

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFEECTO DE SUSTRATOS ENRIQUECIDOS CON RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTINES DE TOMATE**

Tamara Rojas Contreras

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

Título

**EFEECTO DE SUSTRATOS ENRIQUECIDOS CON RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTINES DE TOMATE**

Tamara Rojas Contreras

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Título

**EFEECTO DE SUSTRATOS ENRIQUECIDOS CON RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLANTINES DE TOMATE**

**EFFECT OF SUBSTRATES ENRICHED WITH PLANT GROWTH
PROMOTING RHIZOBACTERIA IN TOMATO SEEDLINGS**

Tamara Rojas Contreras

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Título

**Efecto de sustratos enriquecidos con rizobacterias
promotoras de crecimiento en plantines de tomate**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniera Agrónoma

Mención: Fitotecnia

Tamara Rojas Contreras

| | Calificaciones |
|---|----------------|
| Profesor Guía Sr. Ricardo Pertuzé C. Ingeniero Agrónomo, Ph. D. | 6,8 |
| Profesores Evaluadores Sra. Verónica Díaz M. Ingeniero Agrónomo, M. S. | 6,5 |
| Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, MSc. | 6,4 |
| Colaboradores Lucrecia Brutti Ingeniera Agrónoma, M.S. Ph. D | |
| Pablo Alvarado V. Ingeniero Agrónomo, M.S. | |

Santiago, Chile

2010

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi sustento, mi roca y mi motor

A mis padres y hermanos mis mejores referentes y los pilares de lo que soy

A mi esposo, la luz y alegría de mi corazón

Agradecer sinceramente a los profesores Ricardo Pertuzé, Pablo Alvarado, Lucrecia Brutti, Oscar Seguel y Verónica Díaz de quienes sentí un verdadero apoyo y cariño. Su vocación ha sido para mí una gran inspiración.

Agradecer a mis grandes amigos, por el apoyo incondicional y por hacer de estos años una linda aventura.

Gracias a Ecoplantas Ltda., Biogram S.A. y a todos quienes hicieron posible la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| PALABRAS CLAVES | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| KEY WORDS | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| HIPÓTESIS | 5 |
| OBJETIVO GENERAL | 6 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| LUGAR DE ESTUDIO | 7 |
| MATERIALES | 7 |
| <i>Material vegetal</i> | 7 |
| <i>Sustratos</i> | 7 |
| <i>Inoculantes</i> | 8 |
| MÉTODOS | 8 |
| <i>Tratamientos y Diseño experimental</i> | 8 |
| <i>Montaje Ensayo</i> | 9 |
| Preparación de sustratos..... | 9 |
| Preparación de bandejas..... | 10 |
| Siembra..... | 10 |
| Germinación..... | 11 |
| Desarrollo..... | 11 |
| <i>Caracterización de los sustratos</i> | 11 |
| (a) Determinación densidad real..... | 11 |
| (b) Determinación densidad aparente..... | 11 |
| (c) Curva de retención de agua..... | 11 |
| (d) Determinación de porosidad..... | 12 |
| (e) Determinación de Conductividad eléctrica (CE)..... | 12 |
| (f) Determinación del pH..... | 12 |
| (g) Determinación de toxicidad frente a germinación..... | 13 |
| <i>Evaluaciones del material vegetal</i> | 13 |
| Desarrollo del cultivo..... | 13 |
| (a) Emergencia..... | 13 |
| (b) Cotiledón expandido..... | 13 |
| (c) Hojas verdaderas (primera, segunda y tercera)..... | 13 |
| Crecimiento del cultivo..... | 14 |
| (a) Diámetro del tallo (mm)..... | 14 |
| (b) Largo tallo (cm)..... | 14 |
| (c) Área foliar (cm ²)..... | 14 |
| (d) Área raíz (cm ²), largo raíz (cm), volumen de raíz (cc) y ramificaciones radicales (n°)..... | 14 |
| (e) Materia seca aérea y radical (g)..... | 14 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 15 |
| RESULTADOS | 16 |
| CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS | 16 |
| <i>Parámetros Físicos</i> | 16 |
| <i>Parámetros Químicos</i> | 18 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Parámetros Biológicos</i> | 21 |
| EVALUACIONES DEL MATERIAL VEGETAL | 23 |
| <i>Evaluación del desarrollo del material vegetal</i> | 23 |
| Emergencia..... | 23 |
| Cotiledón expandido..... | 24 |
| Primera, segunda y tercera hoja verdadera..... | 26 |
| <i>Evaluaciones de crecimiento del material vegetal</i> | 27 |
| Parámetros Aéreos | 27 |
| Largo tallo..... | 27 |
| Diámetro tallo..... | 28 |
| Área foliar..... | 29 |
| Peso fresco aéreo..... | 31 |
| Peso seco aéreo..... | 32 |
| Parámetros Radicales | 33 |
| Largo radical..... | 33 |
| Volumen radical..... | 34 |
| Ramificaciones radicales..... | 35 |
| Área radical..... | 36 |
| Peso fresco radical..... | 36 |
| Peso seco radical..... | 37 |
| CONSIDERACIONES FINALES | 41 |
| <i>Respecto al desarrollo del cultivo</i> | 42 |
| <i>Resultados marginales detectados en Bacillus subtilis y Pseudomonas fluorescens</i> | 42 |
| <i>Mecanismos de acción que justifican los resultados obtenidos</i> | 43 |
| <i>Resultados promisorios con la sumatoria de rizobacterias y hongos</i> | 44 |
| <i>Implicancias de los resultados en fertilización y aplicación de plaguicidas</i> | 45 |
| <i>Comparación de resultados en sustratos con compost y sin este</i> | 46 |
| <i>Proyecciones del uso de rizobacterias</i> | 47 |
| CONCLUSIONES | 49 |
| BIBLIOGRAFÍA | 50 |
| APÉNDICE | 58 |

RESUMEN

Con el objeto de evaluar el efecto en el crecimiento y desarrollo de plantines de tomate “María Italia” al utilizar sustratos enriquecidos con rizobacterias, se realizó una investigación en la plantinera Eco-plantas Ltda. ubicada en la comuna de Malloco, Región Metropolitana, durante la producción invernal del año 2009.

El estudio consideró un diseño experimental de parcelas divididas completamente al azar. Para ello se establecieron 2 parcelas principales correspondientes a 2 sustratos a base de turba y perlita, uno con compost y el otro sin compost y 4 sub-parcelas correspondientes una a la inoculación con *Bacillus subtilis*; otra inoculada con *Pseudomonas fluorescens*, una tercera sub-parcela inoculada con ambas bacterias más *Trichoderma harzianum*, Notocarda, levaduras y extracto de alga (Bioroot®) y finalmente una subparcela testigo sin inocular. Todo esto dentro de un universo muestral de 12 bandejas alveoladas de 286 celdas, cada bandeja conformada por los 4 tratamientos, con un total de 6 repeticiones por cada sustrato.

Previo a la siembra se caracterizaron en todos los tratamientos los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica, toxicidad, densidad aparente y real y porosidad.

Desde mayo a julio del año 2009 se llevó un registro de los estados de desarrollo: emergencia, cotiledón expandido, primera a tercera hoja verdadera. Una vez finalizada la etapa de plantín a tercera hoja verdadera, se evaluó peso fresco y seco (aéreo y radical), diámetro de tallo, largo foliar y radical, área foliar y radical, volumen radical y bifurcaciones radicales. De los resultados obtenidos se observó que el enriquecimiento de sustratos con rizobacterias estimuló el crecimiento de plantines de tomate, no así el desarrollo de éstos.

Los plantines del sustrato sin compost presentaron un mayor crecimiento que aquellos con compost. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el desarrollo final de los plantines.

De las rizobacterias empleadas, el sustrato inoculado con el conjunto de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, Notocarda, levaduras y extracto de alga fue el que presentó el mayor crecimiento total al final del período de plantín.

Palabras claves

PGPR, rizósfera, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Solanum lycopersicum* L.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect on growth and development of "María Italia" tomato seedlings when using rhizobacteria enriched substrates, an investigation was conducted in "Eco-plantas Ltd." nursery, located in Malloco district, región Metropolitana, during 2009 winter production.

The experiment consisted of a split-plot experimental design completely random. This two main plots were established with two substrates based on peat and perlite, one with and one without compost and four sub-plots, one with inoculation of *Bacillus subtilis*, another with *Pseudomonas fluorescens*, a third sub-plot inoculated with *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, Notocarda, yeast and seaweed extract and a last control sub-plot without inoculation. All this within a universe of 12 trays dimpled sample of 286 cells, each tray formed by the four treatments, with a total of six repetitions for each substrate.

Before planting, all treatments were characterized for pH, electrical conductivity, toxicity, apparent and real density and porosity.

From May to July 2009 the developmental stages were recorded: emergency, expanded cotyledon, first, second and third true leaf of tomato seedlings.

Once the third true leaf was obtained, foliar and root fresh and dry weight, stem diameter, foliar and root length, leaf and root area, root volume and forks were evaluated

The results obtained showed that the enrichment of substrates with rhizobacteria stimulated the growth of tomato seedlings, but didn't develop them.

The seedlings of the substrate without compost had higher growth than those with compost. However, there were no significant differences in the final development of seedlings.

From the used rhizobacteria, the substrate inoculated with the set of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, Notocarda, yeasts and seaweed extract was the one who had the highest overall growth at the end of the seedling period.

Key words

PGPR, rhizosphere, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Solanum lycopersicum* L.

INTRODUCCIÓN

La producción industrial de plantines tuvo su gran expansión en la segunda mitad del siglo XX en Europa y luego en Estados Unidos, y surgió de la necesidad de producir cultivos rentables en pequeñas superficies, contar con una mayor cantidad y calidad de productos cerca de los grandes centros de consumo, obtener cultivos en una época más temprana y disminuir las cuantiosas pérdidas por patógenos del suelo (Valenzuela y Gallardo, 2003). La expansión industrial de plantines permitió que la producción de hortalizas alcanzara mayor protagonismo en la agricultura. Según estimaciones de ODEPA, en Chile, en la temporada 2003/2004, de un total de 17.900 ha cultivadas de tomate *Solanum lycopersicum* L., 6.000 ha fueron al aire libre para consumo en fresco, 1.500 ha de tomate en invernadero y 10.400 ha para producción industrial, lo que posiciona al tomate como la hortaliza con mayor superficie en Chile (Tapia, 2005).

Los volúmenes de tomate que llegan a los mercados mayoristas en Santiago superan las 60.000 t y se exportan 233 t frescas que equivalen a 236.000 US\$ (Enero-Septiembre 2008). La distribución del cultivo a lo largo de Chile se concentra desde la V-VII regiones y el consumo per cápita/año es de 30 kg, incluyendo el tomate procesado (ODEPA, 2008). Es bajo este escenario económico que la utilización del sistema almácigo y trasplante en el tomate cobra especial importancia considerando que la semilla tiene un alto precio, y la oferta nacional no alcanza a satisfacer los requerimientos, debiendo importarse 2 t en el 2008, con un valor aproximado de US\$ 4.073.000 (ODEPA, 2008).

La utilización del sistema de almácigo y trasplante, producto de todo lo anteriormente señalado, requiere de una serie de detalles productivos; es una técnica muy difundida en sistemas hortícolas intensivos, debido a la mejor planificación de siembras, crecimiento y ganancia de tiempo, por llevar a campo plantas con estructuras preformadas (Ullé, 2003). Esta industria aspira a ofrecer plantines de óptima calidad. Vavrina *et al.* (2004), señalan que un plantín de óptima calidad es aquel vigoroso, libre de plagas y con un buen desarrollo radical.

Sin embargo, producir plantines de óptima calidad no es una tarea fácil, pues depende de múltiples factores. El principal factor del cual depende el éxito de un cultivo en almácigo es la calidad del sustrato escogido (Ansorena, 1994). El término sustrato se refiere a todo material, natural o sintético, mineral u orgánico, de forma pura o mezclado, cuya función principal es servir como medio de crecimiento y desarrollo a las plantas, permitiendo su anclaje y soporte a través del sistema radical, favoreciendo el suministro de agua, nutrientes y oxígeno (Calderón, 2006). En los últimos años se ha observado una considerable disminución de materiales comúnmente utilizados en la elaboración de sustratos, especialmente turba. Esta situación ha llevado a los productores a buscar sustratos alternativos. La búsqueda se ha orientado básicamente a materiales que se encuentren en grandes volúmenes y en forma natural (Messerer, 1998). Bajo este concepto cobran relevancia los sustratos alternativos con la incorporación de compost, por la sustentabilidad, los bajos costos y el efecto positivo sobre la biología del suelo según señala Julca *et al.* (2006).

La principal razón por la que el sustrato es tan importante para la producción de plantines de calidad es porque según Ansorena (1994), un plantín de buena calidad depende en gran medida de una buena formación de raíces, lo cual se logra propagando en un medio nutritivamente adecuado desde la siembra hasta el trasplante, esto se traduce al final en un buen crecimiento y desarrollo radical del cultivo.

La raíz habita en una zona denominada rizósfera, definida por Honorato (2000) como “el volumen de suelo, inmediato a la raíz, en que la población microbiana está condicionada por la presencia de las raíces de las plantas y donde se genera una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes significativa, en beneficio de las plantas. En la rizósfera hay una serie de compuestos orgánicos, tales como exudados de bajo peso molecular, secreciones, mucigeles y lisatos”. La rizósfera es un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica (Reyes *et al.*, 2008). En los microambientes de esta zona están asentadas poblaciones microbianas asociadas a la presencia de exudados radicales y que participan en la formación de microagregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos, principalmente aminoácidos y polisacáridos (Caesar-TonThat *et al.*, 2007). De los microorganismos del suelo, las bacterias son los más abundantes, formando poblaciones de más de 10^9 ufc (unidades formadoras de colonias) por gramo seco de suelo, de ahí la importancia de conocer y aplicar aquellas bacterias que producen estimulación radical (Garbaye, 1994). A las bacterias de la rizósfera que colonizan las raíces se les conoce como rizobacterias (Schrothy Hancock, 1982).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (RPCP) son bacterias benéficas que se presentan como una alternativa a los plaguicidas y fertilizantes químicos (Kloepper y Beauchamp, 1992).

En las últimas décadas la forma más común de incorporar nutrientes al suelo es a través de fertilizantes químicos. El uso indiscriminado de estos insumos inorgánicos ha alterado significativamente los constituyentes orgánicos y vivos del suelo y con ello su equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema (Reyes *et al.*, 2008). Es por ello que en el último tiempo se han requerido procesos agrícolas ecológicamente sostenibles en el tiempo, lo que implica potenciar los ciclos naturales de la vida. Esto nace a raíz de la disminución paulatina de la biodiversidad, derivado de la agresividad de productos usados por el hombre y el mal manejo de ellos, afectando a los microorganismos habitantes de la rizósfera (UNSE, 2003). Todo esto ha motivado a mejorar la comprensión de las actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas (Barea *et al.*, 2005).

Hoy en día las rizobacterias como biofertilizantes son considerados un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de los tejidos de la planta (micorrizas y bacterias noduladoras) y promueven su crecimiento aumentando la

disponibilidad de los nutrientes y la sanidad de la planta hospedera (Vessey, 2003). En pruebas experimentales y de campo el efecto de los biofertilizantes ha sido reconocido como una forma de manejo sostenible de los ecosistemas (Lucy *et al.*, 2004). Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas son muy promisorias como inoculantes; pues tienen un número de características interesantes que las hace adaptables para establecerse ellas mismas en el extremadamente complejo medio competitivo de la rizósfera (Burdman *et al.*, 2000).

Según Jiménez *et al.* (2001), entre los microorganismos con efecto benéfico para las plantas se distinguen en 3 grandes grupos: Microorganismos fijadores de nitrógeno, hongos micorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento de plantas.

La utilización del grupo de bacterias conocido también como PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) en años recientes ha causado cierta controversia, ya que no se sabe hasta qué punto se puede considerar a una rizobacteria como PGPR, por lo que Jiménez *et al.* (2001) ha establecido cuatro características que definen este grupo:

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

En relación al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las PGPR pueden actuar de manera directa o indirecta; mecanismos directos: producción de fitohormonas, inhibición de síntesis de etileno y aumento de la permeabilidad de la raíz (Ramos, 1999), y como mecanismos indirectos: producción de sideróforos, control biológico por antagonismo o competencia, resistencia sistémica inducida (RSI) y solubilización de fosfatos inorgánicos, entre otros (Kloepper, 1993).

Dadas todas las funciones benéficas de los PGPR, estos son una alternativa viable para reducir el uso de fertilizantes químicos en la producción agrícola (Santillana, 2005).

