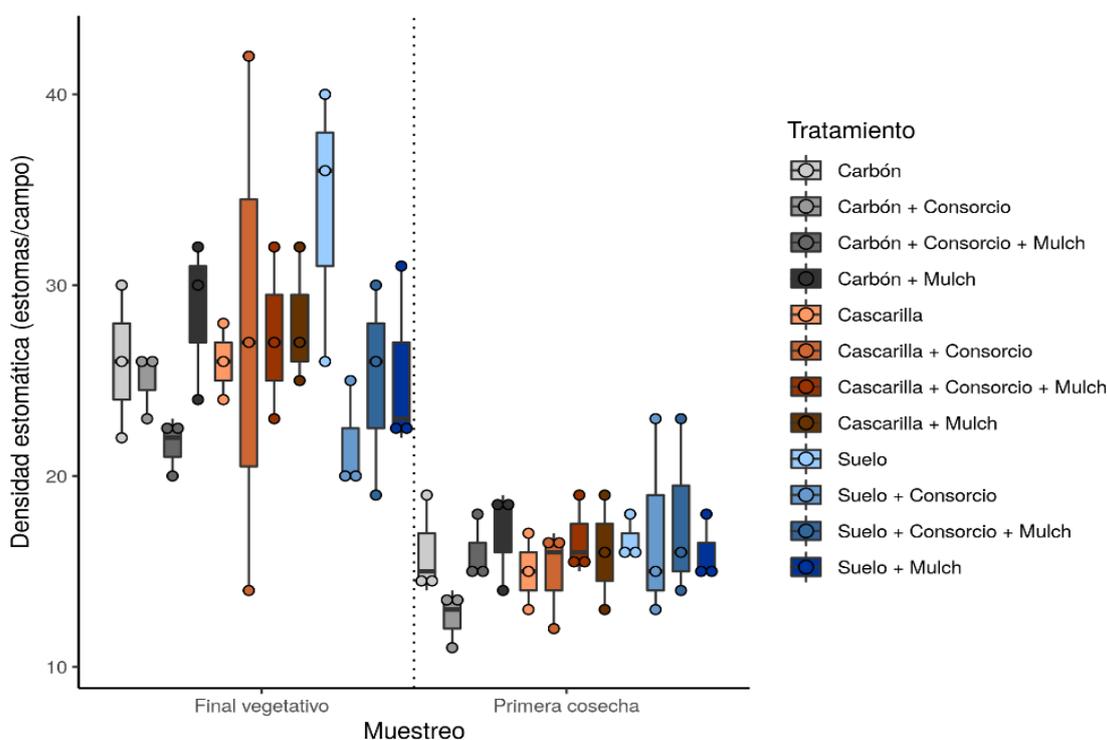


Figura 9: Densidad estomática de las plantas de tomate



**Tabla 12:** ANOVA de la variable densidad estimativa del final del estado vegetativo del cultivo

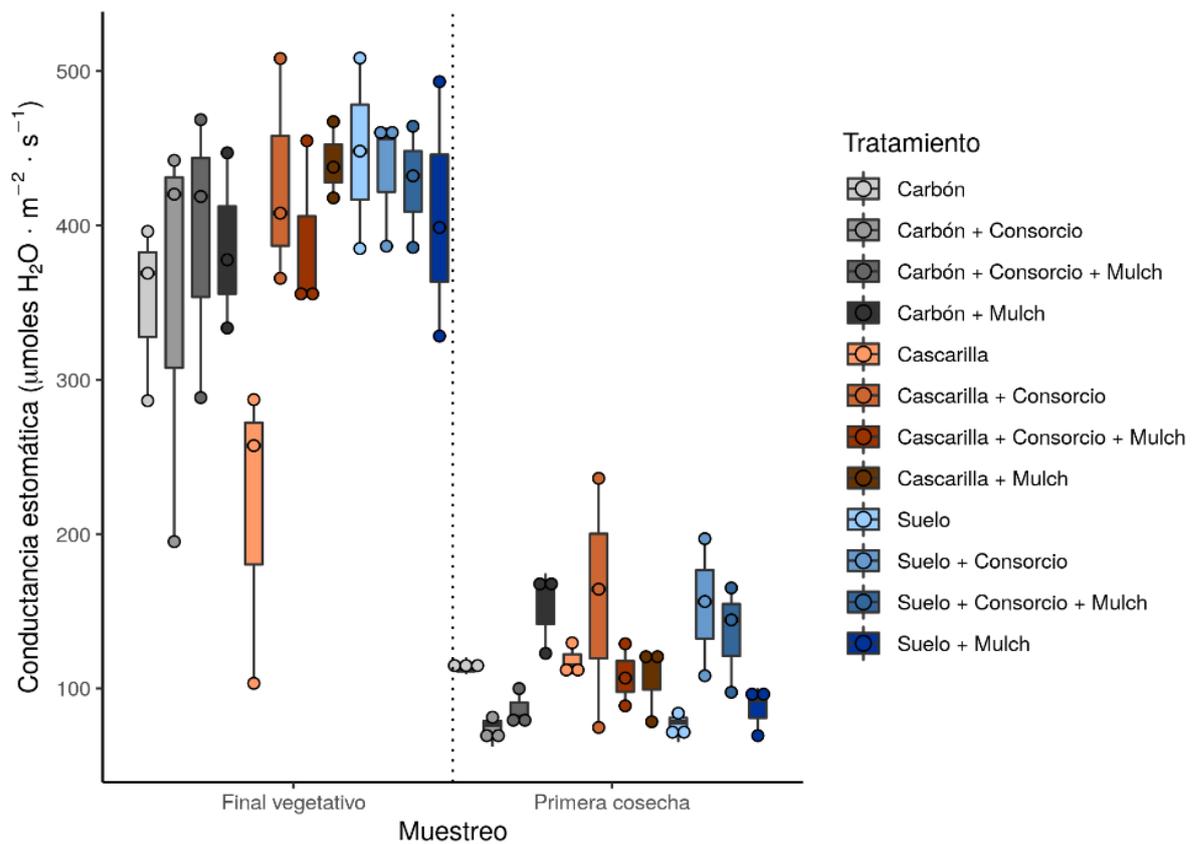
Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	22.4	11.19	0.346	0.7108
Consortio	1	96.7	96.69	2.991	0.0966
Mulch	1	4.7	4.69	0.145	0.7065
Sustrato: Consortio	2	72.4	36.19	1.119	0.3429
Sustrato: Mulch	2	19.1	9.53	0.295	0.7474
Consortio: Mulch	1	3.4	3.36	0.104	0.7499
Sustrato: Consortio: Mulch	2	135.7	67.86	2.099	0.1445
Residuals	24	776.0	32.33		

**Tabla 13:** ANOVA de la variable densidad estomática de la primera cosecha del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	13.72	6.861	0.837	0.445
Consortio	1	0.69	0.694	0.085	0.773
Mulch	1	12.25	12.250	1.495	0.233
Sustrato: Consortio	2	16.72	8.361	1.020	0.376
Sustrato: Mulch	2	7.17	3.583	0.437	0.651
Consortio: Mulch	1	4.69	4.694	0.573	0.456
Sustrato: Consortio: Mulch	2	1.06	0.528	0.064	0.938
Residuals	24	196.67	8.194		

Para la variable conductancia estomática (Figura 10), al final del estado vegetativo del cultivo si se encontraron diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.04$ ) para la interacción (sustrato + consorcio + mulch) (Tabla 14).

Mientras tanto para la primera cosecha del cultivo también se pudo evidenciar una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0,0005$ ) entre la interacción sustrato – consorcio (Tabla 15). En donde, el tratamiento cascarilla más consorcio fue quien resalto más a comparación de los demás tratamientos.



**Figura 10:** Conductancia estomática de las plantas de tomate

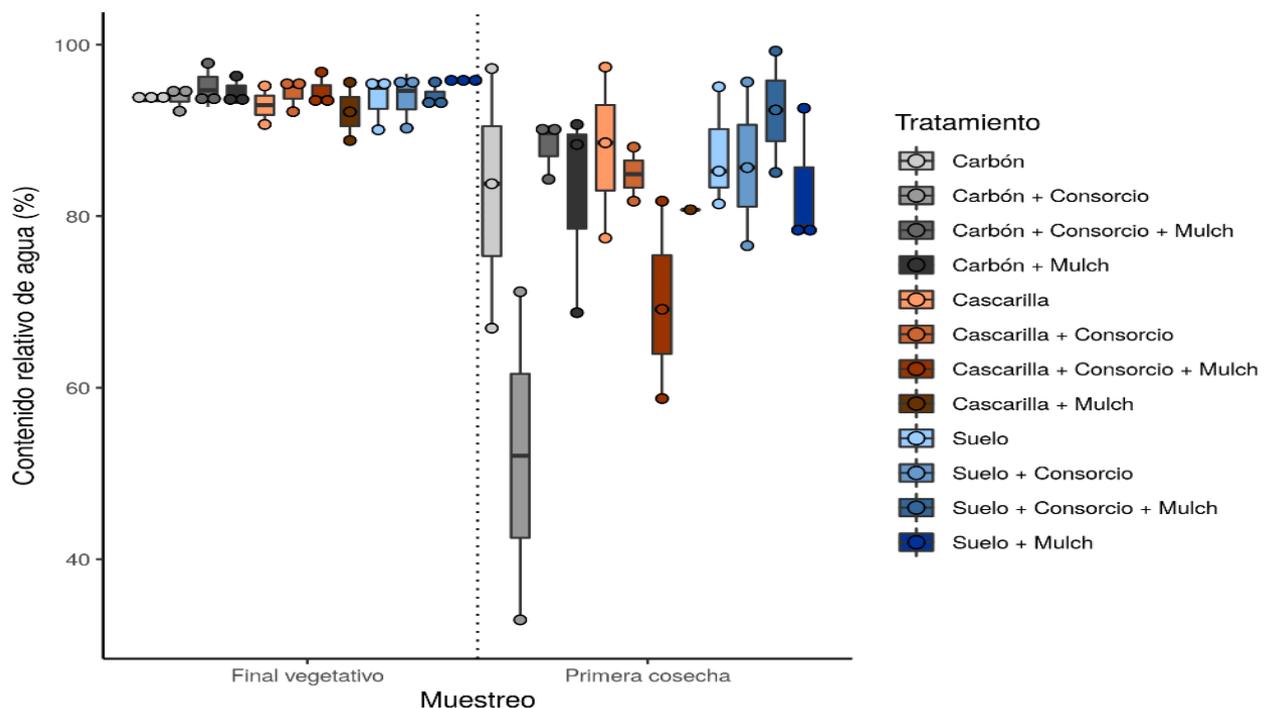
**Tabla 14:** ANOVA de la variable conductancia estimativa del final del estado vegetativo del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	28817	14409	2.585	0.0962
Consorcio	1	7741	7741	1.389	0.2502
Mulch	1	11303	11303	2.028	0.1673
Sustrato: Consorcio	2	11351	5675	1.018	0.3763
Sustrato: Mulch	2	20763	10382	1.863	0.1770
Consorcio: Mulch	1	12939	12939	2.321	0.1407
Sustrato: Consorcio: Mulch	2	39952	19976	3.584	0.0435 *
Residuals	24	133769	5574		

**Tabla 15:** ANOVA de la variable conductancia estomática de la primera cosecha del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	1572	786	0.775	0.4719
Consortio	1	944	944	0.930	0.3444
Mulch	1	70	70	0.069	0.7954
Sustrato: Consortio	2	21004	10502	10.355	<b>0.0005</b> *
Sustrato: Mulch	2	4792	2396	2.363	0.1157
Consortio: Mulch	1	2229	2229	2.198	0.1511
Sustrato: Consortio: Mulch	2	69	35	0.034	0.9665
Residuals	24	24342	1014		

Examinando los resultados del contenido relativo de agua (Figura 11), al final del estado vegetativo del cultivo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos (Tabla 16); pero durante la primera cosecha del cultivo si se constató que existe una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.04$ ) para la interacción sustrato – mulch (Tabla 17). En donde, el tratamiento carbón más mulch fue quien resalto mejor comparado a los demás tratamientos.



**Figura 11:** Contenido relativo de agua de las plantas de tomate



**Tabla 16:** ANOVA de la variable contenido relativo de agua del final del estado vegetativo del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	4.11	2.057	0.409	0.669
Consortorio	1	1.75	1.753	0.349	0.561
Mulch	1	3.68	3.679	0.732	0.401
Sustrato: Consortorio	2	11.60	5.799	1.153	0.333
Sustrato: Mulch	2	3.19	1.593	0.317	0.732
Consortorio: Mulch	1	0.08	0.076	0.015	0.903
Sustrato: Consortorio: Mulch	2	3.61	1.806	0.359	0.702
Residuals	23	115.63	5.027		

**Tabla 17:** ANOVA de la variable contenido relativo de agua de la primera cosecha del cultivo

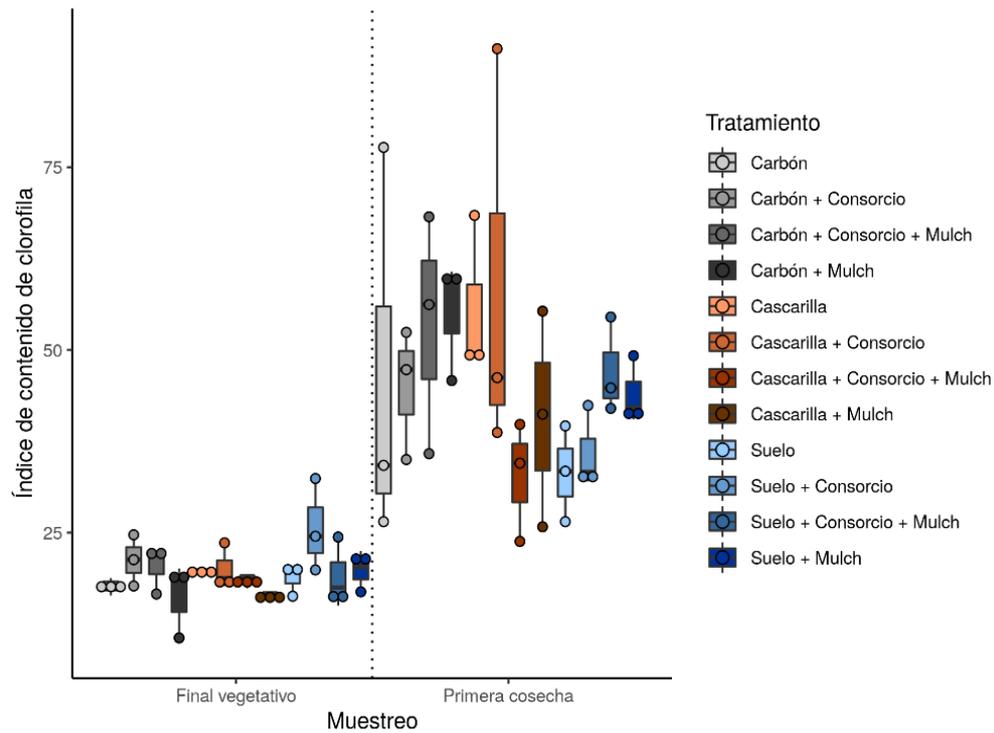
Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	466.1	233.1	1.859	0.1818
Consortorio	1	154.4	154.4	1.232	0.2803
Mulch	1	39.2	39.2	0.312	0.5825
Sustrato: Consortorio	2	366.9	183.4	1.463	0.2553
Sustrato: Mulch	2	905.9	452.9	3.612	<b>0.0458</b> *
Consortorio: Mulch	1	425.2	425.2	3.391	0.0804
Sustrato: Consortorio: Mulch	2	558.1	279.1	2.226	0.1341
Residuals	20	2507.8	125.4		

#### 7.4. Índices nutricionales

Para el índice de contenido de clorofila (Figura 12), al final del estado vegetativo del cultivo se detectaron diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.02$ ) para la interacción sustrato  $\times$  consorcio (Tabla 18). Producto de esta interacción, los tratamientos con consorcio tendieron a índices de contenido de clorofila más altos en el sustrato de suelo con carbón, pero esta tendencia no se observó en los otros sustratos.

Por otra parte, a diferencia de los resultados reportados en el párrafo anterior, a la primera cosecha, no se detectó ningún efecto significativo del consorcio, pero sí de la interacción sustrato  $\times$  mulch ( $P \leq 0.02$ , Tabla 19), siendo los índices de contenido de clorofila relativamente

mayores en los sustratos de suelo con carbón y suelo sin enmendar cuando estuvieron cubiertos por mulch, pero la tendencia contraria se registró en el sustrato enmendado con cascarilla.