En el presente estudio se evaluaron 8 sustratos enriquecidos con rizobacterias, como una forma de determinar comparativamente cuál de estos sustratos se comportaba mejor, expresado a través de parámetros de crecimiento y precocidad en el desarrollo, considerando el manejo comercial en la producción de plantines de tomate en la zona de estudio.

Hipótesis

Se plantea como hipótesis, que la utilización de sustratos enriquecidos con rizobacterias (PGPR) aumentará el crecimiento y precocidad de plantines de tomate.

Objetivo General

Determinar cuál de los sustratos enriquecidos con rizobacterias (PGPR) permite obtener mejores resultados en el crecimiento y desarrollo de plantines de tomate María Italia.

Objetivos Específicos

Evaluar el crecimiento de plantines de tomate al utilizar sustratos enriquecidos con rizobacterias (PGPR).

Evaluar desarrollo de plantines de tomate al utilizar sustratos enriquecidos con rizobacterias (PGPR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó desde mayo del 2009 hasta Julio del 2009, en instalaciones de Eco-plantas Ltda., ubicada en la comuna de Malloco, Región Metropolitana.

La evaluación las plantas terminadas se realizaron en la unidad de sustratos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la ciudad de Santiago, comuna de la Pintana, Región Metropolitana.

La caracterización de los sustratos se llevó a cabo en los laboratorios de suelos y horticultura de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la ciudad de Santiago, comuna de la Pintana, Región Metropolitana.

Materiales

Material vegetal

Se utilizó un híbrido indeterminado de tomate *Solanum lycopersicum* L. María Italia de la empresa Seminis.

Sustratos

Se trabajó con 3 materiales, considerados como componentes para la elaboración de 2 sustratos base. Los materiales correspondieron a perlita harborlite, turba rubia pindstrup y compost pullihue, obtenidos en el banco de sustratos de la Unidad de sustratos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. El Cuadro 1 muestra la composición porcentual en base a volumen de cada sustrato.

Cuadro 1. Composición porcentual de sustratos base a inocular.

| Sustratos | % Materiales | | |
|----------------------|--------------|---------|---------|
| | Turba | Perlita | Compost |
| Sustrato comercial | 70 | 30 | 0 |
| Sustrato alternativo | 20 | 20 | 60 |

Inoculantes

Los microorganismos inoculados en los sustratos fueron *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y **Bioroot®: compuesto por 2 cepas de *Bacillus*, 2 cepas de *Pseudomonas*, 1 cepa de *Trichoderma harzianum*** y en bajas concentraciones 1 levadura, 1 extracto de alga y 1 nocardia. Todos provenientes del cepario de productos e insumos biotecnológicos Biogram S.A. El Cuadro 2 muestra el contenido de unidades formadoras de colonias (ufc) de los microorganismos inoculados en los sustratos base.

Cuadro 2. Contenido de Unidades formadoras de colonia (ufc) por ml de producto formulado.

| Microorganismos | ufc/ml |
|--------------------------------|-----------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | $6,67 \times 10^{11}$ |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1×10^{11} |
| Sumatoria de rizobacterias | 1×10^8 |

Métodos

Tratamientos y Diseño experimental

Tanto los materiales como los inoculantes fueron mezclados de manera de definir 8 tratamientos descritos en el Cuadro 3. El Diseño experimental fue de “Parcelas divididas”; con 2 sustratos base como parcelas principales, 4 inoculantes como sub-parcelas y 6 repeticiones.

Cuadro 3. Tratamientos y combinación de materiales e inoculantes que componen cada sustrato.

| Tratamientos | Materiales del Sustrato | | | Microorganismos Inoculados | | | |
|--------------|-------------------------|---------|---------|----------------------------|--------------------------------|----------|---------|
| | Turba | Perlita | Compost | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Bioroot® | Ninguno |
| 1 | √ | √ | - | - | - | - | √ |
| 2 | √ | √ | - | √ | - | - | - |
| 3 | √ | √ | - | - | √ | - | - |
| 4 | √ | √ | - | - | - | √ | - |
| 5 | √ | √ | √ | - | - | - | √ |
| 6 | √ | √ | √ | √ | - | - | - |
| 7 | √ | √ | √ | - | √ | - | - |
| 8 | √ | √ | √ | - | - | √ | - |

(√: Indica que el sustrato contiene dicho componente)

Cada sustrato base se ubicó en una bandeja de poliestireno expandido (286 alveolos de 24 cc por cavidad), la bandeja se dividió en 4 para aplicar en cada $\frac{1}{4}$ uno de los 4

inoculantes completamente al azar constituyendo esta última la unidad experimental. Se utilizó una unidad muestral de 10 plantines que estuviese en competencia perfecta para realizar las evaluaciones. Con estos tratamientos se montaron 12 bandejas.

Montaje Ensayo

Corresponden a los procedimientos generales realizados para montar el ensayo experimental en estudio.

Preparación de sustratos. El 1 de mayo de 2009 se realizaron las preparaciones de sustratos en base a volumen, con un 70% turba y 30% perlita (sustrato comercial) y 20% turba, 20% perlita y 60% compost. Ambas con un 30% de humedad en base a volumen. Las imágenes de la Figura 1 muestran el protocolo utilizado en la preparación de los sustratos sobre los cuales se inoculó.



Figura 1. Preparación de sustratos: A) Tachos para separación de ambos sustratos (60L cada uno), B) 8 tachos para separación de tratamientos (25L cada uno), C) Humectación y homogenización de sustratos (30%).

Esta preparación se realizó según lo indicado por Burés (1997), técnica que consiste en pre-humectar por separado turba y perlita antes de juntarlas. Posteriormente se mezclan los materiales constituyentes de los mismos de un modo uniforme. La pre-humectación es especialmente relevante en la turba puesto que algunos componentes de la turba tienen características hidrofóbicas y es difícil la rehumectación una vez que se han secado.

Inoculación. Se preparó el inóculo el 1 de mayo del 2009, diluyendo la dosis indicadas en 6,75 L de sustrato (0,68 mL *Pseudomonas fluorescens*; 0,68 mL *Bacillus subtilis* y 67,5 mL Bioroot®) en 250 mL de agua no clorada mediante una fuerte agitación. La inoculación se realizó a la sombra, en horas frescas. Se distribuyó bien el inóculo sobre el sustrato, agitando uniformemente para homogenizar (Figura 2).



Figura 2. Inoculación: A) Soluciones de inóculos utilizados, (B) Preparación de dosis a inocular, C) Rociador presurizado de 350 mL para inocular sobre los sustratos.

Preparación de bandejas. Se dispuso de 12 bandejas de poliestireno expandido con 286 cavidades. Cada bandeja alveolada fue dividida en 4 partes para llenar separadamente cada uno de los 4 tratamientos, dejando para ello una hilera sin llenar para evitar contaminación (Figura 3).

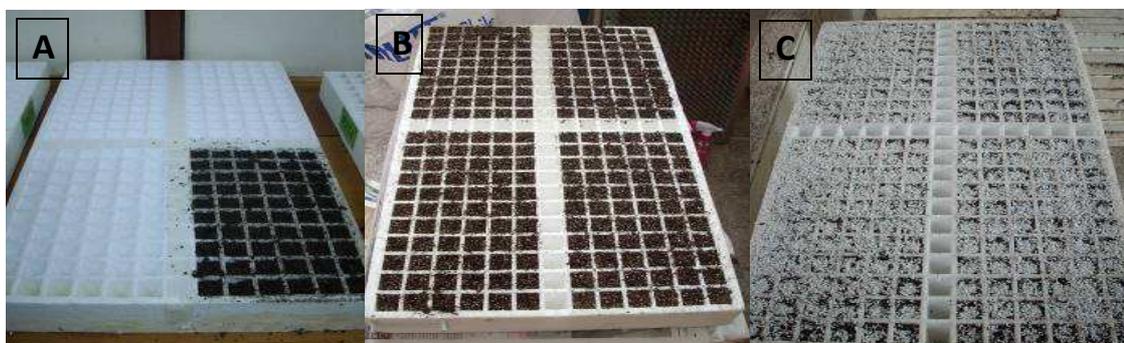


Figura 3. Preparación de las bandejas: A) Inicio de llenado de bandeja con el primer tratamiento, B) Finalización del llenado de bandejas con los 4 tratamientos separados por alveolos centrales sellados, C) Tapado con perlita luego de la siembra.

Siembra. El 4 de mayo del 2009 se realizó una siembra mecanizada y se envió la bandeja a cámara de germinación por 3 días (Figura 4).

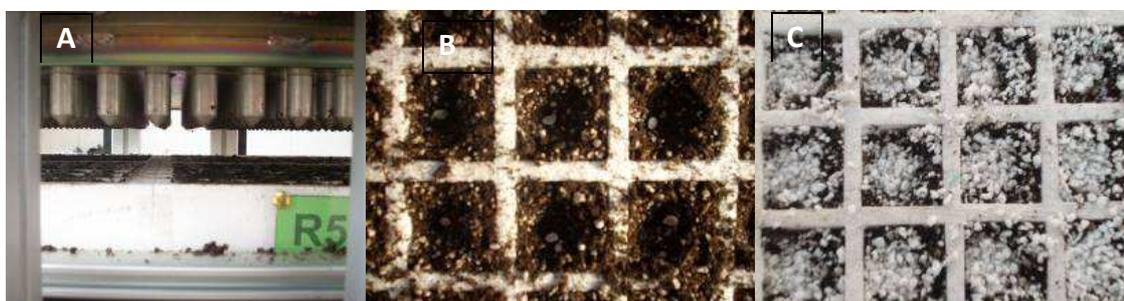


Figura 4. Siembra: A) Siembra mecanizada, B) Semilla depositada en alveolo, C) Semilla tapada con perlita.

Germinación. Las bandejas fueron llevadas a cámara de germinación, según protocolo descrito por Leskovar (2001).

Desarrollo. Luego de 3 días en cámara de germinación, las bandejas fueron llevadas a un túnel dentro de un invernadero y se desarrollaron mediante el manejo comercial del vivero.

Caracterización de los sustratos

Las siguientes evaluaciones corresponden sólo a una caracterización de los materiales utilizados en el presente ensayo y no contemplan análisis estadísticos.

Se realizó sólo una muestra compuesta de las repeticiones de cada sustrato. Estas evaluaciones fueron efectuadas del 5 al 15 de mayo de 2009.

(a) Determinación densidad real. Se determinó por picnometría (Boodt *et al.*, 1974) que consiste en pesar 2 g de suelo seco a 105 °C, introducirlos en un picnómetro seco y previamente pesado, adicionar agua destilada hasta un tercio del volumen y someter a succión por vacío durante 2 horas, retirar y completar volumen hasta dos tercios y someter nuevamente a vacío por 1 hora, finalmente completar volumen totalmente y pesar (Figura 5).



Figura 5. Determinación densidad real: A) Muestras de sustrato deshidratado, B) sustratos rehidratados y extracción de aire mediante bomba de vacío, marca Boeco, modelo R-300, Alemania, C) Pesaje de muestras en Balanza digital, marca Libror electronic Reading balance, modelo ED-2000.

(b) Determinación densidad aparente. Para ello se tomó una muestra de suelo con un cilindro de diámetro y altura conocidos. Se secó toda la muestra de suelo contenida dentro del cilindro, a 105 °C por 48 horas. La determinación se realizó así:

$$D_a = \text{masa de suelo seco} / \text{volumen del cilindro (g/ cm}^3\text{)}$$

(c) Curva de retención de agua. Consiste en la obtención de una curva de liberación de agua a distintas tensiones de columna de agua, calculando el valor % en volumen de agua liberada a cada tensión (Figura 6).



Figura 6. Curva de liberación de agua: A) Cilindros hidratados sobre cámara de arena, marca Eijkelkamp, modelo Agrisearch Equipment, Holanda, B) Humectación fondo de cilindros para no perder continuidad de agua, C) Estufa de secado de suelo, marca Soiltest Incorporated, modelo OV 18SC, Estados Unidos.

(d) Determinación de porosidad. Espacio poroso total expresado en % de volumen, se obtuvo a partir de los datos de la densidad aparente y la densidad real:

$$\text{Espacio poroso total} = 100 (1 - \text{Densidad aparente} / \text{Densidad real})$$

(e) Determinación de Conductividad eléctrica (CE). Para cada material industrial y cada sustrato, se analizó previo a la siembra y posterior a la cosecha, mediante conductivímetro digital de precisión 0,01 dS/m, marca Hanna, modelo HI99301 fabricado en Rumania. Para ello se realizó una suspensión-solución en relación 1:5 en agua destilada, que se llevó por una hora a un agitador mecánico, marca Vision Scientific Co., Ltd, modelo Green S Seriker, Korea. Posteriormente se filtro y evaluó (Figura 7).



Figura 7. Conductividad eléctrica: A) Agitación de sustratos hidratados con agua destilada por 1 hora, B) Filtración de sustratos hidratados, C) Medición de conductividad eléctrica.

(f) Determinación del pH. Para cada material y sustrato obtenido se analizó previo a la siembra y posterior a la cosecha, mediante peachímetro digital de precisión $\pm 0,01$, marca Hanna, modelo HI 991001, Rumania. Para ello se realizó una suspensión-solución en relación 1:5 en agua destilada, que se llevo por una hora a un agitador mecánico, marca P Selecta, modelo Rotavit. Posteriormente se filtro y evaluó.

(g) Determinación de toxicidad frente a germinación. Se realizó utilizando semillas de rabanito. Se llenaron 10 placas Petri con el jugo filtrado de cada uno de los tratamientos y posteriormente se depositaron 10 semillas de rabanito en cada una. Estas placas fueron llevadas a cámara de germinación y se contó diariamente el porcentaje de germinación por una semana. Al séptimo día se hizo una medición del largo de radícula más cotiledón para todas las semillas germinadas de todos los tratamientos (Figura 8).



Figura 8. Test de toxicidad por germinación: A) Placas de Petri con papel filtro humectado, B) Siembra de placas para cámara de germinación, C) Germinación de semilla de rabanitos *Raphanus sativus L* var. Sparkler).

Evaluaciones del material vegetal

Las siguientes evaluaciones fueron obtenidas de una unidad muestral de 10 plantas por repetición, por lo cual fueron sometidas a análisis estadístico.

Estas evaluaciones se dividieron en 2 partes: Desarrollo y Crecimiento del cultivo.

Para el **desarrollo del cultivo** cada 3 días se llevó un conteo del total de plantines que alcanzaban los estados de desarrollo a evaluar. Se consideró alcanzada la fase cuando el 50% de los plantines alcanzó los distintos estados de desarrollo (Figura 9). Entonces se registró la fecha de ocurrencia de cada uno de los siguientes estados de desarrollo.

(a) Emergencia. Se consideró alcanzado el estado cuando se observó la aparición de la primera estructura vegetal sobre el sustrato.

(b) Cotiledón expandido. Se consideró alcanzado el estado cuando se observó la separación apical de los cotiledones y la extensión de estos hasta aproximadamente 180°.

(c) Hojas verdaderas (primera, segunda y tercera). Se consideró alcanzado el estado cuando la hoja verdadera aludida alcanzó un largo de al menos 2 centímetros.



Figura 9. Estados de desarrollo: A) Emergencia, B) Pre cotiledón expandido, C) Cotiledón expandido, D) Aparición de primera hoja verdadera.

La cosecha de plantines se realizó el 22 de julio del 2009, cuando se detectaron con un 60% en tercera hoja verdadera.

Para el **crecimiento del cultivo** se realizaron evaluaciones al momento de la cosecha, sobre la base del promedio de la medición de 10 plantas por unidad muestral.

(a) **Diámetro del tallo (mm)**. Se midió en la base del tallo mediante un pie de metro digital. de precisión 0,001 mm y marca Vetto.

(b) **Largo tallo (cm)**. Se midió desde la base del tallo hasta el ápice de la última hoja superior extendida hacia arriba: Para ello se usó papel milimetrado.

(c) **Área foliar (cm²)**. Se escanearon las hojas y se analizaron mediante el Software WinFolia 2005b, Régent Instruments Inc., Québec fabricado en Canadá.

(d) **Área raíz (cm²), largo raíz (cm), volumen de raíz (cc) y ramificaciones radicales (n°)**. Posterior a un lavado de raíz con agua tibia más detergente y su posterior oreo (Figura 10), se escaneó el sistema radical y se analizó mediante el Software WinRhizo 2005b, Régent Instruments Inc., Québec fabricado en Canadá.



Figura 10. Preparación raíces para evaluaciones: A) Lavado de raíces, B) Estilado de raíces antes de secado, C) Medición materia seca con balanza digital de precisión, marca Adam, modelo AAA 100L.