**Figura 12:** Índice de contenido de clorofila de las plantas de tomate

**Tabla 18:** ANOVA de la variable índice de contenido de clorofila del final del estado vegetativo del cultivo

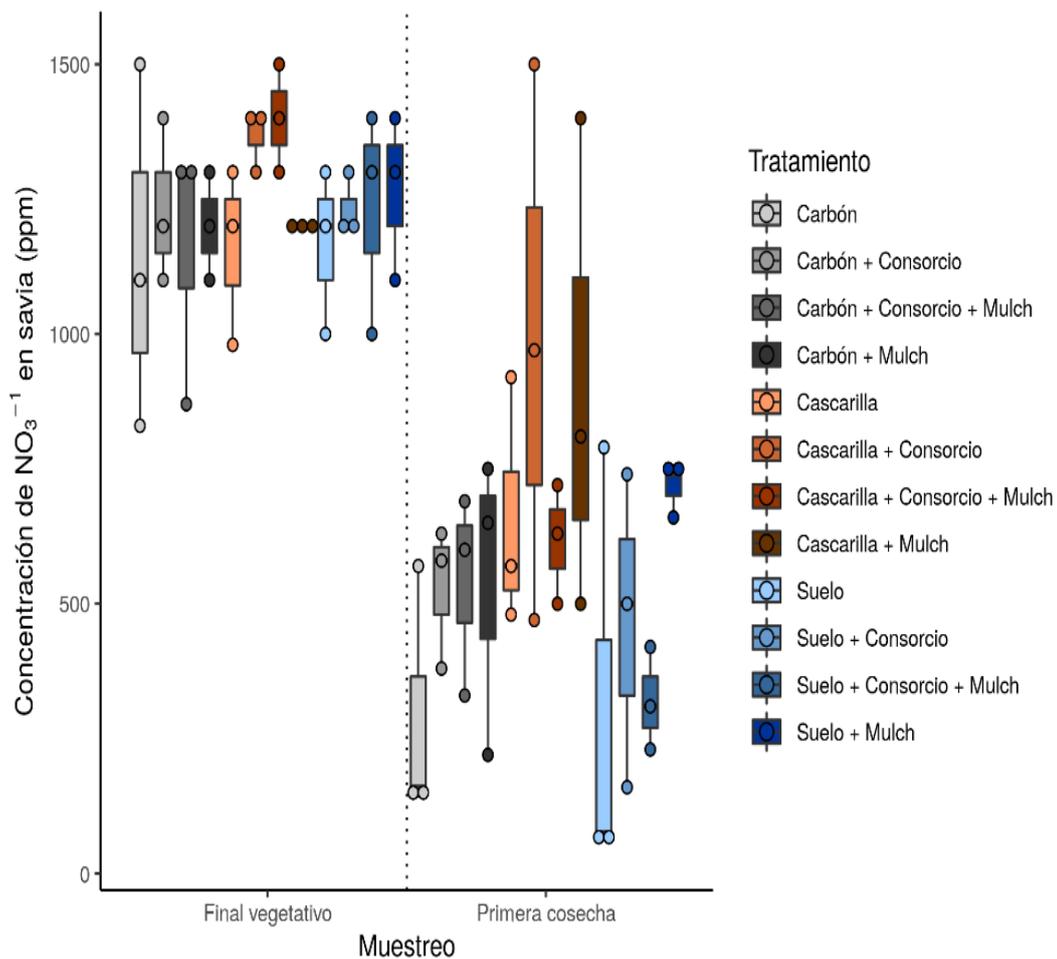
Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	34.57	17.28	1.522	0.2386
Consorcio	1	65.88	65.88	5.802	<b>0.0240</b> *
Mulch	1	40.75	40.75	3.588	0.0703
Sustrato: Consorcio	2	10.32	5.16	0.454	0.6403
Sustrato: Mulch	2	3.75	1.88	0.165	0.8487
Consorcio: Mulch	1	7.38	7.38	0.650	0.4281
Sustrato: Consorcio: Mulch	2	40.86	20.43	1.799	0.1870
Residuals	24	272.53	11.36		

**Tabla 19:** ANOVA de la variable índice de contenido de clorofila de la primera cosecha del cultivo



Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	614	307.2	1.459	0.2525
Consortio	1	1	1.0	0.005	0.9447
Mulch	1	1	0.6	0.003	0.9592
Sustrato: Consortio	2	50	25.2	0.120	0.8878
Sustrato: Mulch	2	1844	921.9	4.377	<b>0.0239</b> *
Consortio: Mulch	1	31	30.8	0.146	0.7055
Sustrato: Consortio: Mulch	2	62	30.9	0.147	0.8641
Residuals	24	5055	210.6		

En el caso de la concentración de  $\text{NO}_3^{-1}$  en la savia (Figura 13), las concentraciones al final del estado vegetativo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos durante el experimento (Tabla 20). Sin embargo, en la primera cosecha del cultivo si se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en el efecto del sustrato y también en la interacción consorcio  $\times$  mulch. En cuanto al efecto del sustrato, los sustratos enmendados con cascarilla y carbón registraron mayores niveles de  $\text{NO}_3^{-1}$  en savia que el suelo sin enmendar. Por otra parte, debido a la interacción entre el consorcio y el mulch, en el suelo sin enmendar y el suelo enmendado con cascarilla, las plantas con mulch e inoculadas con el consorcio registraron valores más bajos de  $\text{NO}_3^{-1}$  en savia, pero este efecto no fue observado en el suelo enmendado con carbón, en donde no se distinguieron diferencias derivadas de la presencia o no de mulch o de consorcios.



**Figura 13:** Contenido de nitrato en la sabia cultivadas bajo distintos tratamientos.

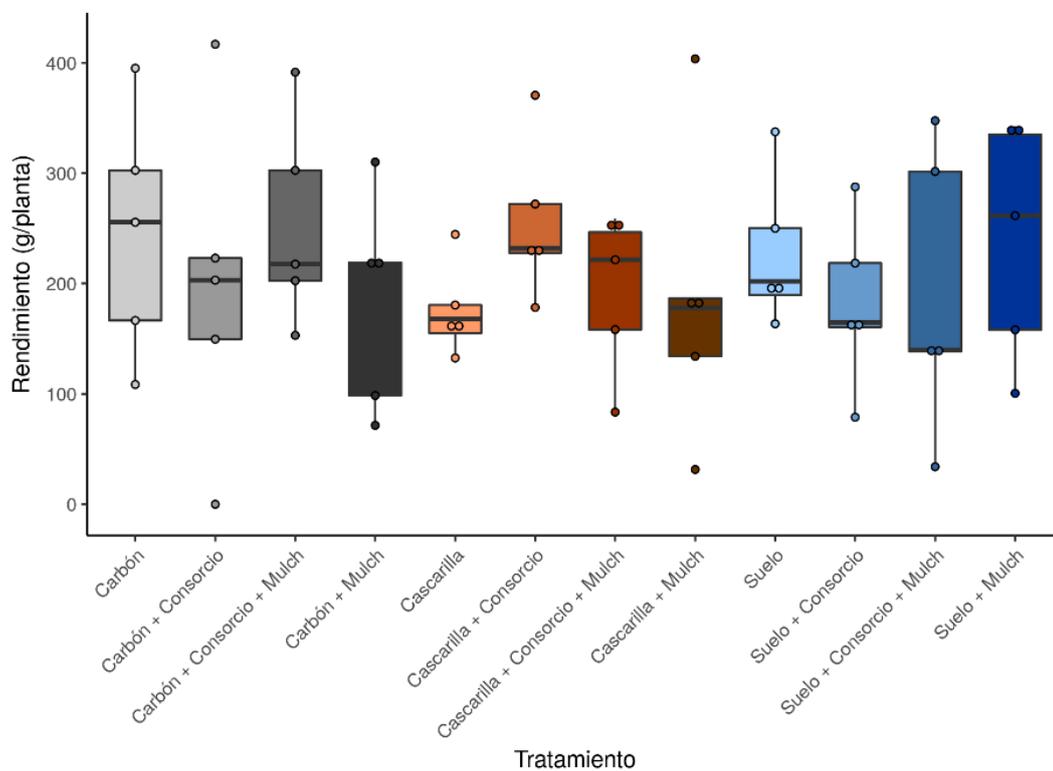
**Tabla 20:** ANOVA de la variable concentración de nitrato en la sabia del final del estado vegetativo del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	58467	29233	1.026	0.374
Consorcio	1	59211	59211	2.077	0.162
Mulch	1	5878	5878	0.206	0.654
Sustrato: Consorcio	2	67289	33644	1.180	0.324
Sustrato: Mulch	2	5956	2978	0.104	0.901
Consorcio: Mulch	1	14400	14400	0.505	0.484
Sustrato: Consorcio: Mulch	2	6467	3233	0.113	0.893
Residuals	24	684133	28506		

**Tabla 21:** ANOVA de la variable concentración de nitrato en la sabia de la primera cosecha del cultivo

Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	846626	423313	5.068	<b>0.0146</b> *
Consortio	1	306	306	0.004	0.9522
Mulch	1	41684	41684	0.499	0.4867
Sustrato: Consortio	2	87704	43852	0.525	0.5982
Sustrato: Mulch	2	71893	35947	0.430	0.6552
Consortio: Mulch	1	495851	495851	5.937	<b>0.0226</b> *
Sustrato: Consortio: Mulch	2	60226	30113	0.361	0.7010
Residuals	24	2004615	83526		

En la variable de rendimiento por planta (Figura 14), todos los tratamientos tuvieron un rendimiento similar y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 22).



**Figura 14:** Rendimiento por planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivadas bajo distintos tratamientos.

**Tabla 22:** ANOVA de la variable rendimiento del cultivo de tomate



Fuente de Variación	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
Sustrato	2	2921	1460	0.142	0.869
Consortio	1	108	108	0.011	0.919
Mulch	1	593	593	0.058	0.811
Sustrato: Consortio	2	21011	10505	1.023	0.367
Sustrato: Mulch	2	3384	1692	0.165	0.849
Consortio: Mulch	1	783	783	0.076	0.784
Sustrato: Consortio: Mulch	2	23035	11518	1.121	0.334
Residuals	48	492987	10271		

### 7.5. Propiedades biológicas del suelo

El perfil de diversidad en bacterias y hongos obtenido a través de electroforesis de fragmentos amplificados de ADN ribosomal en gradiente desnaturizante fue claramente observado en los geles, obteniéndose bandas definidas, de alta intensidad y buena distribución en el gel. Algunas bandas están presentes en todas las muestras analizadas, mientras que otras solo están en pocas muestras. Por otra parte, se destaca la presencia de bandas muy intensas, mientras que otras son más tenues (Anexo 2 y 3).

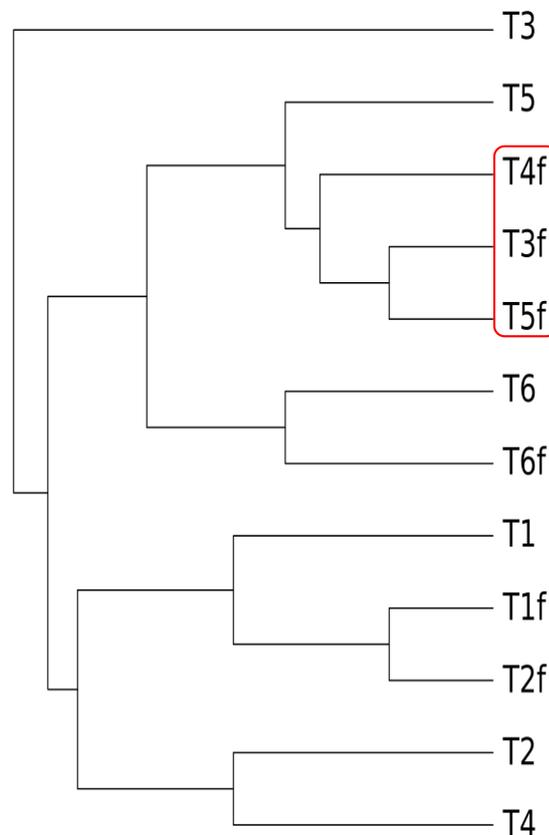
En cuanto a la riqueza de UTOs de bacterias se puede observar que no existe diferencia notable entre los tratamientos. Sin embargo en las muestras tomadas al final del experimento se puede apreciar un aumento de la riqueza en 7 tratamientos. Siendo el tratamiento 3 y 9 los que presentaron una mayor riqueza de especies bacterianas (Tabla 23).

**Tabla 23:** Riqueza de bacterias al inicio y fin de cada uno de los tratamientos.

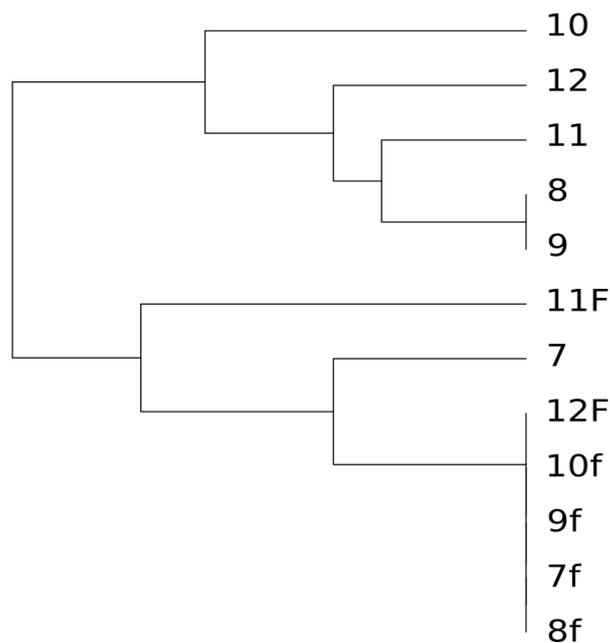
TRATAMIENTOS	COBERTURA	CONSORCIOS MICROBIANOS	RIQUEZA	
			Inicio	Fin
T1 Suelo Mineral	SI	SI	4	4
T2 Suelo Mineral	NO	SI	5	1
T3 Suelo Mineral	SI	NO	5	<b>12</b>
T4 Suelo Mineral	NO	NO	5	2
T5 Suelo Mineral + Biocarbon	SI	SI	4	3
T6 Suelo Mineral + Biocarbon	NO	SI	5	3
T7 Suelo Mineral + Biocarbon	SI	NO	2	4

T8	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	NO	1	6
T9	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	SI	2	<b>9</b>
T10	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	SI	2	3
T11	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	NO	2	8
T12	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	NO	2	8

En cuanto a la composición de las comunidades de bacterias, analizada usando el índice de similitud de Jaccard (Figura 15 y 16) no se observaron agrupamientos definidos para los tratamientos del 1 al 6, debido a que no existe ningún efecto de similitud de microorganismos entre estos tratamientos. No obstante, en los tratamientos 7 al 12, se observa un ligero agrupamiento de las muestras tomadas al final del experimento (f). Este ligero agrupamiento que se presentan con las muestras tomadas al final del experimento, se debe a la presencia de microorganismos similares entre los tratamientos T5f, T3f y T4f.



**Figura 15:** Dendrograma de bacterias (16s) de acuerdo al índice de similitud de jaccard



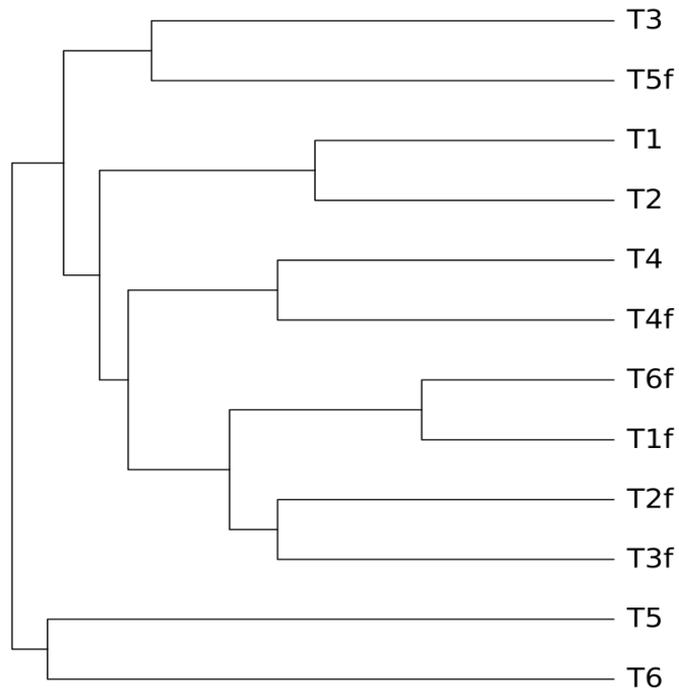
**Figura 16:** Dendrograma de bacterias (16s) de acuerdo al índice de similitud de jaccard.

En cuanto a la riqueza de hongos se puede observar que la inoculación de consorcios microbianos no tuvo ningún efecto en los tratamientos. Debido a que existe mayor riqueza de hongos en cada uno de los tratamientos al inicio, mientras que en la parte final de cada tratamiento existe menos riqueza de hongos (Tabla 24).

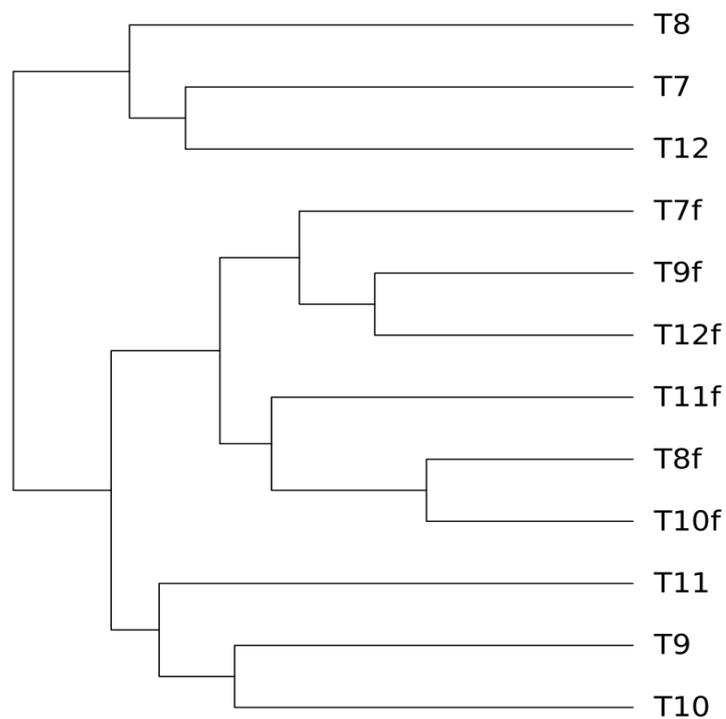
**Tabla 24:** Riqueza de hongos al inicio y fin de cada uno de los tratamientos.