(e) **Materia seca aérea y radical (g)**. Los plantines fueron sacados de las bandejas alveoladas y separadas en 2 partes: aérea y radical. Cada una de las partes fueron puestas de a 10 en bolsas de papel previamente taradas y introducidas en estufa de secado, por 72 horas a $65 \pm 5^\circ\text{C}$. Una vez secadas las muestras fueron pesadas en una balanza de precisión (Figura 10).

Análisis estadístico

La información obtenida de las evaluaciones se analizó mediante un ANDEVA. Cuando se detectaron diferencias estadísticas significativas se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey al 95% de confianza. Este análisis se realizó mediante un ordenamiento factorial.

RESULTADOS

Caracterización de los sustratos

Parámetros Físicos

Los avances en la caracterización de sustratos han mostrado la importancia de conocer la Da, Dr, Ep y curva de extracción de agua. Por ello resulta relevante el significado de cada uno de estos conceptos.

Se puede definir la densidad aparente como la relación entre la masa o peso de partículas y el volumen aparente que ocupan (Burés, 1997).

La densidad real se define como el cociente entre la masa de las partículas del medio de cultivo y el volumen que ocupan, sin considerar los poros (Ansorena, 1994).

Según Miller y Jastrow (2000), el espacio poroso total es el volumen total del sustrato de cultivo que no está ocupado por partículas orgánicas o minerales. Es un dato que se determina a partir de las densidades real y aparente.

En este estudio, los datos obtenidos de Da, Dr y porosidad se muestran en el Cuadro 4. Se puede observar que la Dr del sustrato con compost es 39,3% ($0,7 \text{ g/cm}^3$) mayor que la Dr del sustrato sin compost, inverso a lo que sucede con la Da, donde la Da del sustrato sin compost es 42,9% ($0,09 \text{ g/cm}^3$) mayor que la Da del sustrato con compost. Esto quiere decir que si bien el sustrato con compost presenta una mayor Dr, al momento de realizar la mezcla la porosidad aumenta de tal forma que supera a la porosidad del sustrato sin compost y logra una Da menor.

Cuadro 4. Densidad real (Dr), densidad aparente (Da) y porosidad medida a los sustratos base usados para la inoculación de las rizobacterias.

| Sustratos | Dr (g/cm^3) | Da (g/cm^3) | Porosidad (%) |
|----------------------|------------------------|------------------------|---------------|
| Sustrato sin compost | 1,08 | 0,21 | 0,81 |
| Sustrato con compost | 1,78 | 0,12 | 0,94 |

Los resultados obtenidos en el Cuadro 4, se ajustan perfectamente a los requerimientos del tomate, por cuanto el cultivo de tomate requiere un sustrato poroso que favorezca el desarrollo adecuado del sistema radicular (Johan *et al.*, 1981). Jaramillo *et al.* (2007), confirman la necesidad de un sustrato que tenga baja densidad aparente (liviano), pero especifica que el porcentaje de espacio poroso debe ser mayor al 80%. Dado que las porosidades de los sustratos se encuentran entre 81 y 94% son sustratos que se encuentran cerca del valor óptimo sugerido. Por otra parte, el espacio poroso total óptimo según, Miller y Jastrow (2000) se produce cuando alcanza niveles superiores a 85 %, por lo que se podría inferir que el sustrato sin compost se encuentra más cerca del óptimo en porosidad y el sustrato con compost posee un excesivo espacio poroso debido

a la gran cantidad de material entero y sin descomposición que por el poco volumen de alveolo de la bandeja quedó atravesado impidiendo una formación correcta del pan de raíz.

La cantidad de espacio poroso total de un sustrato está en relación inversa con su densidad aparente (Argo, 1998). Cuando la densidad aparente de un sustrato disminuye, la porosidad total aumenta linealmente. De acuerdo a lo antes expuesto, el mayor valor de la D_a en los sustratos sin compost genera un valor menor en porosidad en comparación al sustrato con compost. Esto coincide con lo señalado por Burés (1997), quien señala que la porosidad disminuye cuando aumenta la densidad aparente de un material dado. Ansorena (1994) por su parte agrega que la reducción del tamaño de los poros que se produce al aumentar la compactación hace que disminuya la porosidad ocupada por aire. Johan *et al.* (1981) señala que el tomate necesita estar bien abastecido de agua durante el ciclo de cultivo. Por esto, el suelo debe tener buena capacidad de retención de agua. Es por ello que podría esperarse un mejor desarrollo en el cultivo con sustratos con compost.

Cabe señalar que el sustrato comercial sin compost se encuentra compuesto por 70% turba y 30% perlita, en cambio el sustrato alternativo con compost se encuentra compuesto por 20% turba, 20% perlita y 60% compost. Esta diferencia en la composición explicaría todas las diferencias observadas en el Cuadro 4. Siendo conocidas las densidades reales de la turba y perlita, es el compost quien aporta la porción más densa de la composición. Burés (2007) señala que la D_r de la turba es $1,56 \text{ g/cm}^3$ y que la perlita es un material con poros internos cerrados, por lo que se hace menos denso y se utiliza para aligerar la mezcla final de los sustratos.

Turba y perlita poseen valores de porosidad total de 94,4% y 95,4% respectivamente (Burés, 2007). Es decir, valores muy similares que no debiesen condicionar los resultados obtenidos. Pero según lo observado en terreno, el compost utilizado en este estudio al ser producto de restos de poda poseía aun material bastante grande para contenedores tan pequeños y por ello es posible que la compactación lograda en estos sustratos haya sido menor que en el sustrato sin compost y eso haya condicionado en parte la menor D_a y mayor porosidad total en los sustratos con compost. Además Burés (2007) ha reportado densidades aparentes de turba y perlita con rangos muy amplios, pues ambas varían entre 60 y 200 kg/m^3 , pudiendo llegar la perlita a valores de hasta 50 kg/m^3 .

El inconveniente observado en sustratos con altos contenidos de turba es que el contenido de microorganismos es muy bajo, por lo que puede ser portador de diversos hongos fitopatógenos (Burés, 2007). Sin embargo, esta misma característica conllevó a la elección de este sustrato para ser inoculado con microorganismos y así otorgar esta cualidad, de la que en forma natural carece. La perlita al ser sometida a altas temperaturas resulta completamente estéril.

En la Figura 11, se puede observar la curva de extracción de agua de los dos sustratos base a diferentes presiones.

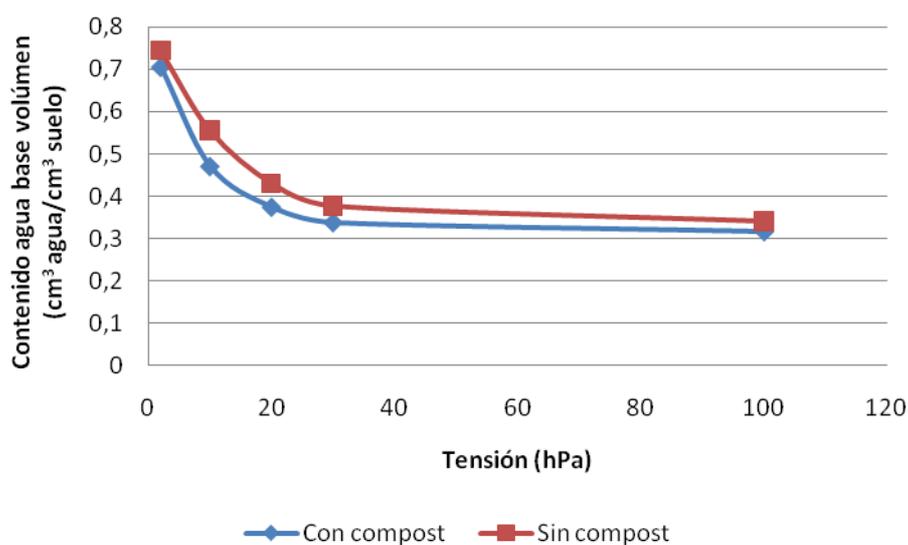


Figura 1. Curva de retención de agua de los sustratos base usados para la inoculación de las rizobacterias.

Al igual que lo registrado por Burés (1997) se observa en la Figura 11 que la mayor parte de agua se pierde a tensiones muy bajas, inferiores a 50 cm de columna de agua. Esto es porque en sustratos existe una mayor cantidad de poros y estos a su vez son más grandes que los observados en suelo.

Parámetros Químicos

Los datos de CE y pH obtenidos para cada tratamiento, se muestran en los cuadros 5 y 6 respectivamente. Cabe señalar que estas evaluaciones fueron realizadas antes de establecer el ensayo y posterior a la cosecha de los plantines con el objetivo de confirmar si los manejos agronómicos que se mantuvieron en la producción comercial de los plantines pudieron influir de manera importante en los tratamientos o en los plantines de tomate y observar diferencias entre tratamientos también.

Conductividad eléctrica (CE). En general, las especies hortícolas tales como el tomate, pimiento, berenjena, repollo, y lechuga prefieren niveles de CE <0,5 dS/m en las primeras etapas de desarrollo del cultivo, y de 0,5-0,75 dS/m en los siguientes estados (Leskovar, 2001). Según esto, se puede observar en el Cuadro 5, que todos los tratamientos se encuentran en el rango óptimo, sin embargo, el compost tiene una mayor CE.

Cuadro 5. Conductividad eléctrica de los componentes de los sustratos base y de los sustratos inoculados con las rizobacterias en pre-siembra y post-cosecha de plantines de tomate.

| Sustratos | Conductividad eléctrica (dS/m) | |
|---|--------------------------------|-----------------------|
| | Promedio pre-siembra | Promedio post-cosecha |
| Perlita | 0,08 | 0,08 |
| Turba | 0,15 | 0,20 |
| Compost | 1,10 | 1,13 |
| Sin compost-sin inoculante | 0,13 | 0,42 |
| Sin compost- <i>Bacillus subtilis</i> | 0,12 | 0,44 |
| Sin compost- <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0,12 | 0,47 |
| Sin compost-Sumatoria de 8 cepas | 0,15 | 0,31 |
| Con compost-sin inoculante | 0,61 | 0,48 |
| Con compost- <i>Bacillus subtilis</i> | 0,70 | 0,35 |
| Con compost- <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0,62 | 0,38 |
| Con compost-Sumatoria de 8 cepas | 0,66 | 0,40 |
| Agua Destilada | 0,00 | 0,00 |

La tendencia de la CE se mantiene constante desde la medición de pre-siembra hasta post-cosecha, sin embargo, los datos muestran que al ser el compost el material con mayor CE, éste influencia de la misma forma a todos los tratamientos que lo contienen (Cuadro 5).

Dentro del grupo de hortalizas de la familia de las Solanáceas, el tomate es el más tolerante a la salinidad. No obstante su tolerancia intermedia, la elevada salinidad constituye un factor adverso al desarrollo de la planta (Johan *et al.*, 1981). Lo cual en este estudio no es un factor limitante según los resultados obtenidos en el Cuadro 5.

pH. El pH afecta al desarrollo de los cultivos modificando las formas asimilables de los distintos elementos nutritivos, de modo que un pH adecuado en el sustrato indica que los nutrientes están en formas asimilables y, por lo tanto, existe una buena disponibilidad de nutrientes para las plantas. Muchas veces el pH de un sustrato o bien de los materiales que lo integran puede no ser adecuado para el cultivo. En general para los materiales orgánicos el margen de pH óptimo se haya entre 5,0 y 5,8. Este pH óptimo no depende sólo del sustrato, sino también de la planta (Burés, 1997). Dicho lo anterior se puede observar en el Cuadro 6, que todos los valores de pH son más alcalinos que el rango óptimo señalado por Burés (1997). Johan *et al.* (1981) señala que el tomate puede producirse en suelos con un rango bastante amplio en la reacción o pH. La reacción puede ser moderadamente acida hasta ligeramente alcalina, o sea, de pH 6,0 a 7,2.

Cuadro 6. pH de los componentes de los sustratos base y de los sustratos inoculados con las rizobacterias en pre-siembra y post-cosecha de plantines de tomate.

| Sustratos | pH | |
|---|----------------------|-----------------------|
| | Promedio pre-siembra | Promedio post-cosecha |
| Perlita | 6,75 | 6,75 |
| Turba | 6,45 | 6,40 |
| Compost | 7,47 | 7,40 |
| Sin compost-sin inoculante | 6,68 | 6,29 |
| Sin compost- <i>Bacillus subtilis</i> | 6,50 | 6,23 |
| Sin compost- <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 6,49 | 6,21 |
| Sin compost-Sumatoria de 8 cepas | 6,73 | 6,42 |
| Con compost-sin inoculante | 7,64 | 7,26 |
| Con compost- <i>Bacillus subtilis</i> | 7,59 | 7,28 |
| Con compost- <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 7,49 | 7,29 |
| Con compost-Sumatoria de 8 cepas | 7,52 | 7,26 |
| Agua Destilada | 6,72 | 6,72 |

Según el Cuadro 6, todos los tratamientos con compost son levemente más básicos, lo que se relaciona claramente con el valor de pH más alto que tiene el compost absoluto (sin turba ni perlita).

Se considera como una propiedad química deseable en los sustratos, que estos posean la capacidad de conservar el pH constante (Argo, 1998a). El Cuadro 6 muestra que todos los sustratos varían su valor de pH durante el periodo de crecimiento de la planta, lo cual a su vez haría variar la disponibilidad relativa de los nutrientes en la solución.

No sólo el manejo que se le ha dado al cultivo en este estudio es un factor que interviene en el pH, también las rizobacterias inoculadas podrían ser causal de los cambios en el tiempo. Así lo señalan Kirk *et al.* (1993), puesto que considera que los microorganismos también modifican las características fisicoquímicas del suelo. La actividad microbiana es responsable, directa e indirectamente de cambios en la disponibilidad de nutrientes, de variaciones en el valor del pH y en el potencial de óxido-reducción. Por su parte Barea (1991) dice que estas modificaciones están sujetas a las características del suelo y su capacidad amortiguadora, la cual no se ha estudiado en profundidad en relación a la disponibilidad de nutrientes afectada por las interacciones suelo-planta-microorganismos.

En el Cuadro 6, se puede observar que los sustratos sin compost presentan un pH ligeramente más ácido que los sustratos con compost. Bahzne y Schroth (1987), han reportando que el pH ligeramente ácido del suelo utilizado también favorece el crecimiento de rizobacterias, ya que a este pH posiblemente es menor la competencia por la micro flora nativa. Basado en ese estudio se podría asumir que en el sustrato sin compost existen mejores condiciones para el desarrollo de las rizobacterias inoculadas.

Estudios similares hechos por Robles y Barea, 2004, han mostrado que los efectos de la inoculación sobre los parámetros químicos del suelo reportan que el pH pudo ser incrementado por la inoculación de microorganismos, mientras que en otros sustratos no hubo efecto.

Parámetros Biológicos

Constituyen germinación y largo de radícula más cotiledón.

Los porcentajes de germinación de cada tratamiento fueron sometidos a análisis estadístico como datos bliss, sin embargo para mayor claridad se muestran como porcentajes (Cuadro 7).

Cuadro 7. Test de germinación de semillas de Rabanito (*Raphanus sativus* L.) durante 7 días para observación de toxicidad.

| Factores | día 1 | día 2 | día 3 | día 4 | día 5 | día 6 | día 7 |
|--------------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | % Germinación | | | | | | |
| A (Sustrato) ^{ns} | | | | | | | |
| Con compost | 45,0 | 52,5 | 65,0 | 69,3 | 70,3 | 74,0 | 77,5 |
| Sin compost | 37,5 | 47,0 | 59,8 | 66,3 | 67,8 | 68,5 | 72,5 |
| B (Rizobacteria) ^{ns} | | | | | | | |
| Ausente | 41,5 | 51,5 | 65,0 | 68,0 | 70,0 | 71,5 | 77,5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 35,5 | 44,0 | 56,0 | 65,0 | 66,0 | 67,5 | 70,5 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 43,5 | 51,0 | 64,0 | 68,0 | 69,5 | 71,5 | 75,0 |
| Sumatoria de 8 cepas | 44,5 | 52,5 | 64,5 | 70,0 | 70,5 | 74,5 | 77,0 |
| Interacción ^{ns} | | | | | | | |

ns=No existen diferencias significativas para un $p \leq 0,05$ de tukey.

Según Burés (1997), es muy relevante conocer la respuesta de los materiales mezclados para la formación de un sustrato, por lo que es importante proceder siempre a realizar ensayos de germinación cuando se formen mezclas. Siendo la semilla de rabanito una de las especies más sensible a las toxicidades, se puede observar en el Cuadro 7, que ninguno de los sustratos utilizados en el ensayo presentan diferencias significativas y tampoco influyen negativamente en la germinación de las semillas de rabanito. En la Figura 12, se pueden observar los resultados obtenidos al medir el largo de la radícula más cotiledón de Rabanito (*Raphanus sativus* L.) evaluado después de 7 días en cámara de germinación en diferentes sustratos base con y sin compost.