	TRATAMIENTOS	COBERTURA	CONSORCIOS MICROBIANOS	RIQUEZA	
				Inicio	Fin
T1	Suelo Mineral	SI	SI	10	9
T2	Suelo Mineral	NO	SI	10	5
T3	Suelo Mineral	SI	NO	11	3
T4	Suelo Mineral	NO	NO	9	12
T5	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	SI	8	9
T6	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	SI	14	13
T7	Suelo Mineral + Biocarbon	SI	NO	9	7
T8	Suelo Mineral + Biocarbon	NO	NO	6	14
T9	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	SI	10	10
T10	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	SI	10	13
T11	Suelo Mineral + Cascarilla	SI	NO	11	9
T12	Suelo Mineral + Cascarilla	NO	NO	9	12

De acuerdo al análisis de composición de la región ITS de hongos (Figura 17 y 18) nuevamente se observaron agrupamientos medianamente definidos para las muestras tomadas al final del experimento



**Figura 17:** Dendrograma de hongos (ITS) de acuerdo al índice de similitud de jaccard



**Figura 18:** Dendrograma de hongos (ITS) de acuerdo al índice de similitud de jaccard



## 8. DISCUSIÓN

### Propiedades físicas - químicas del suelo

Para las variables correspondientes a las propiedades físicas – químicas del suelo como el pH y CE al final del cultivo, se pudo evidenciar una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre la interacción sustrato – mulch. En donde, el tratamiento cascarilla más mulch fue quien resalto más en las dos variables ya indicadas.

Nuestros resultados coinciden con lo que manifiesta Telenchana (2018) quien demostró que la cascarilla de arroz mejora las condiciones de nutrición, aireación, soltura y retención de humedad en el suelo. Mientras que Camacho (2016) en su estudio de Evaluación de sustratos alternativos a base de cascarilla de arroz y compost en plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) encontró una correlación altamente significativa entre CE, pH,  $K^+$  y P mediante la utilización de cascarilla de arroz como sustrato.

### Índices de crecimiento y desarrollo

Con respecto al diámetro del cuello de la planta se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la interacción entre el sustrato y el consorcio ( $p < 0.03$ ). Luna et al. (2013) y Hernández et al. (2010), trabajando con rizobacterias del género *Bacillus* inoculadas en plantas de tomate y pimiento en condiciones de invernadero, reportaron resultados similares a los de esta tesis, y sugirieron que esta interacción podría deberse al efecto que tiene el sustrato sobre las poblaciones microbianas. En las cuales se ha registrado un aumento significativo de la longitud de la planta, diámetro del tallo, biomasa foliar y radical con respecto a las no inoculadas.

### Índices de estado hídrico

Para la variable conductancia estomática al final del estado vegetativo del cultivo si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.04$ ) para la interacción (sustrato +



consorcio + mulch). Este resultado tiene concordancia con lo planteado por Amico et al. (2007), cual expone que las plantas tratadas con el inoculante líquido (*Glomus sp.*) presentan valores más altos de conductancia estomática. Por otra parte, el mismo autor recalca que la simbiosis micorrízica arbuscular puede afectar el balance hídrico de las plantas, tanto en condiciones de buen abastecimiento hídrico como expuestas a la sequía, siendo su principal efecto la alteración del comportamiento estomático.

Mientras tanto para la primera cosecha del cultivo también se pudo evidenciar una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.0005$ ) entre la interacción sustrato – consorcio. Esta interacción podría estar relacionado con las características del sustrato en el que se desarrolló el experimento, ya que el mismo se utiliza usualmente para la reproducción y el mantenimiento del consorcio (Echevarría et al., 2013). Además, el tratamiento cascarilla más consorcio fue quien resalto más en comparación de los demás tratamientos. Esto es debido a que la cascarilla de arroz cuenta con un alto contenido de lignina y fibra, siendo un sustrato ideal para el desarrollo de hongos; similares resultados se obtuvieron en el trabajo de (Tombion et al., 2016).

Examinando los resultados del contenido relativo de agua ( $P \leq 0.04$ ) y contenido de clorofila ( $P \leq 0.02$ ) durante la primera cosecha del cultivo se constató que existe una diferencia estadísticamente significativa para la interacción sustrato – mulch. Esta interacción se deben a que la cobertura del suelo con mulch de plástico, es un factor importante en el control de malezas y conservación de la humedad, lo que permite mantener un ambiente favorable para el desarrollo de raíces (Rodríguez, 2007). Lo cual concuerda con lo que manifiesta Maza & Villa (2011), que el carbón ayuda a la reestructuración del suelo mejorando sus propiedades físicas y la retención de agua del suelo.



## Índices nutricionales

Para el índice de contenido de clorofila al final del estado vegetativo del cultivo se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.02$ ) para la interacción sustrato  $\times$  consorcio. Producto de esta interacción, los tratamientos con consorcio tendieron a índices de contenido de clorofila más altos en el sustrato de suelo con carbón. Según en un estudio realizado por Maza & Villa (2011), expone que el carbón tiene la capacidad de ayudar al desarrollo de la microflora de los suelos y aumentar su actividad biológica. Por otra parte Bashan et al. (2004) indican que las aplicaciones de consorcios microbianos permiten a la planta una nutrición más balanceada y una mayor absorción de nutrientes. Así mismo Richardson et al. (2009), manifiestan que la inoculación con rizobacterias aumenta la absorción de nutrientes como Ca, K, Fe, Cu, Mn y Zn y que este incremento podría ser explicado por la producción de ácidos orgánicos por las plantas y las bacterias que disminuye el pH de la rizósfera y hacen solubles formas no disponibles de nutrimentos adyacentes a la raíz.

En el caso de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la savia, en la primera cosecha del cultivo si se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en el efecto del sustrato y también en la interacción consorcio  $\times$  mulch. Estos resultados concuerdan con Ncube et al. (2011) quienes manifiestan que aplicaciones combinadas de microorganismos eficientes (ME) en el cultivo del tomate, incrementaron el contenido de N en la planta y en el suelo. Además, los sustratos enmendados con cascarilla y carbón registraron mayores niveles de  $\text{NO}_3^-$  en la savia que el suelo sin enmendar. Estos resultados concuerdan con Telenchana (2018) quien reportó que la cascarilla de arroz posee un mayor porcentaje de N Total (0.98%), fósforo (0.108%), calcio (7.32%), magnesio (1%) y mayor presencia de cobre 39 ppm y zinc (98 ppm), lo que benefició el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate.



### **Estructura y composición de las comunidades microbianas**

En el análisis del DGGE se determinó que no existen diferencias relevantes en los índices de riqueza de hongos y bacterias de los tratamientos inoculados con consorcios microbianos. El cual concuerda con los resultados obtenidos por Riera (2017), donde menciona que no observaron diferencias significativas en los perfiles del DGGE en cada par de muestras, lo cual significa que las comunidades fúngicas y bacterianas son muy similares en los suelos manejados bajo los sistemas orgánicos y convencionales.

Además, otro estudio realizado por Llivicura & Pañi (2017), donde se comparó la diversidad de bacterias y hongos edáficos de cultivos de hortalizas orgánicos y convencionales usando la misma técnica utilizada en esta tesis obtuvieron resultados similares a los de nuestro estudio, registrando que no existieron diferencias significativas a nivel de las comunidades microbianas ni tampoco en las propiedades físico-químicas entre los dos sistemas de manejo evaluados.



## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 9.1. Conclusiones

Al realizar la aplicación de consorcios microbianos en el cultivo de tomate de mesa bajo diferentes sustratos, se evidenció que, si hubo cambios leves en las propiedades físico-químicas del suelo (pH, C.E), a excepción de la densidad aparente. En cuanto al índice de crecimiento y desarrollo la variable diámetro del tallo fue la que registró cambios estadísticamente significativos a diferencia de las variables altura y emisión foliar.

Referente al índice de estado hídrico, las variables conductancia estomática y contenido relativo de agua fueron quienes tuvieron mayor significancia teniendo una interacción entre sustrato - consorcio - mulch. De la misma manera el índice nutricional de la planta tuvo cambios significativos a nivel de la concentración de  $\text{NO}_3^{-1}$  en la savia y contenido de clorofila.

Además, el sustrato que mayor eficiencia tubo en casi todos los tratamientos fue la cascarilla de arroz en interacción con los consorcios microbianos. También se observó que en la mayoría de las variables analizadas predominó más la interacción sustrato  $\times$  mulch.