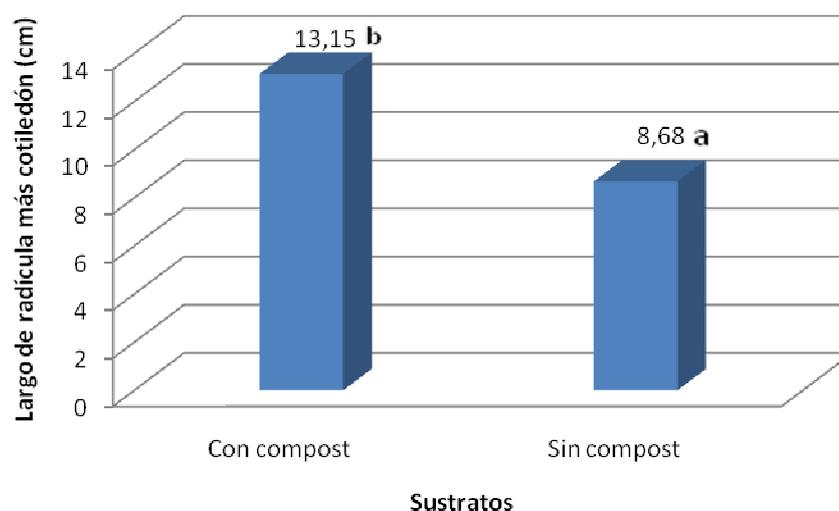


Figura 12. Largo de radícula más cotiledón de Rabanito (*Raphanus sativus* L.) (Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$ de tukey) entre sustratos).

La sumatoria del largo de radícula y cotiledón es 34% mayor en aquellos rabanitos sembrados en placas Petri con sustrato con compost (Figura 12). De hecho el compost debe contener entre 35 y 50% de materia orgánica con relación al peso volumétrico, sin embargo, las turbas ofrecen las mejores condiciones para la germinación con un contenido de materia orgánica de 95% aunque no aportan nutrientes (Jaramillo *et al.*, 2007).

El hecho que las plantas responden a un conjunto de características físicas, biológicas y químicas hace que sea muy difícil valorar un sustrato en función solamente de sus características de retención de agua; por otra parte, la cantidad de agua y de aire dependen del contenedor, habiéndose observado numerosas veces que en cultivo en contenedor no se puede llegar a los límites de potencial que se llega en cultivos de campo (Burés, 2007).

Según Leskovar (2001) la mezcla de turba y perlita es la más comúnmente usada en la producción de inóculos comerciales siendo según Burés (1997) un material aceptado internacionalmente para el cultivo hortícola, destacando su alta capacidad de retención de agua. Además Burés, (1997) establece la perfecta compatibilidad existente entre turba y perlita. Sin embargo, dependiendo del material de origen y en respuesta a los métodos de esterilización utilizados las turbas poseen distintas calidades y limitaciones, es por ello que están siendo investigados sustratos alternativos y sus combinaciones (Denardin *et al.*, 1999).

Resulta relevante la utilización de un sustrato alternativo para inocular (Cuadro 4), en vista que no ha habido mucho progreso con respecto a los sustratos de cultivo para inoculación. En este contexto, la eficiencia de la inoculación con una cepa de rizobacteria competitiva y eficaz dependerá del sustrato utilizado (Vargas y Hungria, 1997).

Evaluaciones del material vegetal

Evaluación del desarrollo del material vegetal

Tal como se señaló en la metodología, la evolución del desarrollo del cultivo fue evaluada durante todo el período, sin embargo, para efectos de sintetizar la información obtenida se presentan las fechas mínimas requeridas para mostrar la tendencia del cultivo. Los datos para todas las fechas evaluadas se encuentran en apéndice I. Cabe señalar que en todas las evaluaciones se hicieron comparaciones entre sustratos y entre rizobacterias, pese a ello, en las figuras que se muestran a continuación se plasmaron solamente aquellos resultados en que hubo diferencias estadísticas significativas, por lo que se debe inferir que no hay diferencias si no se presentan figuras que comparen dichos resultados. Finalmente, si se presenta una figura que compare resultados entre rizobacterias quiere decir que no hubo diferencias a nivel de sustratos y viceversa.

En el caso del desarrollo completo del cultivo no se obtuvieron diferencias a nivel de rizobacterias y si a nivel de sustratos, es por esto el especial énfasis que toman las diferencias de utilizar sustratos con y sin compost en esta parte del análisis pese a que la memoria trata principalmente de rizobacterias.

Emergencia. Como se observa en la Figura 13, en la primera fecha de evaluación no existen diferencias significativas en la emergencia de los plantines de tomate, sin embargo, en todas las fechas sucesivas de evaluaciones, se observa una mayor emergencia en aquellos plantines de tomate sembrados en sustratos sin compost, contrario a lo que sucedió en la germinación de semillas de rabanito en cámara de germinación. Si bien el ensayo fue montado dentro de un invernadero y a su vez dentro de un túnel, este no tenía calefacción forzada y dada la fecha de establecimiento, durante el período de emergencia hubo temperaturas bastante bajas en relación a las óptimas que requiere el cultivo de tomate. Del Busto *et al.* (2002) indican que la emergencia de la semilla ocurre cuando existen condiciones adecuadas de humedad, aireación y temperatura. El rango favorable de temperatura se establece entre 15 y 30°C, temperaturas inferiores retardan la germinación y prolongan la emergencia de las plántulas, provocando desigualdad. Este retardo y desigualdad se observó en terreno durante la emergencia del cultivo.

La curva de emergencia de los plantines de tomate sembradas en sustrato sin compost tiene una pequeña disminución entre la segunda y tercera fecha de medición, que está dada por una mortalidad de plantines producto del corte accidental de una de las cintas sostenedoras de las bandejas alveoladas, sin embargo, la tendencia de los sustratos sin compost por sobre aquellos con compost se mantiene en el tiempo (Figura 13).

Miller y Jastrow (2000) sostienen que del momento de la siembra hasta la emergencia transcurren entre 6 y 12 días. Esto se puede ver claramente en la Figura 13, pues considerando que la fecha de siembra fue el 4 de mayo de 2009, al día 15 habían pasado 11 días y la emergencia era de casi 50% en el sustrato con compost y de 90% en el sustrato sin compost.

En la Figura 13 se puede observar la curva de emergencia en el tiempo de los plantines de tomate.

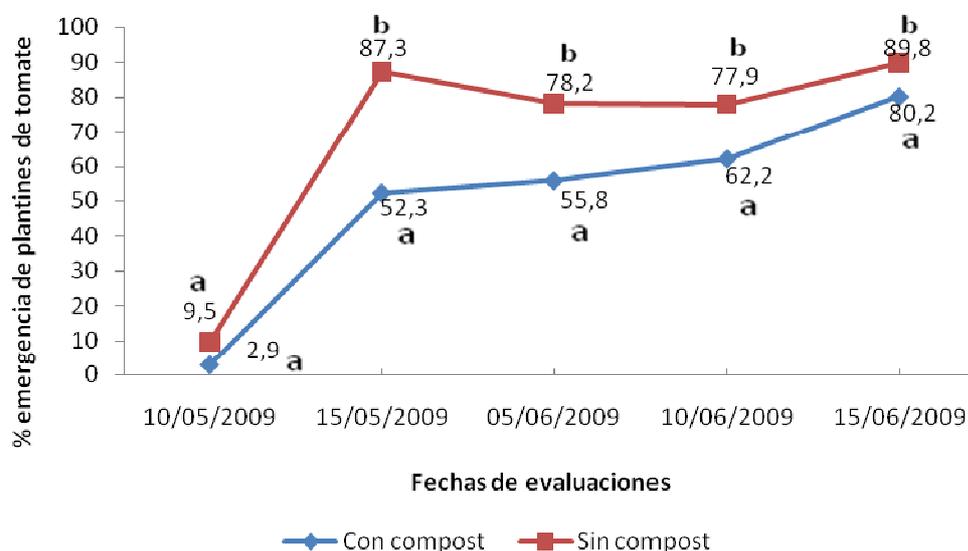


Figura 13. Curva de porcentaje de emergencia de plantines de tomate (Letras diferentes en una misma fecha indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos).

Como sólo se obtuvo diferencias significativas a nivel de sustratos es posible que las rizobacterias no hubiesen colonizado la rizósfera aún y por ende no estén actuando sobre la emergencia del cultivo, sin embargo, estudios realizados por Díaz *et al.* (2001), señalan que algunas rizobacterias como *Pseudomonas aeruginosa* pueden hasta inhibir la germinación y retrasar la emergencia.

Cotiledón expandido. En las figuras 14 y 15 se plasman los porcentajes de plantines de tomate en estado de cotiledón expandido evaluados en plantines de tomate. En la Figura 14 se encuentran comparaciones significativas entre rizobacterias, en cambio en la Figura 15 se encuentran comparaciones significativas entre sustratos.

Como se puede observar en la Figura 14, en la primera fecha el cotiledón expandido se encuentra recién apareciendo, esto producto de que aún hay plántulas emergiendo a la fecha. La mayor emergencia ocurre el 11 días después de la siembra. La aparición de cotiledón expandido guarda concordancia con el hecho que las rizobacterias aún no han colonizado el medio rizosférico, producto de las bajas temperaturas que existen en esta fecha en Malloco.

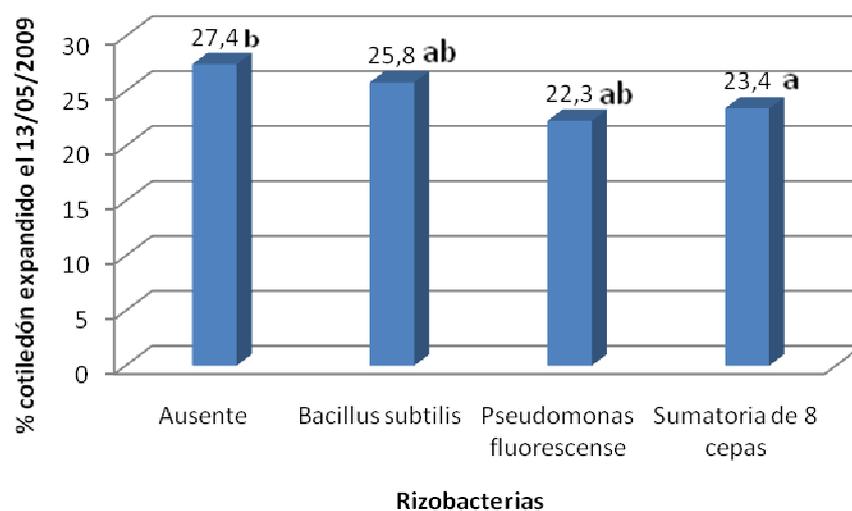


Figura 14. Porcentaje de cotiledón expandido en plantines de tomate en la primera fecha de evaluación (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre rizobacterias).

En la Figura 14, el % de plantines de tomate con cotiledón expandido presentó diferencias significativas entre las distintas aplicaciones de rizobacterias en la primera fecha de evaluación, dichas diferencias fueron entre los sustratos inoculados con la sumatoria de rizobacterias versus los sustratos sin ningún inoculante. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, el sustrato sin inoculante tuvo un 14,6% más de plantines con cotiledón expandido.

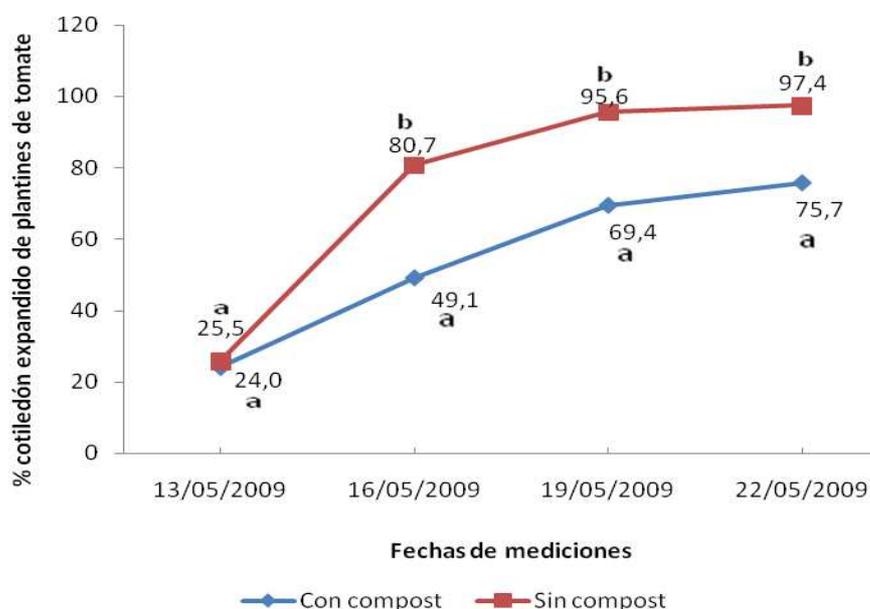


Figura 15. Curva de porcentaje de cotiledón expandido en plantines de tomate (Letras diferentes en una misma fecha indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos).

Según la Figura 15, desde la segunda fecha el sustrato sin compost se adelantó en la aparición de plantines con cotiledón expandido, esto guarda relación a su vez con lo observado en la emergencia en el Cuadro 3. A los 12, 15 y 22 días después de la siembra del 2009, los % de cotiledón expandido fueron 39%, 27,4% y 22,3% mayores respectivamente en aquellos sustratos sin compost.

Primera, segunda y tercera hoja verdadera. En la Figura 16, se presenta la curva del desarrollo del cultivo en el tiempo según el número de hojas ponderado a la fecha de muestreo. Estos resultados son referentes a diferencias entre sustratos ya que no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre rizobacterias.

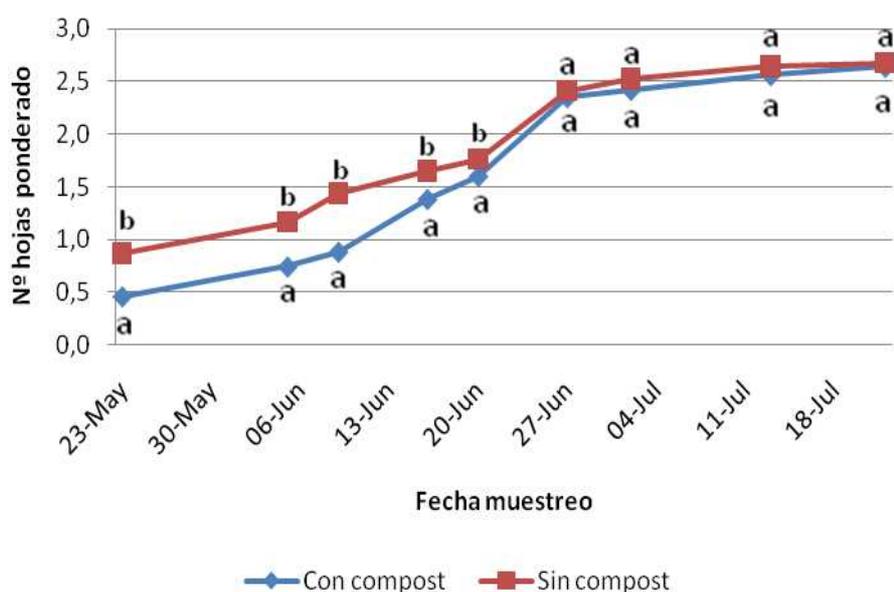


Figura 16. Porcentaje de primera a tercera hoja verdadera en plantines de tomate (Letras diferentes en una misma fecha indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos para una misma fecha y estado fenológico).

Durante toda la primera etapa, desde fines de mayo hasta fines de junio, los plantines de tomate del sustrato sin compost se mantuvieron significativamente adelantados respecto a los que crecieron con compost, sin embargo, desde comienzos de julio hasta la cosecha, estas diferencias dejan de ser significativas y las curvas de desarrollo de ambos sustratos se acerca, siendo estadísticamente iguales. Es importante relacionar esta información con todas las variables de crecimiento medidas al momento de la cosecha, pues podría ocurrir que pese a las no diferencias en el desarrollo al momento de cosechar, sean los plantines de tomate en aquellos sustratos sin compost los que alcancen mayor vigor producto del adelanto que mantuvieron en el desarrollo durante toda la primera etapa.

Los resultados obtenidos también coinciden con estudios de Robles y Barea (2004) donde se vio que la respuesta en las propiedades de los dos suelos fue marcadamente diferente, y estuvo relacionada con el grado de fertilidad original de cada suelo. Al igual que lo observado en forma más evidente en la Figura 16.

La Figura 17, muestra claramente la diferencia con la que llegaron a cosecha los plantines en los distintos sustratos, pese a tener los mismos tratamientos, es decir, fueron inoculados con las mismas rizobacterias.



Figura 17. Diferencias entre plantines sin y con compost (A y B, respectivamente)

Evaluaciones de crecimiento del material vegetal

Los siguientes resultados corresponden a la información obtenida una vez finalizada la etapa de plantín, (50% de plantines con tercera hoja verdadera).

Para Leskovar (2001), los parámetros de crecimiento más importantes a considerar durante la evolución de un cultivo incluyen: altura de planta, sistema radicular sano, buena ramificación con abundante número de raicillas y uniformidad, entre otros. Por lo que dentro de los factores analizados se incluyeron algunos de los citados anteriormente.

Para poder analizar en forma objetiva estos resultados es necesario tener en cuenta que algo determinante en la promoción del crecimiento por microorganismos inoculados es la combinación genotípica específica de planta y microorganismos (Chanway *et al.*, 1989). Por lo que no necesariamente una rizobacteria que sirve en algunas especies servirá para el tomate en estudio.

Parámetros aéreos

En las figuras 18 a 24, se presentan los resultados de las variables cuantitativas medidas para evaluar el crecimiento aéreo de los plantines de tomate en estudio.

Largo tallo. Según la Figura 18, el largo de tallo de los plantines de tomate presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambos factores estudiados por separado. Como se observa en la Figura 19, los plantines de tomate en sustratos sin compost tienen tallos 18,8% más largos que aquellos plantines de tomate en sustratos con compost. A nivel de rizobacterias la diferencia significativa se detectó con la sumatoria de las cepas de rizobacterias en relación al resto de los tratamientos, siendo un 6% mayor en largo de tallo.

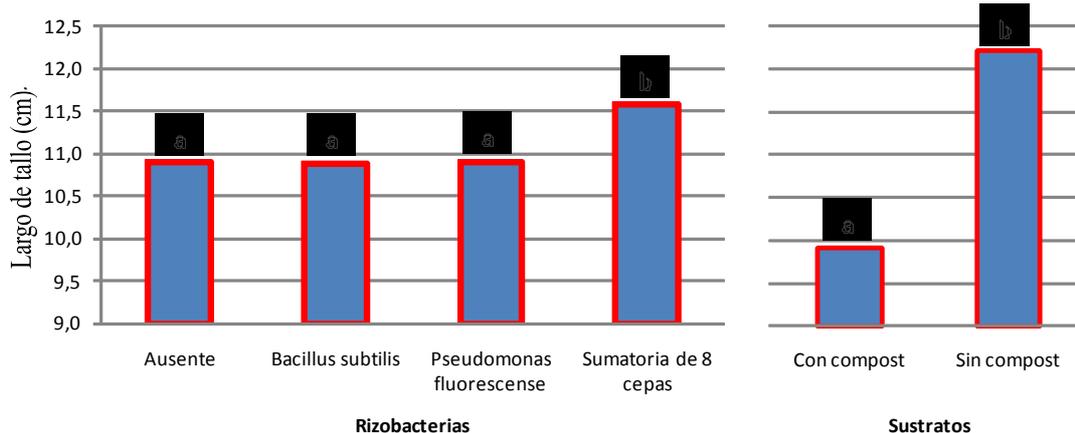


Figura 18. Largo de tallo de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los factores sustrato y rizobacteria por separado).

Resultados similares obtuvieron Terry y Leyva (2006), que confirmaron un efecto positivo de la inoculación conjunta de varias bacterias en la altura de plantas de tomate, siendo un 23% mayor; también se logró una eficiencia del 40% respecto a la fertilización nitrogenada.

Bagyaraj (1984) también obtuvo resultados promisorios en altura de planta, observando que los promedios obtenidos con los tratamientos constituidos por la inoculación hongo-bacterias y la inoculación exclusiva del hongo superan significativamente al testigo en altura de las plántulas de *Trifolium subterraneum*.

Wijnant (2008) señala que en los tratamientos sin fertilización, se obtienen diferencias significativas entre tratamientos sin bacterias, y los tres tratamientos inoculados con rizobacterias. Para estos últimos, se observa claramente un aporte de nitrógeno por parte de las cepas bacterianas, contribuyendo al crecimiento de las plantas, destacando de entre todas las variables la altura alcanzada por la totalidad de los tratamientos que fue siempre superior.

Diámetro tallo. Según la Figura 19, el diámetro de tallo de los plantines de tomate presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambos factores estudiados por separado. Como se observa en la Figura 19, los plantines de tomate en sustratos sin compost tienen diámetros de tallo 5,2% más largos que aquellos plantines de tomate en sustratos con compost. Por otra parte los plantines de tomate en sustratos inoculados con la sumatoria de rizobacterias tienen diámetros de tallo 5,1% más largos que aquellos plantines de tomate en sustratos sin ninguna rizobacteria inoculada.

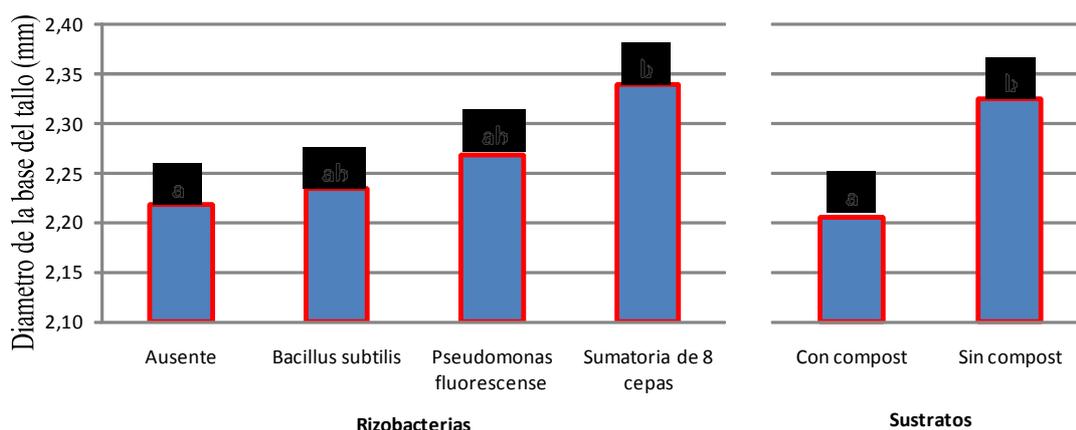


Figura 19. Diámetro basal de tallo de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los factores sustrato y rizobacteria por separado).

Relacionando lo observado en las figuras 17 y 18, resulta interesante que el mayor largo de tallo no lleva como consecuencia un adelgazamiento de este como ocurre cuando existe competencia por luz y los tallos se encuentran etiolados. Es decir, se está hablando de tallo que son más largos y también más gruesos en los sustratos con la sumatoria de rizobacterias y sin compost.

Jiménez (1996) obtuvo resultados análogos en inoculaciones al suelo, al hacer comparaciones entre un testigo absoluto versus el resto de tratamientos. Tratamientos inoculados y orgánicos versus no orgánicos presentaron diferencias entre altura y diámetro de tallo de plantines de tomate altamente significativas, al igual que en este ensayo.

Área foliar. Según la Figura 20, el área foliar de los plantines de tomate presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambos factores estudiados por separado. Los plantines de tomate en sustratos sin compost tienen un área foliar 27% mayor que en los plantines de tomate en sustratos con compost. Por otra parte los plantines de tomate en sustratos inoculados con la sumatoria de rizobacterias tienen áreas foliares 21,4%, 16,3% y 14% mayores que en aquellos plantines de tomate en sustratos sin ninguna rizobacteria inoculada, con *Bacillus subtilis* y con *Pseudomonas fluorescens* respectivamente.

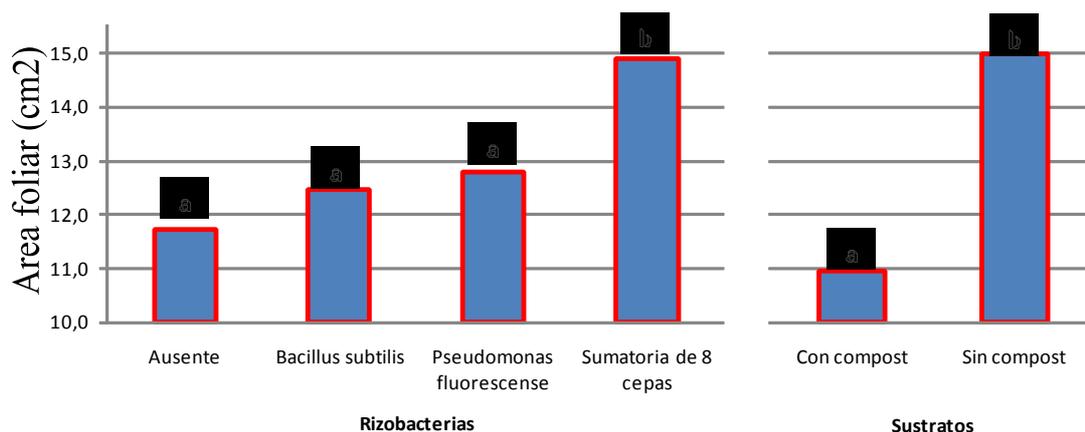


Figura 20. Área foliar de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los factores sustrato y rizobacteria por separado).

Como se puede observar en la Figura 20, las cepas *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* son estadísticamente iguales al testigo. Resultados obtenidos por Bashan (1986), mostraron que la respuesta a la inoculación varía en función de la relación cepa cultivar. De hecho en un ensayo realizado por Wijnant (2008) el tratamiento sin bacteria generó mayor área foliar que aquel tratamiento inoculado con rizobacterias. No obstante lo anterior, ensayos de Díaz *et al.* (2001) demuestran que una de las cepas bacterianas que estimularon una mayor área foliar en lechuga fueron *P. fluorescens* en comparación al testigo sin inocular.

En la Figura 21 se puede evidenciar que el tratamiento con la sumatoria de rizobacterias genera plantas de mayor área foliar en comparación al testigo sin inocular.

Estudios de Cuesta *et al.* (s.a.) señalan que las plántulas de *swietenia macrophylla* inoculadas con la combinación *Glomus mosseae-Bacillus subtilis* o *Glomus mosseae-Pseudomonas fluorescens*, presentan un valor promedio de peso seco foliar superior significativamente al alcanzado tanto con el testigo. Este mayor peso seco foliar alcanzado por la presencia de rizobacterias coincide con lo mostrado por Meyer y Linderman (1986) y Oliveira *et al.* (1987).

Ensayos realizados por otros investigadores, demuestran que de acuerdo al tipo de cepa de rizobacterias y a las distintas variables a evaluar, existen resultados con muchas interrogantes (Gaetano, 2004), lo mismo ocurre en este ensayo por cuanto existe diferencia en materia fresca y no así en materia seca.



Figura 21. Diferencia área foliar con y sin rizobacterias: A) Estructura aérea de T4 (sumatoria de rizobacterias), B) Estructura aérea de T1 (testigo sin rizobacterias).

Peso fresco aéreo. Según la Figura 22, el peso fresco aéreo de 10 los plantines de tomate presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambos factores estudiados por separado. En la Figura 22, los 10 plantines de tomate en sustratos sin compost tienen un peso fresco aéreo 20,7 % mayor que aquellos en sustratos con compost. A nivel de rizobacterias la sumatoria de cepas mostró diferencias significativas en relación al resto de los tratamientos, observándose un 12,2% mayor peso fresco aéreo respecto del siguiente.

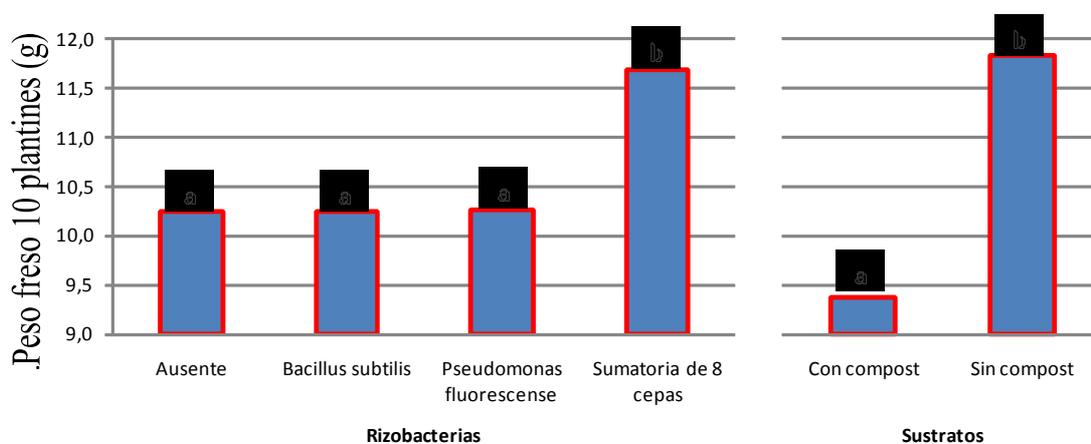


Figura 22. Peso fresco aéreo de 10 plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los factores sustrato y rizobacteria por separado).

Resultados similares obtuvo Jiménez *et al.* (2001) quien reportó que el uso de PGPR aumentó el peso de plántulas. También Meneses (2003) demostró que plantas de banano cv. “Gran Enano”, protegidas con inoculaciones individuales de hongos endofíticos, presentaron un incremento promedio en el peso radical y peso foliar de 39 y 29% respectivamente, comparando con el testigo absoluto.

Sin embargo, nuevamente *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* no mostraron diferencias significativas respecto del testigo sin inocular. Es posible respaldar estos resultados de acuerdo a los ensayos realizados por Schoebitz (2005), el cual señala que

para ciertas cepas de rizobacterias, los efectos sobre aumentos en el peso fresco de raíces y vástagos de *L. perenne* son iguales o incluso menores con respecto al tratamiento control.

Peso seco aéreo. El peso seco aéreo de 10 plantines de tomate es 7,29% mayor en aquellos plantines de tomate establecidos en sustratos sin compost (Figura 23).

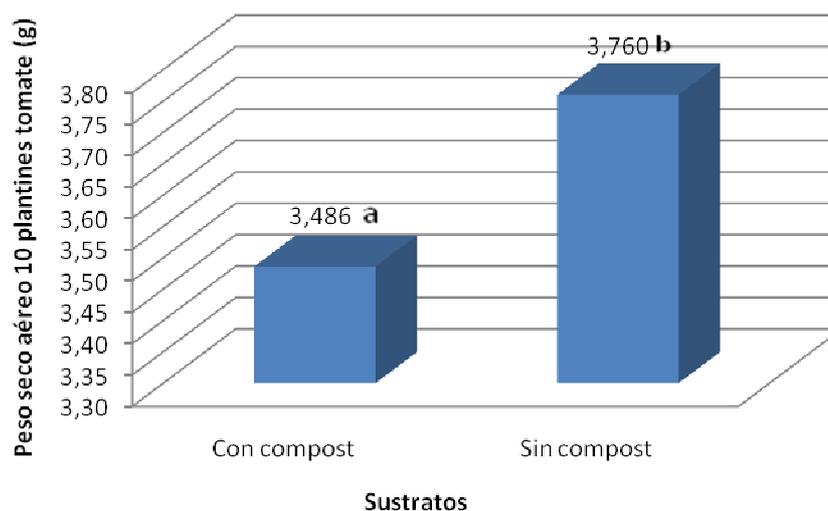


Figura 23. Peso seco aéreo de 10 plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos).

Relacionando las figuras 22 y 23, se puede observar que las diferencias significativas encontradas entre las distintas rizobacterias son sólo a nivel de peso fresco aéreo y no peso seco aéreo, por lo que el mayor peso para este factor estaría dado por el contenido de agua y no por materia seca. Contrario a lo obtenido por Díaz *et al.* (2001), que en plantas inoculadas con *P. fluorescens* obtuvieron los mejores resultados para esta variable.

La Figura 24 da una visión general de lo sucedido en el crecimiento aéreo de los plantines de tomate.

La Figura 24 permite visualizar claramente las condiciones en que llegaron a cosecha los plantines, tal como lo indican las diferencias estadísticas. Se nota claramente en este almácigo que existe un mayor crecimiento en el tratamiento 4, correspondiente a la sumatoria de rizobacterias y un menor desarrollo en el tratamiento 1, correspondiente a la ausencia de rizobacterias, estando en término medio los tratamientos 2 y 3, que son *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente.



Figura 24. Bandeja alveolada 22 de julio correspondiente a repetición N° 2: A) T1 (ausencia de rizobacterias), B) T4 (sumatoria de rizobacterias), C) T2 (*Bacillus subtilis*), D) T3 (*Pseudomonas fluorescens*).