En cuanto a la diversidad de las comunidades de bacterias y hongos del suelo usando marcadores de ADNr se pudieron detectar diferencias claras entre los tratamientos. No obstante, el análisis de DGGE realizado indicó que existió una mayor riqueza de hongos a comparación de la riqueza de bacterias en cada uno de los tratamientos.

No obstante, por las limitaciones de la técnica empleada no es posible saber qué tipo de microorganismos estén presentes en esos suelos, debido a que pueden ser microorganismos patógenos, benéficos, antagonistas, oportunistas, etc.



## **9.2. Recomendaciones**

Los sitios de muestreo en los que se aplicaron las distintas combinaciones de sustratos y consorcios fue un cultivo de ciclo corto, por lo que es importante que se realice en el futuro más estudios debido a que tanto la aplicación de consorcios microbianos como la de sustratos es un proceso de transición o en un intervalo más prolongado de aplicación.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Álvarez, T., Bravo, E., & Armendaris, E. (2014). Soberanía alimentaria y acceso a semillas hortícolas en el Ecuador. *Revista de Ciencias de la Vida*, 45–57. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047265006.pdf>
- Amico, J., Fernández, F., Nicolás, E., López, L., & Sánchez, M. (2007). Respuesta fisiológica del tomate a la aplicación de dos inoculantes a base de *Glomus* sp por dos vías de inoculación diferentes. *Cultivos Tropicales*, 51–58. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193217731007.pdf>
- Angulo, V., Sanfuentes, E., Rodríguez, F., & Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina Microbiología*, 2-11. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213032862011.pdf>
- Armenta, A., García, C., Camacho, J., Apodaca, M., Montoya, L., & Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Universidad Autónoma Indígena de México Mochichahui*, 51–56.
- Asociación Vida Sana. (2014). Microorganismos del suelo y biofertilización. *Crops for Better Soil*, 1-43. Recuperado de [http://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5\\_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf](http://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf)
- Barea, J., Azcón, R., & Azcón, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient plant nutrient cycling and soli structure. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag, 195–212. Recuperado de [https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7\\_10](https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_10)
- Bashan, Y., Holguin, G., & Bashan, L. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 521–577. Recuperado de <https://doi.org/10.1139/w04-035>
- Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: mecanismos y aplicaciones. *Universidad de Sevilla*, 1–44.
- Brons, J., & Van, J. (2008). Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient get electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 17–27. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-07>
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 1–9.
- Camacho, O. (2016). Caracterización química de mezclas de materiales orgánicos y minerales con potencia de uso en cultivos sin suelo. *Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia*. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/55480/13/OscarIvánMonsalveC.2016.pdf>
- Cañón, D., & Sanabria, S. (2017). Evaluación de la acción de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* y *Lecanicillium lecanii* sobre el nematodo *Globodera*



- pallida Stone (Behrens) en plantas de papa variedad criolla galeras. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Bogota-Colombia. Recuperado de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/764/1/Trabajo%20de%20Grado%20Tesis%20Escrito.pdf>
- Colombo, C., Briceño, L., Valera, R., Godoy, J., Olivar, C., Olivar, R., & Puente, S. (2012). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. Universidad de los Andes, 275–281.
- Corrales, L., Caicedo, L., Gómez, M., Ramos, S., & Rodríguez, J. (2016). *Bacillus* spp: Una alternativa para la producción vegetal por dos caminos enzimáticos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá- Colombia, 1-21.
- Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas: Genomics and molecular biology*. Vrije Universiteit Brussel Belgium, 10-244.
- Dia, M., Wehner, T., & Arellano, C. (2017). RGXE: An R Program for Genotype x Environment Interaction Analysis. *American Journal of Plant Sciences*, 1-28. Recuperado de <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.87116>
- Echevarría, A., Fernández, K., Olalde, V., & Serrato, R. (2013). Diferencias en la respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Glomus* cúbense y con un conglomerado de especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). SCIELO. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S025859362013000200002&fbcid=IwAR0Z7QmEgmn4csZj7fvJF3FvRiDK0TovXz1lapNJ9ErfrJEgHXn26V6ffqE](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000200002&fbcid=IwAR0Z7QmEgmn4csZj7fvJF3FvRiDK0TovXz1lapNJ9ErfrJEgHXn26V6ffqE)
- FAO. (2015). La red trófica edáfica. Recuperado de [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/soils-2015/images/ES/Es\\_IYS\\_food\\_Print.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/soils-2015/images/ES/Es_IYS_food_Print.pdf)
- Ferrera, R., & Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 175–183. Recuperado de <https://doi.org/ISSN 1405-0269>
- Goettel, M., Koike, M., Kim, J., Aiuchi, D., Shinya, R., & Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. For management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 256–261. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009>
- Gutiérrez, A., Gavilán, R., Rubio, A., & Gavilán, R. (2014). Temporal variation in microbial and plant biomass during summer in a Mediterranean high – mountain dry grassland. *Plant and Soil*, 803–813. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1887-6>
- Grageda, O., Díaz, A., Peña, J., & Vera, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000600015](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000600015)
- Hernández, M., Hernández, F., Lira, R., & Gallegos G. (2010). Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. *Con Bacillus subtilis* y su efecto en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Agraria Nueva Época*, 1-9.
- Hernández, M., & Chailloux, M. (2004). Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Tropicales*, 1-9. Recuperado de



<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217832001>

- Ibáñez, J. (2018). La inteligencia de las plantas y el ensamblaje de sus rizósferas: conversaciones mutualistas entre raíces y los microorganismos del suelo (rizósferas) un universo invisible bajo nuestros pies. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Recuperado de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2018/04/27/149561>
- INIA. (2012). Plataforma de bioinsumos de uso agrícola en base a microorganismos benéficos. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2085/1/18429300612191129.pdf>
- Izquierdo, J. (2017). Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia San Joaquín. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, Cuenca-Ecuador, 13-67.
- Janse, I., Bok, J., & Zwart, G. (2004). A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 279–281. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.12.006>
- Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis *Methods. Applied and environmental microbiology*, 54–59. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>
- Lira, R. (2018). Uso de biofertilizantes en la agricultura ecológica. Intagri S.C. Recuperado de <https://www.intagri.com/articulos/agricultura-organica/uso-de-biofertilizantes-en-la-agricultura-ecologica#>
- Liu, J., Yu, Y., Cai, Z., Bartlam, M., & Wang, Y. (2015). Comparison of ITS AND 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1387–1395. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1890-6>
- Llivicura, M., & Pañi, M. (2017). Metagenómica de las comunidades microbianas en suelos hortoflorícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional, Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador, 15-50. Recuperado de [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26808/4/TESIS\\_Hortofloricolas.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26808/4/TESIS_Hortofloricolas.pdf)
- López, L., Carcaño, M., Tapia, A., Jiménez, T., & Gutiérrez, A. (2015). Importancia de la diversidad microbiana en el suelo. *Saberes y ciencias*. Recuperado de <http://saberesyciencias.com.mx/2015/02/10/importancia-de-la-diversidad-microbiana-en-el-suelo/>
- Luna, L., Martínez, R., Hernández, M., Arvizu, S., & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnica mexicana*. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000100007&fbclid=IwAR1o3OA3nx86lHAWBiLdUHciPjpuFPZpJPQr0-34J0W3tLkph00peA21bJc](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100007&fbclid=IwAR1o3OA3nx86lHAWBiLdUHciPjpuFPZpJPQr0-34J0W3tLkph00peA21bJc)
- Martinez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001)



- Maza, G., & Villa, M. (2011). Producción de tomate de mesa (*Lycopersicum esculentum*, Miller), utilizando la mezcla de diferentes sustratos. Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador, 8-120. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3033/1/tag295.pdf>
- Medina, L. (2016). La agricultura, la salinidad y los hongos micorrícicos arbusculares: una necesidad, un problema y una alternativa. *Cultivos Tropicales*, 42–49. Recuperado de <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1117.9765>
- Muyzer, G., Waal, E., & Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 695–700. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Ncube, L., Mnkeni, P., & Brutsch, M. (2011). Agronomic suitability of effective microorganisms for tomato production. *African Journal of Agricultural Research*, 1-5. Recuperado de <https://doi.org/10.5897/AJAR10.515>
- Núñez, C. (2016). Efecto de la biofertilización con *Azotobacter chroococcum* en el crecimiento y rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivados en condiciones de invernadero. *Centro de investigación en Química Aplicada*, 15–81.
- Olalde, V., & Aguilera, L. (1998). Microorganisms and Biodiversity. *Terra Larinoamericana*, 289–292. Recuperado de <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/16/3/art289-292.pdf>
- Oseas, A., & Jiménez, J. (2017). Rendimiento del tomate Saladet (*Solanum Lycopersicum*) con la aplicación de microorganismos benéficos en Yucatán. *Revista de Operaciones Tecnológicas*, 1-9. Recuperado de [www.ecorfan.org/taiwan](http://www.ecorfan.org/taiwan)
- Páez, O. (2006). Uso agrícola del *Trichoderma*. *Soil Fertility*. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=VE2007400597>
- Pedraza, R., Teixeira, K., Scavino, A., Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V., & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 155-164. Recuperado de [https://doi.org/10.21930/rcta.vol11\\_num2\\_art:206](https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:206)
- Pérez, S., Coto, O., Ii, A.
- Pichisaca, M. (2003). El cultivo de tomate de riñón en invernadero (*Solanum lycopersicum*). *Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC)*, 9-59.
- Poulton, J., Bryla, D., Koide, R., & Stephenson, A. (2002). Mycorrhizal infection and high soil phosphorus improve vegetation growth and the female and male functions in tomato. *New Phytologist Trust*, 255–264. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00366.x>
- Ramyasmruthi, S., Pallavi, O., Pallavi, S., Tilak, K., & Srividya, S. (2012). Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 1–9.
- Richardson, A., Barea, J., McNeill, A., & Prigent, C. (2009). Acquisition of phosphorus and



- nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 305–339. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Riera, C. (2017). Diversidad de las comunidades de bacterias y hongos en suelos de cultivos frutales andinos bajo manejo orgánico y convencional. Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador, 13-84. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/handle/123456789/26386>
- Rodríguez, G. (2007). Efecto de la cobertura del suelo con cascarilla de arroz en el crecimiento y rendimiento del tomate de ramillete. *Ciencia e Investigación Agraria*, 225-230.
- Sade, N., Galkin, E., & Moshelion, M. (2015). Measuring Arabidopsis, tomato and barley leaf relation water content (RWC), 9–12. Recuperado de <http://www.bio-protocol.org/e1451>
- Simbaqueba, J. (2015). Mapeo de genes candidatos involucrados en la inducción de resistencia sistémica y promoción de crecimiento por *Trichoderma koningii* en tomate. *Bio-protocol*, 1–67.
- SIPA. (2016). Boletín situacional del cultivo de tomate de riñón. Recuperado de <http://sipa.agricultura.gob.ec>
- SIPA. (2018). Cifras agro productivas. Recuperado de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Soriano, F. (2012). Uso de microorganismos en la agricultura. Asociación Española de Fabricantes de Agronutrientes (AEFA). Recuperado de <https://aefa-agronutrientes.org/uso-de-microorganismos-en-la-agricultura>
- Telenchana, J. (2018). Evaluación de sustratos alternativos a base de cascarilla de arroz y compost en plántulas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/27192>
- Tombion, L., Puerta, A., Barbaro, L., Karlanian, M., Sangiacomo, M., & Garbi, M. (2016). Características del sustrato y calidad de plantines de lechuga (*Lactuca sativa* L.) según dosis de lombricompost. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 46-52.
- Terry, E., & Leyva, A. (2006). Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas - rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense*, 65–73.
- Tolosa, D., & Lizarazo, L. (2014). Microbial Populations Associated with the Rhizosphere and Phyllosphere Plants of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Revista de ciencias*, 27–38.
- García, J. (2017). Biofertilizantes, ventajas y desventajas. Recuperado de <https://mx.blastingnews.com/tecnologia/2017/06/biofertilizantes-ventajas-y-desventajas-001806021.html>
- USDA. (1999). Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo. 1–88. Recuperado de [https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/stelprdb1044786.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/stelprdb1044786.pdf)
- Vera, A. (2010). Influencia de endomicorrizas nativas en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicom*). Universidad de Guayaquil, Guayaquil-Ecuador, 18-113. Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/40197/D79398.pdf?s>



equence=1&isAllowed=y.

- Villegas, M. (2005). Trichoderma pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotech USA. Recuperado de [https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma\\_pers.\\_Caracter%C3%ADsticas\\_generales\\_y\\_su\\_potencial\\_biol%C3%B3gico\\_en\\_la\\_agricultura\\_sostenible](https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible).
- Wu, B., Tian, J., Bai, C., Xiang, M., Sun, J., & Liu, X. (2013). The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the changjiang river and sites in China. ISME Journal, 1299–1309. Recuperado de <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.29>



## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN de suelos.

**Extracción de ADN de suelos para análisis de baja resolución basados en fingerprinting (ISOm)**

DNA-extraction-Soil-ISOm.tex  
Modificado: 17/01/2020  
E. Chica

**Descripción**

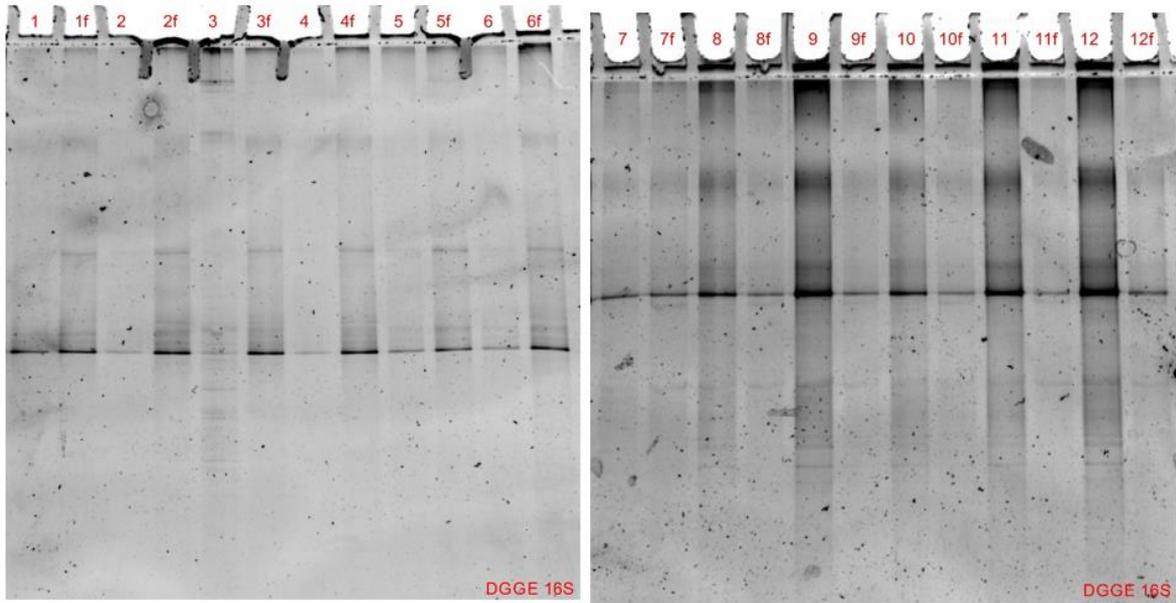
Extracción simple y relativamente rápida de ADN de suelos basada en el estándar ISO11063 posteriormente modificado (ISOm). Los protocolos fueron inicialmente desarrollados por Martin-Laurent et al. (2001), evaluados por Petric et al. (2011) y modificados para mejorar la representación taxones no bacterianos por Plassart et al. (2012). El protocolo es aparentemente válido para extraer ADN que será posteriormente analizados usando métodos basados en fingerprinting (e.g. DGGE, RISA, RFLPs); no obstante su uso ha sido cuestionado para métodos basados en secuenciación masiva (Wüst et al., 2016). Este protocolo produce ADN que requiere purificación por electroforesis.

Materiales	Notas
<ul style="list-style-type: none"><li>Perlas de vidrio 106 <math>\mu\text{m}</math></li><li>Perlas de vidrio 2 mm</li><li>Tubos de 2 mL (<math>\times 2</math>)</li><li>Tubos de 1.5 mL (<math>\times 2</math>)</li><li>Buffer de lisis (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% Polivinilpirrolidona 40 g/mol, 2% SDS)</li><li>Buffer TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)</li><li>Agua ultrapura</li><li>Acetato de sodio 3M</li><li>Etanol 96 % frío</li><li>Etanol 70 % frío</li><li>Vórtex</li><li>Termobloque</li><li>Centrifuga</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Antes de iniciar, preparar el baño María a 65°C.</li><li>Para preparar 100 ml de buffer TE, mezclar 1 ml de solución stock 1M de Tris HCl pH 8.0, 200 <math>\mu\text{l}</math> de solución stock 0.5M de EDTA.</li><li>Para preparar 100 ml de buffer de lisis, mezclar 10 mL de solución stock 1M de Tris HCl pH 8.0, 20 mL de solución stock 0.5M de EDTA, 0.584 g NaCl, 2 g de polivinilpirrolidona, 10 ml de solución stock de SDS 20 %</li></ul>