Parámetros Radicales

En las figuras 25 a 31 se presentan los resultados de las variables cuantitativas medidas para evaluar el crecimiento radical de los plantines de tomate en estudio.

Es muy relevante evaluar el sistema radical, especialmente en tomate, ya que el tomate tiene un sistema radical complejo. Posee cuatro tipos de raíces: pivotante, laterales, basales y adventicias (Leskovar, 2001).

Largo radical. Resulta interesante observar que la interacción de factores para la variable largo de raíz muestra que tanto los plantines en sustratos con la sumatoria de cepas de rizobacterias como en sustratos inoculados con *Pseudomonas fluorescens* se comportan de igual forma en sustratos con y sin compost a diferencia del tratamiento testigo sin rizobacterias y los sustratos inoculados con *Bacillus subtilis* en que el largo radical disminuye en sustratos sin compost. Esta disminución es mucho más notable en sustratos con *Bacillus subtilis* (Figura 25).

Pocasangre *et al.* (2004) sugieren que a mayor superficie de exploración y absorción de nutrientes del sistema radical, mayor efecto en el vigor general de las plantas. Por su parte Chávez (2007) muestreó que de 30 tratamientos correspondientes a inoculaciones individuales y combinadas de los agentes biológicos, 24 presentaron un incremento en la longitud radical de 25 a 54% con respecto a un testigo absoluto. La longitud de las raíces fue considerada una de las variables más importantes por este autor, ya que de acuerdo con Turner (2003) la longitud cuantifica la capacidad que tiene el sistema radical de explorar en el suelo en busca de agua y nutrientes para su desarrollo.

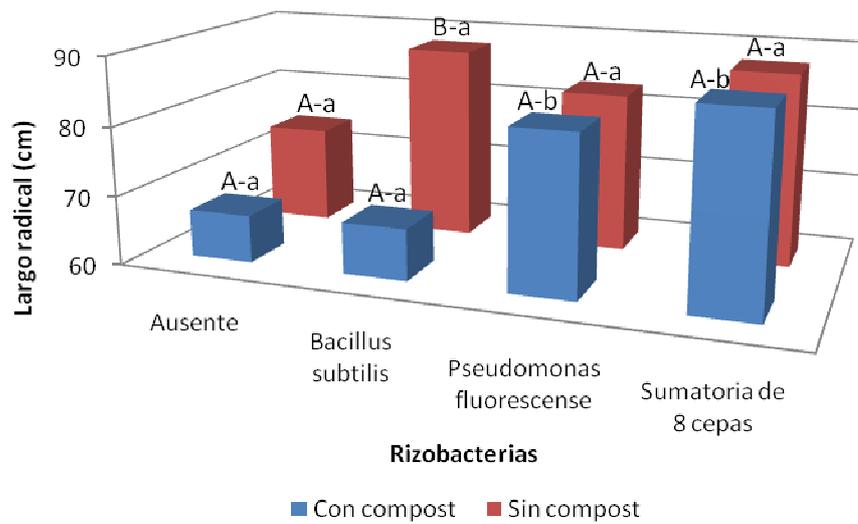


Figura 25. Largo radical de plantines de tomate para la interacción entre sustratos y rizobacterias (Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre rizobacterias y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos).

Volumen radical. Según lo observado en la Figura 26, el volumen radical de los plantines de tomate en sustratos con la sumatoria de 8 cepas es 24,3% y 18,9% mayor que en los plantines de tomate en sustratos sin rizobacterias y con *Bacillus subtilis* respectivamente.

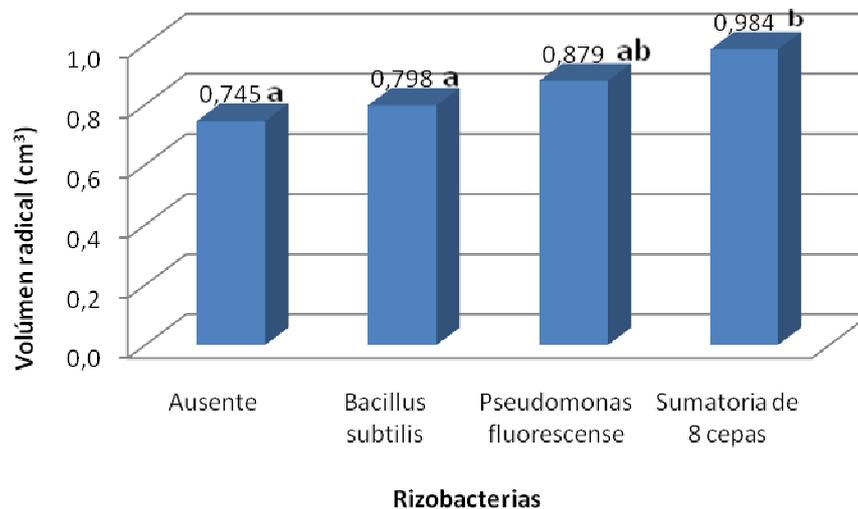


Figura 26. Volúmen radical de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre rizobacterias).

Al igual que en el caso de largo radical, Chávez (2007) mostró que de los 30 tratamientos correspondientes a inoculaciones individuales y combinadas de los agentes

biológicos que evaluó, 20 presentaron diferencias altamente significativas con respecto al testigo absoluto.

Algunos autores mencionan que algunas cepas no muestran efectos benéficos en el desarrollo de las raíces, como es el caso de *Hafnia alvei* (Díaz *et al.*, 2001). Esto podría justificar que *Bacillus* y *Pseudomonas* no presente mayores efectos.

Ramificaciones radicales. El número de ramificaciones de los plantines de tomate, también llamados “*forks*” presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambos factores estudiados por separado, pero con una tendencia distinta a las observadas en las figuras anteriores. Puesto que los plantines de tomate en sustratos con compost tienen 10,49% más de bifurcaciones radicales. Esto por otra parte es sólo una característica y no quiere decir necesariamente que exista una mayor absorción de nutrientes. También se puede observar que los plantines de tomate en sustratos inoculados con la sumatoria de rizobacterias tienen 18% más bifurcaciones que en aquellos sustratos sin inoculación, siendo esta diferencia significativa a nivel estadístico (Figura 27).

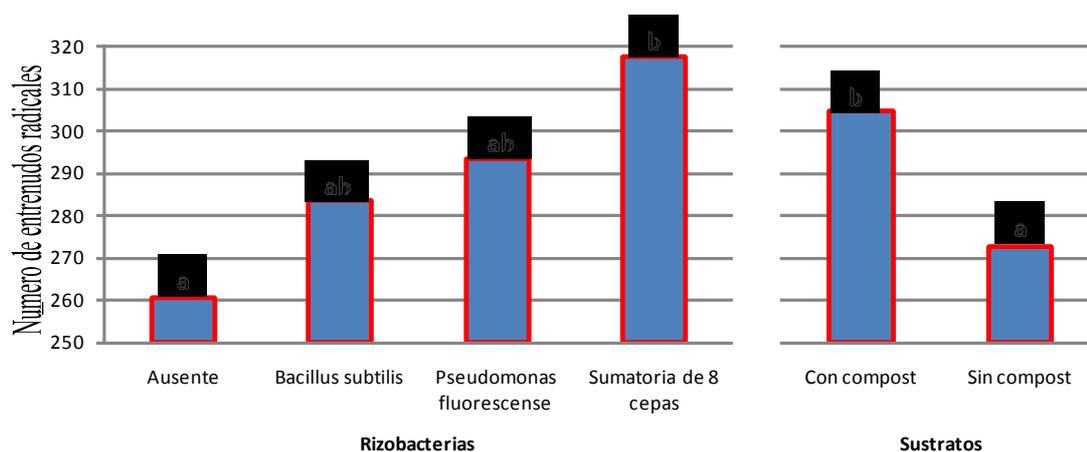


Figura 27. Número de ramificaciones radicales de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para los factores sustrato y rizobacteria por separado).

Los cambios observados en el crecimiento de las plantas podría deberse a diferentes mecanismos de acción de los microorganismos estudiados, cuando son inducidos bajo condiciones ambientales propicias. Entre estos mecanismos se encuentra la producción de compuestos promotores del crecimiento vegetal, los cuales inducen un incremento en el número y longitud de los pelos radicales (Jiménez, 2001), a lo que se suma las contribuciones al aumento de la materia seca de las plantas, a través de la enzima nitrato reductasa o por los aportados a través de la fertilización inorgánica (Fallik *et al.*, 1994).

Las rizobacterias se encuentran influenciadas por factores externos que deben ser correctamente controlados para lograr el máximo potencial de funcionamiento en estas, entre estos factores se encuentra la fertilización. Así lo señala Wijnant (2008), con resultados donde suelos sin fertilización no tuvieron diferencias significativas con y sin

rizobacterias. Este podría ser un indicador de la participación de factores externos que deben ser controlados para que las rizobacterias actúen a su máximo potencial.

En las evaluaciones del sistema radical se puede observar que no es consistente en todos los sustratos la superioridad de la sumatoria de las rizobacterias por sobre el resto de las inoculaciones, esto se puede relacionar, pero no con absoluta certeza a través de resultados obtenidos por Wignant (2008) donde el efecto promotor de crecimiento y desarrollo se ve deprimido cuando la fertilidad del suelo es la óptima para la planta (100% NPK), sobretodo con niveles adecuados de N. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Umali *et al.* (1980), los cuales señalan que los efectos de la inoculación en la morfología de los pelos radicales y en la morfogénesis de raíces laterales son suprimidos por los nitratos.

Área radical. Según lo observado en la Figura 28 el área de la raíz de los plantines de tomate en sustratos con la sumatoria de 8 cepas es 16,4% mayor que en los plantines de tomate en sustratos sin rizobacterias.

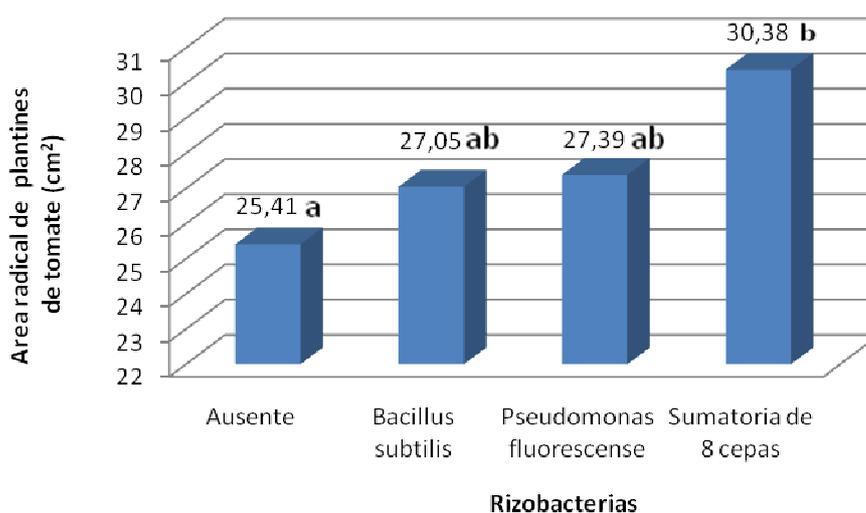


Figura 28. Area radical de plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre rizobacterias).

Peso fresco radical. Según lo observado en la Figura 29, el peso fresco radical de 10 plantines de tomate en sustratos con la sumatoria de 8 cepas es 13,8% mayor que en los plantines de tomate en sustratos sin rizobacterias.

El sistema radicular tiene importantes funciones físicas y fisiológicas desde el inicio de la germinación y emergencia, hasta el crecimiento y desarrollo del transplante. El tamaño, morfología y arquitectura puede ejercer un control sobre el tamaño relativo y ritmo de crecimiento del tallo. Estrés ambientales y biológicos originados en la rizósfera pueden ser expresados en el tallo afectando la partición de biomasa, el desarrollo vegetativo, y finalmente la productividad del transplante (Leskovar, 2001).

Resultados muy similares en peso radical obtuvo Chávez (2007), por cuanto ocho semanas después de protegidas las plantas con los agentes biológicos, se detectaron diferencias altamente significativas en las variables de promoción de crecimiento representadas por peso de raíz y peso total de la planta, al comparar los tratamientos con el testigo absoluto y el testigo químico. Veinte de los tratamientos evaluados presentaron un incremento en el peso radical en comparación con el testigo absoluto. Asimismo, plantas protegidas con inoculaciones combinadas de agentes biológicos presentaron un mejor efecto en la promoción de crecimiento que la inoculación de los mismos agentes por separado. El tratamiento correspondiente a la combinación de dos aislaciones del género *Pseudomonas*, fue el que presentó los valores más altos en las variables peso de raíz y peso total de la planta (Chávez, 2007).

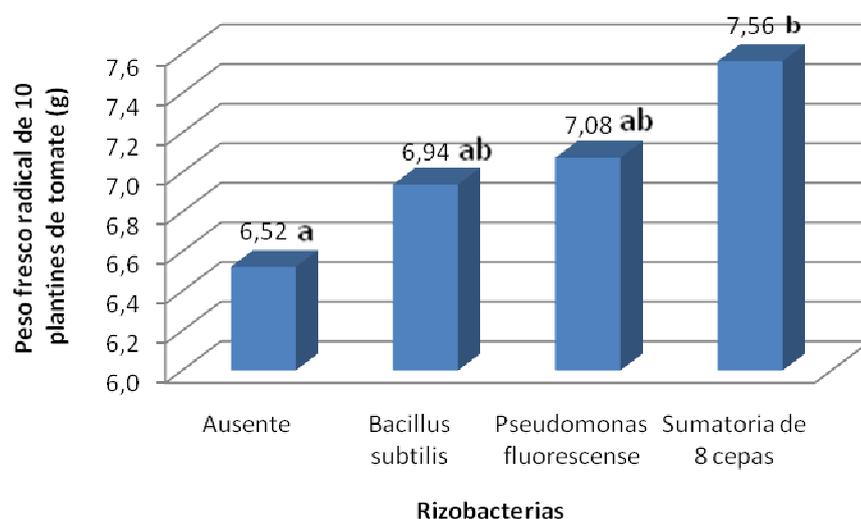


Figura 29. Peso fresco radical de 10 plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre rizobacterias).

Pocasangre (2002), halló que el peso radical y peso total de las plantas fue incrementado significativamente en plantas inoculadas con hongos endofíticos en comparación con el testigo absoluto. Resultados similares fueron documentados por Felde (2002), quien detectó que plantas inoculadas con aislamientos endofíticos del género *Trichoderma* incrementaron el peso radical y foliar de plantas de banano en un 35 y 19% respectivamente, en comparación con plantas no inoculadas.

Peso seco radical. El peso seco radical de 10 plantines de tomate es 2,2% mayor en aquellos plantines de tomate establecidos en sustratos con compost (Figura 30). Esta diferencia si bien es significativa estadísticamente, en términos prácticos no resulta en una diferencia mayor, pero si es consecuente con lo que se observa en todos los parámetros de crecimiento radical en las figuras anteriores.

Relacionando las figuras 28 y 29, se puede observar que las diferencias significativas detectadas para el factor rizobacteria sólo son a nivel de peso fresco radical y no peso

seco radical. Lo mismo sucede con los pesos frescos y secos aéreos, por lo que el mayor peso para este factor estaría dado por agua y no por materia seca.

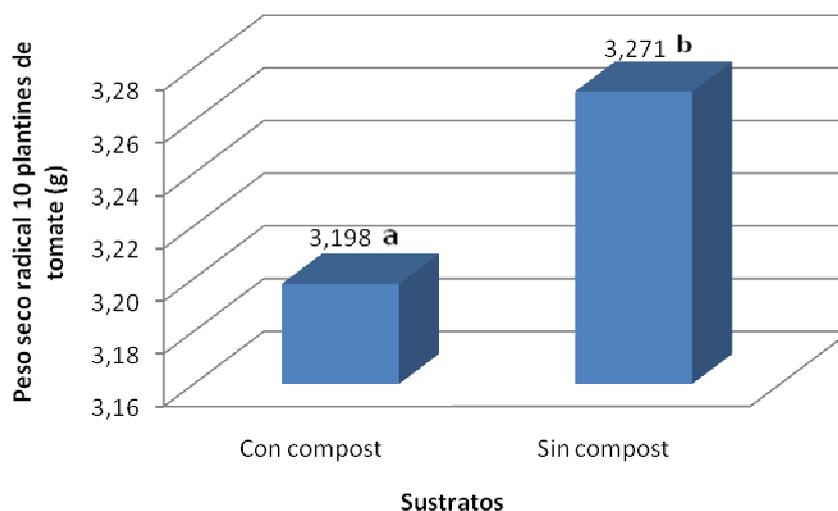


Figura 30. Peso seco radical de 10 plantines de tomate (Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sustratos).

Otros autores como Robles y Barea (2004) sostienen que la producción de biomasa en cada ciclo de cultivo y acumulada es mayor en los tratamiento inoculados que en los no inoculados, en distintos suelos. Obteniendo que el incremento acumulado en producción de materia seca promovido por la inoculación fue aproximadamente de 20% en un sustrato y sólo de 6% en el otro sustrato. Para todas las variables, las diferencias entre los tratamientos inoculado y no inoculado se reducen con el tiempo.

El crecimiento vegetal está dado en parte por el ácido indol acético, hormona vegetal que tiene la capacidad de estimular la división celular. Por otra parte, también provoca aumento de tamaño. La combinación de ambos efectos es responsable del aumento en el crecimiento radical que las rizobacterias promotoras provocan en las plántulas inoculadas (Lindow y Brandi, 1998).

En la Figura 31 se puede ver a simple vista las raíces de los tratamientos en estudio escaneadas y evaluadas mediante el programa Whinrizo. De esta forma resulta evidente que las raíces de los sustratos inoculados con la sumatoria de las rizobacterias son más vigorosas.

En forma reiterada para las diferentes variables de crecimiento el mejor tratamiento correspondió a la sumatoria de rizobacterias y hongos. Esto mismo ocurre en el estudio de Cuesta *et al.* (s.a.) quien confirma que las bacterias usadas estimulan el desarrollo del micelio externo, lo que trae consigo una mayor disponibilidad de nutrientes a la plántula al encontrarse su sistema radical en contacto con un mayor volumen de suelo permitiéndole absorción de iones con baja velocidad de difusión como: el fósforo, el zinc y el molibdeno; y en baja concentración como el potasio, el azufre y el amonio.

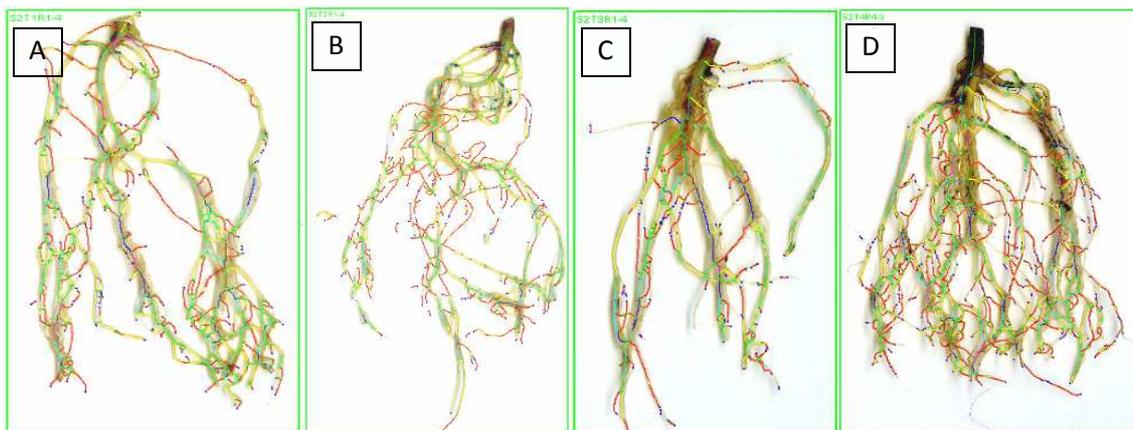


Figura 31. Sistema radical analizado con programa Whinrizo: A) T1 (ausencia de rizobacterias), B) T2 (*Bacillus subtilis*), C) T3 (*Pseudomonas fluorescens*), D) T4 (sumatoria de rizobacterias).

El desarrollo de las raíces, favorecido por efecto de la inoculación de las bacterias, se manifestó directamente en mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Kloepper *et al.* (1991), quienes mencionaron que las bacterias promotoras de crecimiento como *P. fluorescens*, se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo que repercute directamente en el rendimiento del cultivo.

Muchas veces los ensayos que se realizan no muestran diferencias estadísticas significativas, aunque si existen diferencias numéricas. En estos casos resulta interesante realizar observaciones al respecto, puesto que cuando se trabaja a nivel de microorganismos, que son sistemas dinámicos, se debe utilizar el criterio para establecer si posiblemente las diferencias numéricas son importantes. Por ejemplo Cuesta *et al.* (s.a.) estudió el efecto de la inoculación con *Glomus mosseae* descubrió que no produce por sí solo un nivel de peso seco foliar en las plántulas estadísticamente mayor que el alcanzado por el testigo, pero numéricamente sí supera al testigo, lo que muestra aunque de forma muy leve su efectividad para este indicador de crecimiento. Algo similar ocurrió en la evaluación de crecimiento con las inoculaciones de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* que no siendo significativas sus diferencias en relación al testigo para algunos de los parámetros, si lo fueron numéricamente. Para este caso no es tema de discusión el real funcionamiento de estas rizobacterias puesto que generan un efecto numérico, lo que se puede discutir es si efectivamente son las dosis, los momentos de inoculación y los sustratos adecuados para esta variedad de tomates.

Otra explicación que se podría dar a la falta de acción de *Pseudomonas fluorescens* en este ensayo es señalada por Schroth y Hancock (1982), quienes señalan que la capacidad de colonizar raíces es específica de algunas cepas. No todas las *Pseudomonas fluorescentes* exhiben la capacidad de colonizar las raíces en suelos que contienen microorganismos competitivos. Dicho esto y tomando en consideración que el sustrato no fue autoclavado, es posible que existiesen microorganismos competitivos para las *Pseudomonas inoculadas*, y esto no permitió que expresaran su máximo potencial de acción. Esto queda aún más manifiesto considerando que la mayor cantidad de ensayos tienen resultados positivos con la inoculación de estas rizobacterias. Otro

ejemplo de ello es que cepas específicas del grupo *Pseudomonas fluorescens* fueron usadas por Kloepper *et al.* (1980) como inóculo en semillas de cultivos para promover el crecimiento. Estas *Pseudomonas* expresaron la promoción del crecimiento de la planta y rápidamente colonizaron las raíces de papa, remolacha azucarera y rábano. Podría ocurrir también que *Pseudomonas fluorescens* requiere ser inculado en la raíz y no como se realizó en este ensayo.

Maurhofer *et al.* (1994), evaluando la cepa CHAO de *Pseudomonas fluorescens* en la inducción de resistencia sistémica en tabaco contra el virus de la necrosis, detectaron que todas las plantas tratadas mostraban resistencia en las hojas infectadas en la misma magnitud que plantas previamente inmunizadas. Por lo que es posible que la acción de *Pseudomonas fluorescens* sea más evidente si se tienen plantas contaminadas o infectadas y así puedan mostrar directamente su función inductora de resistencia.

Miller y Jastrow (2000) evidencian resultados similares a los obtenidos en este ensayo, encontrando durante el crecimiento del pimentón, incrementos significativos, en la altura de las plantas, largo de raíz, peso seco radical y número de hojas con las cepas en estudio respecto al testigo no inculado. Resulta interesante destacar que el número de hojas también fue significativamente mayor, puesto que es un indicio de la acción no sólo sobre el crecimiento, sino también sobre el desarrollo de los cultivos. También Benngoechea (2006), inculando los cultivos de trigo con *Pseudomonas agglomerans* y reduciendo al mismo tiempo los niveles de fertilización nitrogenada, consiguió sistemas radicales más extensos y más capaces de extraer los nutrientes disponibles en el suelo.

Hasta el momento se le ha dado toda la atención a las bacterias, sin embargo dentro del sistema de la sumatoria de bacterias se encuentra también *Trichoderma harzianum*. Hongo que también cuenta con un gran prontuario de funciones promotoras de crecimiento, al menos así lo señala Pocasangre *et al.* (2004), quien explica que frecuentemente, las raíces colonizadas por *Trichoderma sp.* Presenta un mejor crecimiento y peso radical que las plantas no tratadas, incrementando la productividad del cultivo y su resistencia a factores bióticos y abióticos adversos.

Otros autores como Chávez (2007) también han utilizado el programa WinRhizo, encontrando diferencias altamente significativas para las variables de morfología radical al comparar las plantas protegidas con agentes biológicos y el testigo absoluto, concluyendo que las inoculaciones combinadas presentaron un mejor efecto en el desarrollo de las raíces que la inoculación de los mismos agentes por separado.

Consideraciones finales

El motor del desarrollo de este trabajo, se encuentra sobre los pilares de la búsqueda de plantines de buena calidad. En términos generales un plantín de calidad debiese tener un tallo vigoroso, una altura de 10 a 15 cm, buen desarrollo radicular y libre de enfermedades según Leskovar (2001). La pregunta es entonces, si la aplicación de sustratos inoculados con rizobacterias promotoras contribuye realmente para que esto sea posible. Y los resultados han sido muy promisorios al respecto, por cuanto se han evidenciado mejoras sustanciales en casi todos los aspectos del crecimiento aéreo y radical de los plantines de tomate en estudio, no obstante dichos resultados fueron mucho mejores en los sustratos que no contenían compost.

Respecto al desarrollo del cultivo

Desde la emergencia hasta el momento de trasplante ocurren entre 30 y 70 días. El tiempo que las plantas permanecen en el vivero depende de la variedad de tomate, de las técnicas de cultivo y de los requisitos de crecimiento (Miller y Jastrow, 2000). La duración de plantín en este tomate María Italia, bajo las condiciones de temperatura y manejo comercial que se establecieron en este ensayo, fueron un poco mayores a lo establecido por Miller y Jastrow (2000), terminando en 78 días desde siembra a cosecha de plantín. Considerando que la fecha de siembra fue el 4 de mayo de 2009 y la cosecha el 22 de julio de 2009.

Una de las causas del leve retraso que pudo tener el desarrollo del cultivo son las bajas temperaturas de los meses de mayo, junio y julio de 2009. Johan *et al.* (1981) señalan que el cultivo de tomate requiere de temperaturas entre 18 a 26°C, que durante el día y la noche idealmente debiesen ser de 22 y de 16 °C respectivamente. Según Jaramillo *et al.* (2007), entre 8 y 12°C los procesos de toma de nutrientes y crecimiento alcanzan una intensidad mínima o se detienen; si la temperatura mínima se prolonga por varios días la planta se debilita, y si ocurren temperaturas por debajo de este nivel, la planta sufre una progresiva decadencia o muerte. No obstante las bajas temperaturas de los meses en que se desarrolló el cultivo los plantines de tomate no sufrieron ninguna helada y la mortalidad de plantines estuvo dentro de los márgenes normales de la plantinera Eco-plantas limitada.

Según las recomendaciones para la semilla María Italia se debe trasplantar desde el 20 de junio en la zona de Quillota y Limache, la quincena de Julio en la zona central (RM, Buin, Paine, Talca), y desde el 20 de Julio para la zona de Talca, con el fin de lograr el mayor potencial de esta variedad (Seminis, 2003). Por lo que la producción de tomates de este ensayo coincide plenamente con las fechas establecidas por la empresa Seminis; plantines que de no haber sido usados para evaluaciones podrían haberse comercializado en Talca.

Como se ha podido observar en las figuras que evidencian el avance en los estados de desarrollo, el tratamiento con compost tiene sin duda resultados menores en el avance del desarrollo. Esto se ha atribuido a la gran porosidad que por consiguiente genera una

mayor pérdida de calor del sustrato, sin embargo, también puede ocurrir como los señalan Hallmann y Berg (2006) que existan interacciones negativas entre los agentes de biocontrol inoculados en la planta y los microorganismos nativos de la rizósfera, que en este caso serían los microorganismos pre existentes en el compost.

Se ha demostrado que la aplicación de una combinación de agentes de biocontrol podría simular la situación natural de colonizaciones múltiples de microorganismos en la planta y representar una estrategia de control más consistente que la aplicación individual de los mismos (Pierson y Weller 1994).

Pudo ocurrir que *Pseudomonas fluorescens* definitivamente no estuviese en condiciones óptimas de temperatura para reproducirse, puesto que Loper *et al.* (1964) detectó que la temperatura óptima para la colonización es de 20°C.

Resultados marginales detectados en *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*

Una gran cantidad de autores respaldan y apoyan gran parte de los resultados obtenidos en este ensayo, sin embargo la acción de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* no fue según las expectativas que se tenían. Esto pudo deberse a varios factores: que no existiera gran reproducción de estas; que requieran ser inoculadas a la semilla o bien que requieran dosis mayores de inoculación. Barea y Azcón, (1982) quienes también obtuvieron un bajo o nulo efecto en algunas cepas en el crecimiento del cultivo, señalan que esto pudo deberse a que las cepas no detectaron el medio adecuado en la rizósfera, ya que, en general, para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento. Una última alternativa podría ser la competencia, pues autores como Date (1996) sostienen que la incapacidad para introducir una cepa seleccionada o modificada en suelo donde existen poblaciones nativas se atribuye a un problema de competencia.

Sin duda *Bacillus subtilis* fue la peor inoculación de las 3, sin contar el testigo sin inocular. Esto coincide con otros autores como Terry *et al.* (2005) que sostienen que el género *Bacillus* requeriría una alta inoculación artificial para lograr un efecto positivo en las plantas inoculadas.

De todas formas los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con Chávez (2007). Este último observó que el efecto individual de *Pseudomonas* y *Bacillus* no presentaron un incremento significativo en la promoción de crecimiento de las plantas.

Chávez (2007) demostró que las combinaciones de *Pseudomonas-Pseudomonas* y *Pseudomonas-Bacillus* presentan los mejores incrementos en las variables de promoción de crecimiento representadas por peso, longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical. Por otra parte, el efecto individual de cada una de las bacterias no presentó un incremento significativo en la promoción de crecimiento de las plantas. Esto confirma la importancia de las interacciones positivas entre los agentes de biocontrol.

Mecanismos de acción que justifican los resultados obtenidos

Resulta difícil decir qué efecto específico están cumpliendo las rizobacterias en estudio sobre los plantines de tomate, puesto que existe más de un mecanismo involucrado en la asociación planta rizobacteria, los cuales operan simultáneamente o en asociación. A esta forma de actuar, Bashan y Levanony (1990) le llaman: "hipótesis aditiva". Sin embargo otros autores si han podido señalar en forma específica los mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma Harzianum*.

Más específicamente entre los mecanismos de acción que se han conocido en *Pseudomonas fluorescens* se encuentran: La resistencia sistémica inducida (SIR) previene la patogenicidad antes de que la planta sea atacada por el patógeno (De Felipe, 2009). También ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Berg y Hallmann 2006). Además, se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de defensa en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo (Kloepper y Cryu, 2006). Con relación a la producción de antibióticos, *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de sintetizar algunos compuestos que causan la muerte de aquellos microorganismos que entren en contacto con ellas (Hamdan *et al.*, 1991). Tiene la capacidad de tener actividad fungistática y bacteriostática cuando el hierro es bajo (Haas y Défago, 2005).

Por su parte el género *Bacillus* ha resultado muy eficaz en el control de enfermedades, aunque han recibido menor atención que las *Pseudomonas fluorescentes*. *B. subtilis* efectivo contra patógenos de *Fusarium* y *Rhizoctonia*. (De Felipe, 2009). La cepa de *Bacillus cereus* además de inducir cierto grado de protección sistémica contra la virosis en las plantas de tomate, también promovieron el crecimiento de éstas expresado en una mayor altura, diámetro y en una mayor producción de biomasa. El mejor resultado de esta cepa cuando fue inoculada a la semilla quizá se debió a que hubo una mejor colonización a diferencia de cuando fue aplicada al suelo (Maurhofer *at al.*, 1994).

Otra de las funciones es que son estimuladoras del crecimiento (Jonathan *et al.*, 2000) es a través de la protección contra patógenos. En tomate, la aplicación de *B. subtilis*, y *Pseudomonas fluorescens* entre otros, redujo la penetración e inhibió la reproducción de *Meloidogyne incognita* dentro del sistema radical, esto posiblemente porque son capaces de producir compuestos volátiles tóxicos y antibióticos que pueden afectar a patógenos del suelo.

Pero la utilización de las rizobacterias no sólo actúan a nivel de producción de sustancias o de defensa contra patógenos, sino que influyen directamente en la fisiología de las plantas (Vivas *et al.*, 2003).

En el caso de *Trichoderma*, estos son conocidos como fungicidas biológicos en la agricultura, además, son conocidos como estimuladores de crecimiento en las plantas y presenta gran habilidad para colonizar rápidamente las raíces de las plantas. Además, ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros organismos (López, 2004).