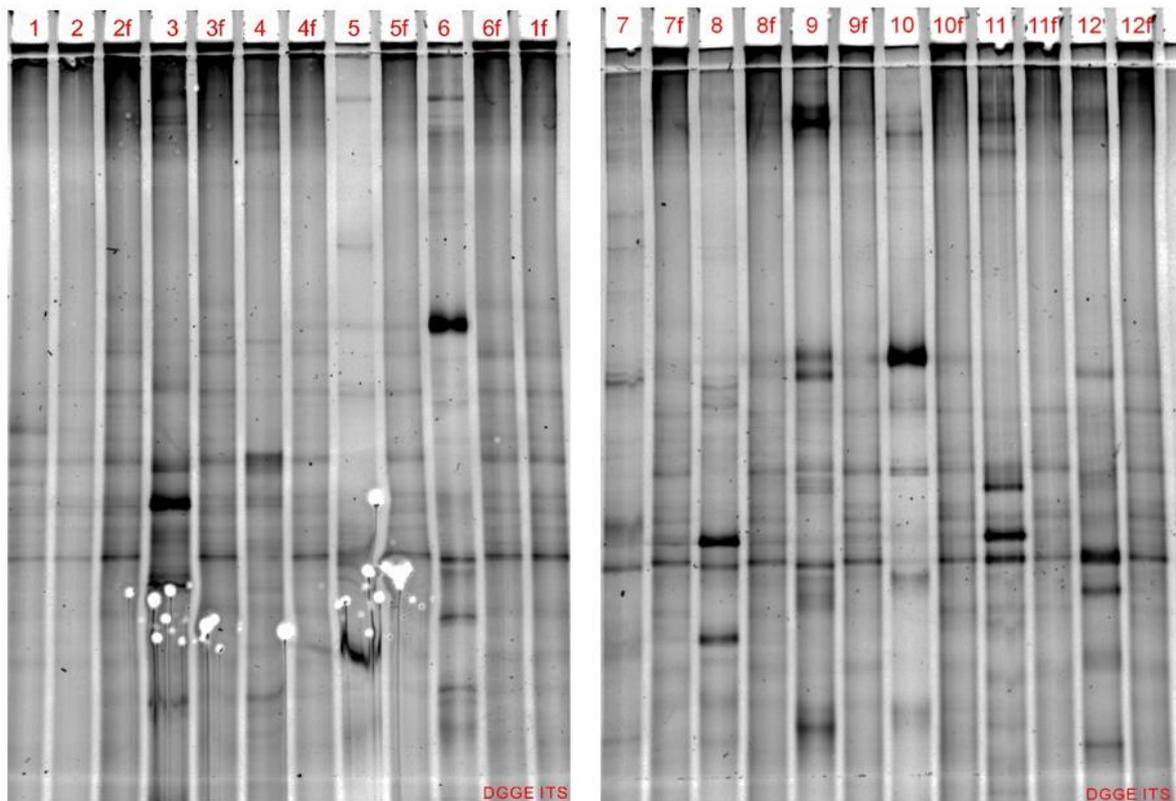
**Procedimiento**

- 1 Pesar 0.25 g de suelo en tubos de 2 ml.
- 2 Añadir 0.25 g de perlas de vidrio de 106  $\mu\text{m}$  y 3 perlas de 2 mm.
- 3 Añadir 1 ml de buffer de lisis.
- 4 Homogeneizar tres veces por 30 segundos a máxima velocidad.
- 5 Incubar 30 minutos a 65°C agitando en vórtex cada 10 minutos.
- 6 Centrifugar a 7000  $\times g$  por 5 minutos a 20°C.
- 7 Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL.
- 8 Añadir 0.1 volúmenes ( $\approx 60 \mu\text{L}$ ) de acetato de sodio 5M y mezclar por vórtex.
- 9 Incubar en hielo por 10 minutos. Durante esta incubación, programar la centrifuga para trabajar a 4°C.
- 10 Centrifugar a 12000  $\times g$  por 5 minutos a 4°C
- 11 Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL.
- 12 Añadir >2 volúmenes de etanol 96 % frío (-20°C).
- 13 Incubar a -20°C >12 h.
- 14 Centrifugar a 12000  $\times g$  por 5 minutos a 4°C
- 15 Eliminar el sobrenadante
- 16 Lavar el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % frío (-20°C).
- 17 Centrifugar a 12000  $\times g$  por 5 minutos a 4°C
- 18 Resuspender el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura o buffer TE.
- 19 Purificar por electroforesis y recuperar el ADN en el gel.

*Anexo 2: Perfil de diversidad del gen 16S ADNr, con gradiente desnaturalizante.*



*Anexo 3: Perfil de diversidad de la región ITS de hongos con gradiente desnaturalizante.*



*Anexo 4: Inoculación del consorcio microbiano en cada uno de los tratamientos.*

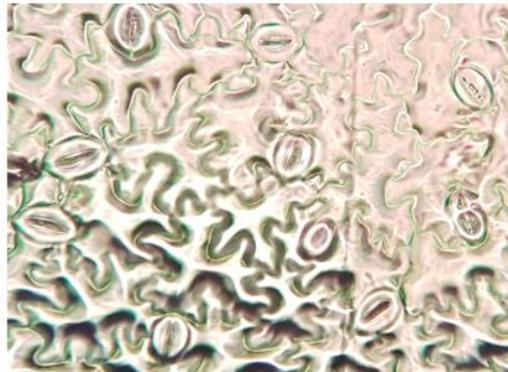
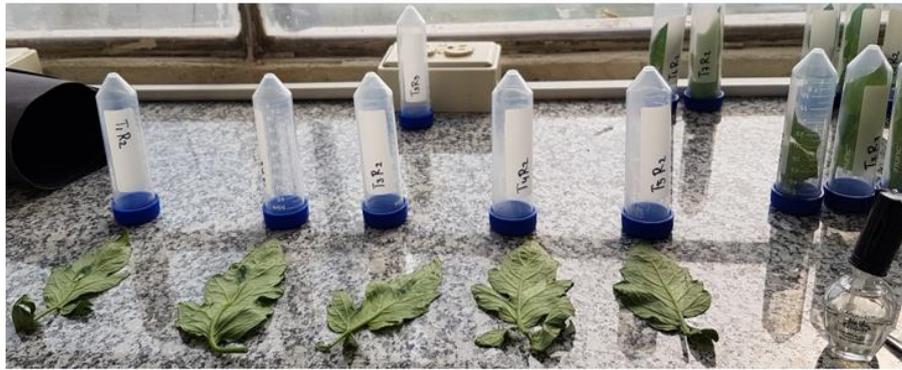


*Anexo 5: Toma de datos de las variables del índice de crecimiento y desarrollo.*



*Anexo 6: Toma de datos de las variables del índice hídrico y nutricional de cada uno de los tratamientos.*

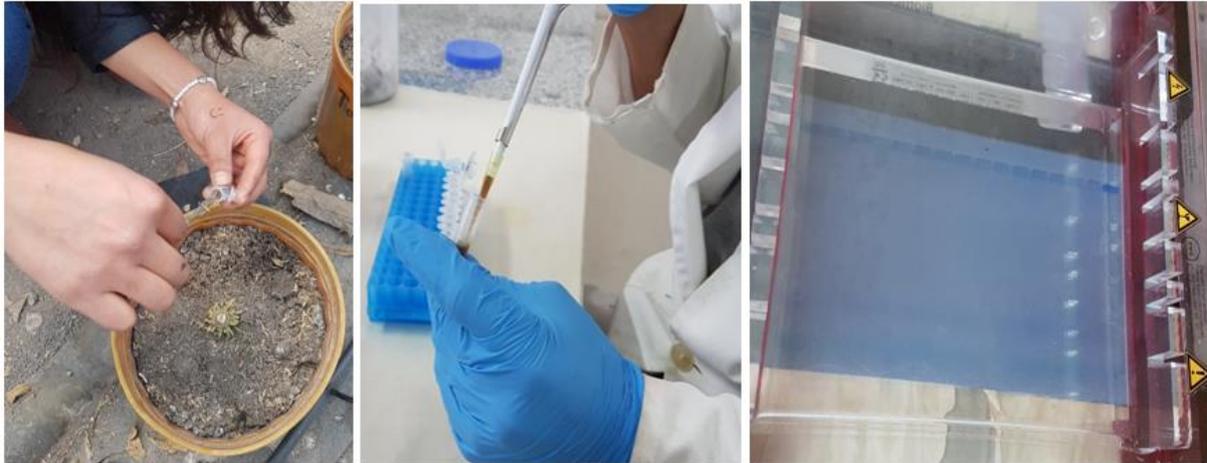




*Anexo 7: Análisis de laboratorio de las variables pH y CE.*



*Anexo 8: Extracción de ADN y amplificación por electroforesis en gel de agarosa.*



*Anexo 9: Equipos utilizados en el laboratorio para PCR y DGGE*



CENTRIFUGADORA



ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PCR



EQUIPOS UTILIZADOS EN LA APLICACIÓN DE DGGE



CAMARA PARA PCR



TERMOCLADADOR



EQUIPO PARA REVELAR IMÁGENES DE DGGE