Resultados promisorios con la sumatoria de rizobacterias y hongos

Hasta el momento el énfasis de la discusión ha recaído sobre bacterias utilizadas, sin embargo, el hongo *Trichoderma*, que es utilizado junto con la sumatoria de rizobacterias resulta fundamental para los resultados obtenidos, pues está ampliamente documentado que existen relaciones simbióticas entre hongos y una amplia variedad de plantas. La colonización de hongos puede generar beneficios para la planta hospedera, incluyendo la actividad antagonista y la inducción de resistencia contra patógenos, así como la promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizosfera hacia la planta (Schulz, 2006). Además, se ha evidenciado un incremento en el peso y longitud radical, y en el peso foliar de dichas plantas, en comparación con plantas no protegidas (Pocasangre *et al.*, 2004), tal como ocurrió con las inoculaciones que contenían la sumatoria de rizobacterias y *Trichoderma harzianum*.

Uno de los resultados más relevantes sin duda es observar que en prácticamente todos los parámetros evaluados, la sumatoria de bacterias y hongos genera mejores resultados. Esto sugiere que algunos de los beneficios sobre el crecimiento de las plantas, atribuidos a los hongos, realmente provienen de la combinación con las bacterias asociativas (Miller y Jastrow 2000). Con respecto a esto Terry y Leyva (2006) sostienen que para la agricultura actual reviste gran importancia la preparación de hongos y rizobacterias conjuntos, que tengan una acción eficaz sobre las plantas y el agroecosistema, siendo además un mecanismo más viable desde el punto de vista económico, pues aunque la inoculación simple presenta beneficios respecto a las plantas testigo, la coinoculación supera los beneficios individuales de ambos microorganismos.

Igualmente Cuesta *et al.* (s.a.) señala que los niveles alcanzados con la inoculación dual son significativamente más altos para indicadores de crecimiento aéreo y radical analizados, debido a que al parecer se obtiene mejores resultados cuando se inocula *Glomus mosseae* con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*. Igualmente ocurrió a Terry (1998), pues de forma general, para todos los parámetros de vigor se destacó el tratamiento donde se realizó la coinoculación de microorganismos (bacteria-hongo), alcanzando mayores alturas, diámetro del tallo y longitud del sistema radical así como una masa fresca y seca de la planta, lo que demuestra que ambos microorganismos actúan sinérgicamente cuando se añaden de forma simultánea, resultado que concuerda con Azcon y Acampo (1981) quienes detectaron respuesta a la infección hongo - bacteria, así como un estímulo sobre el crecimiento y desarrollo de diferentes cultivos. Por su parte, también Subba-Rao y Tilak (1985) al trabajar la combinación de ambos microorganismos detectaron incrementos del rendimiento en cebada.

Una de las razones por las que se comportan de diferente forma los tratamientos que incluyen hongos y bacterias de aquellos que sólo tienen uno es por la diferente forma de colonizar que tienen. En ensayos en banano se ha observado que todos los agentes de biocontrol evaluados fueron muy eficientes en colonizar raíz, y tallo sin embargo los mayores porcentajes de colonización ocurrieron con la acción combinada de hongos y bacterias. Las combinaciones de *Trichoderma* con *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* fueron capaces de reducir significativamente la penetración de *R. similis* en comparación con el testigo referencial. Estos resultados sugieren que existe un efecto

aditivo entre hongos y bacterias que es responsable de la reducción de la penetración del nematodo. Asimismo, es muy probable que mecanismos de repelencia y antibiosis estén asociados con este fenómeno (Chávez, 2007).

Hubiese sido interesante, en vista que existe una buena interacción rizobacteria y hongo, haber realizado otro tratamiento con sólo *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, pues Chávez (2007) demostró que las combinaciones de *Pseudomonas-Pseudomonas* y *Pseudomonas-Bacillus* presentan los mejores incrementos en las variables de promoción de crecimiento representadas por peso, longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical. Esto confirma la importancia de las interacciones positivas entre los agentes de biocontrol.

Implicancias de los resultados en fertilización y aplicación de plaguicidas

Cuando se habla de la utilización de rizobacterias para obtener plantines de calidad, no sólo se está aludiendo a un factor de competitividad y eficiencia industrial, sino también a la sustitución de los fertilizantes químicos o los plaguicidas por el uso de microorganismos como mecanismo para evitar la contaminación ambiental que conlleva su utilización. Además en condiciones deficitarias de crecimiento de las plantas, en suelos con problemas, bien por estrés hídrico, salinidad, suelos áridos y degradados, la inoculación con microorganismos resulta muy beneficiosa para paliar este estrés (De Felipe, 2009).

En ningún caso este ensayo pretende excluir las aplicaciones de fertilizantes, sino ser más eficientes en dichas aplicaciones. Esto se confirma con los resultados obtenidos en ensayos de Terry (1998), en que se obtuvo que la inoculación mixta de *Azospirillum sp.* y *Glomus manihotis* combinada con 90 Kg/ha de nitrógeno, logró rendimientos satisfactorios con una reducción del 30% del fertilizante nitrogenado. Esto se confirma con otro ensayo en que la inoculación simple con *Azospirillum sp* o la coinoculación con *Azospirillum sp* y *Glomus manihotis* permitió disminuir el consumo de fertilizante nitrogenado en un 30%, lográndose rendimientos satisfactorios, contribuyendo de esta forma a minimizar las afectaciones al ambiente (Terry, 1996).

Si bien la simbiosis es el mecanismo principal de entrada de nitrógeno a las plantas, la fijación libre o asociativa, puede llegar a ser importante en los suelos con niveles de materia orgánica que no supongan un factor limitante para el proceso reductor de nitrógeno así lo demuestran estudios con *P. agglomerans*, microorganismo de vida libre, puede contribuir de cierta forma al pool de nitrógeno del suelo. (Wijnant, 2008). Siendo *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* microorganismos de vida libre y dada la importancia a la que se ha referido en los resultados obtenidos en otros ensayos antes mencionados en relación a las aplicaciones de nitrógeno, resulta relevante seguir estudiando la influencia de estos rizobacterios en el crecimiento y desarrollo de los plantines. Esto lo afirma Pérez *et al.* (1989), señalando que aunque los fijadores libres apenas se mencionan en algunos estudios, es indudable que contribuyen a las entradas de nitrógeno en el sistema y por ello no conviene ignorar este tipo de fijación. Okon (1985), señala que los efectos de la inoculación son positivos, cuando en los suelos existen niveles intermedios de fertilización de N, P y K, indicando que la inoculación

con bacterias promotoras de crecimiento vegetal no reemplaza la fertilización artificial. Sin embargo, mejora su utilización, logrando los mismos niveles de productividad con un menor gasto de fertilizante.

Es más, la inoculación de rizobacterias no sólo se visualiza como un complemento a los fertilizantes, sino también a los pesticidas, pues una de las técnicas más prometedoras para la protección de plantas es el método de inducción de resistencia, por cuanto la aplicación de plaguicidas suprime directamente al patógeno con el consiguiente riesgo que este vuelva (Ozeretskovskaya, 1995).

La aparición del concepto de biofertilizante representa un buen camino para introducir de forma permanente a las rizobacterias en los manejos agronómicos. Sin embargo, los resultados experimentales indican que las respuestas en incremento de las cosechas por la aplicación de biofertilizantes son variables e impredecibles, lo cual enfatiza la necesidad de refinamiento en la producción de los mismos, la distribución y uso de las técnicas apropiadas para su empleo (Katyal *et al.*, 1994).

Comparación de resultados en sustratos con compost y sin este

Otros resultados importantes obtenidos en este ensayo señalan que los sustratos comercialmente usados hasta ahora, a base de turba y perlita son una buena alternativa para inocular las rizobacterias, no así los sustratos que tuvieron incorporación adicional de compost. Este resultado es bastante inesperado por cuanto existen ensayos en que hay un incremento significativo del crecimiento de las plantas de los tratamientos que combinan *Bacillus cereus* y abono orgánico al suelo mejora la actividad de la población de microorganismos que actúan como agentes de biocontrol. Estos agentes pueden ser rizobacterias y bongos (Hoitink *et al.*, 1996).

Respondiendo al menor crecimiento y desarrollo que se observó en los sustratos con compost, el factor predominante que pudo influir es la temperatura. El exceso de porosidad en dicho sustrato pudo ocasionar que la temperatura se perdiera con mayor facilidad. La temperatura del sustrato afecta a múltiples procesos que influyen en el manejo de los sustratos y en el cultivo, influyendo así directamente en el crecimiento vegetal. El flujo de calor a través del sustrato implica varios procesos, en el material sólido ese calor se transmite por conducción en cambio en los poros ese calor se transmite por conducción, radiación y convección. Por todo lo anterior nace el término de conductividad térmica que incluye todas las componentes. Es importante que los sustratos tengan una capacidad calorífica elevada y una conductividad térmica baja para que mantengan la temperatura en la zona radicular del cultivo (Burés, 1997). Considerando que el calor específico de turba y perlita son 0,03 y 0,02 cal/cm³ °C respectivamente (Boodt *et al.*, 1974). Por cierto, una de las debilidades a considerar en este ensayo es no haber tomado las temperaturas de los sustratos, por cuanto el factor más limitante en el crecimiento es la temperatura nocturna que debe oscilar por 15°C, pero además es necesaria una diferencia de al menos 6°C entre el día y la noche para un buen crecimiento (Del Busto *et al.*, 2002).

Una segunda alternativa es que el compost luego de iniciada la producción haya presentado algún tipo de toxicidad o bien la existencia de microorganismos haya gatillado algún tipo de competencia, sin embargo es poco probable que esto ocurriera puesto que se realizaron los test de toxicidad de rigor previos a la siembra, tratándose además de un compost maduro, esto es muy relevante, así lo dice Burés (1997) señalando que materia orgánica puede albergar microorganismos patógenos y a su vez actuar como un reservorio dosificador de nutrientes, por ello los materiales orgánicos deben estabilizarse previamente mediante el compostaje y maduración.

La tercera y última alternativa, que pudo influir es el pH que para el caso del sustrato con compost estuvo un poco más alcalino que el rango óptimo que requiere el tomate (5,8-7,2) (Jaramillo *et al*, 2007).

Proyecciones del uso de rizobacterias

Investigaciones a través de muchos años han usado la introducción de microorganismos para el control de enfermedades del suelo en las plantas. Se han realizado numerosos estudios con la utilización de microorganismos no parásitos en el control biológico y estos trabajos han dejado evidencia de que la inoculación con bacterias al suelo y a semillas promueven el crecimiento en las plantas (Kloepper y Schrath, 1991). De hecho Okon y Labandera (1994), realizaron una acabada revisión durante 20 años (1974-1994) de las experiencias realizadas con respecto a las inoculaciones de PGPR en distintos países y en condiciones edáficas y climáticas muy diversas. Efectos positivos fueron obtenidos en el 60-70% de los experimentos de inoculación, con incrementos significativos, generalmente en el rango de 5-30% en los rendimientos de los cultivos. En contraste, en la literatura internacional se encuentran estudios que indican que las respuestas a la inoculación con PGPR son variables y en algunos casos son inconsistentes. A raíz de estos estudios y todos los otros que fueron citados se puede decir que estas rizobacterias presentan gran interés de parte de los investigadores y por lo reciente de varios de los estudios aún queda mucho por seguir descubriendo de ellas. En efecto si bien la bibliografía habla de las PGPR en forma genérica, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son las bacterias más frecuentemente aisladas de la rizósfera y tienen un efecto sobre la promoción de crecimiento en varios cultivos de importancia económica (Sikora 1992). Otra rizobacteria con resultados promisorios, pero que no fue utilizada en este ensayo es *Azotobacter*. Roque *et al*. (1994), sostienen que en el cultivo de la yuca al analizar la respuesta a la fertilización nitrogenada y su combinación con *Azotobacter* demostraron que los mejores resultados se obtuvieron con esta combinación. Por lo que queda mucho por seguir investigando.

A su vez la aplicación de estas rizobacterias no se queda sólo en el plano de la ciencia y la investigación, pues ya se encuentran disponibles en el mercado algunas de estas. Chávez (2007). Señala que dentro de los productos comercialmente disponibles se encuentra *Bacillus subtilis*, ampliamente utilizadas para el biocontrol de *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Aspergillus spp*. De hecho *Bacillus thuringiensis* es un agente de biocontrol que representa el 90% del mercado mundial de bioinsecticidas. Otras especies de *Bacillus* forman parte de productos de biocontrol.

Finalmente se puede decir que los resultados sugieren que las bacterias promotoras de crecimiento tienen potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés hortícola (Díaz *et al.*, 2001). Pudiendo ser aplicadas a semillas, tubérculos y raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Chanway *et al.*, 1989). Por ello el desafío es estudiar si la inoculación de estas rizobacterias a los sustratos, como método alternativo es factible y viable en el tiempo.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones experimentales en las que se realizó este estudio, se puede concluir que:

Es posible caracterizar física, química y biológicamente mezclas de materiales utilizadas como sustrato y esta práctica es de mucha utilidad para analizar la respuesta tanto de los inoculantes como del cultivo.

El sustrato comercial en base a 70% turba y 30% perlita logró mejores resultados de crecimiento y desarrollo de plantines de tomate, que el sustrato compuesto por 20% turba, 20% perlita y 60% compost.

El inoculante de plantines de tomate en base a una sumatoria de rizobacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*) y un hongo (*Trichoderma harzianum*), obtuvo en nueve variables de crecimiento (altura de planta, diámetro de tallo, área foliar, peso fresco aéreo, largo radical, volumen radical, ramificaciones radicales, área foliar y peso fresco radical), resultados superiores que al utilizar los inoculantes con rizobacterias individuales.

En consecuencia y respondiendo a los objetivos de este estudio, los resultados obtenidos señalan que las rizobacterias estimulan el crecimiento de plantines de tomate, no así el desarrollo de los mismos y, que los sustratos sin incorporación de compost responden favorablemente a la inoculación de estas rizobacterias.

Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio sería necesario realizar un estudio técnico económico comparativo, que permita establecer la conveniencia del uso de esta alternativa.

BIBLIOGRAFÍA

- ANSORENA, J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Ediciones Mundi Prensa, España. 172p.
- ARGO, W. 1998. Root medium physical properties. HortTechnology, 8(4): 481-485.
- AZCON, R and J. OCAMPO. 1981. Factors affecting the vesicular arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thieteen wheat cultivars. New Phytologist. 87(4): 677-685.
- BAGYARAJ D. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi pp. 131-153 In: Powell C. and Bagyara D. (Ed.) VA Mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton. 300p.
- BAREA, J. 1991. Vesicular arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. Advance Soil Science 15: 1-40.
- BAREA, J. y C. AZCÓN. 1982. La rizósfera: interacciones microbio planta. Anales de. Edafología. y Agrobiología 41 (8): 1517-1532.
- BAREA, J., M. POZO, R. AZCON and C. AZCON. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 56(417): 1761-1778.
- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental. Microbiology 51(5): 1089-1098.
- BASHAN, Y. and H. LEVANONY. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology (36): 591-608.
- BENGOECHEA, M. 2006. Evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal de *Pantoea agglomerans* y *Azospirillum brasilense* encapsuladas sobre trigo (*Triticum aestivum* L.) var. Otto. Memoria Lic. en Agr. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 138 p.
- BERG, G. and J. HALLMANN. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. Soil Biology 9: 53-69.
- BOODT, M., O. VERDONCK, and I. CAPPAERT. 1974. Method for measuring the waterrelease curve of organic substrate. Acta Horticulturae 37: 2054-2062.
- BURDMAN, S., E. JURKEVITCH and Y. OKON. 2000. Recent advances in the use of plant grow promoting rhizobacteria (PGPR) in agricultura. pp. 229-250 In: Subba, N.

and Y. Dommergues (Ed.) Microbial interactions in agricultura and forestry, Science Publishers Inc. United Kingdom. 302p.

BURÉS, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas, Madrid. 340p.

CAESAR, T., A. CAESAR, J. GASKIN, U. SAINJU and W. BUSSCHER. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soli in vitro. *Applied Soil Ecology* 36(1): 10-21.

CALDERÓN, A. 2006. [On-line]. Sustratos agrícolas. Universidad de Chile. Disponible en: <http://www.viverosmininco.cl/documentos/sustratos.pdf>. Leído el 15 de marzo 2009.

CHANWAY, C., R HYNES and L NELSON. 1989. Plant growth promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biol. Biochem.* 21(4): 511-517.

CHÁVEZ, N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. 85p.

CUESTA, I., A. FERRER y E. RENGIFO. s.a. [On-line] Importancia de la inoculación dual de bacterias y *glomus mosseae* sobre crecimiento y micorrización de plántulas de *swietenia macrophylla x mahagoni*. Disponible en: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1064/cuf0112s.pdf>. Leído el 15 de junio de 2010.

DATE R., 1996. Selection of strains for inoculant production. pp. 1-10. *In:* Balatti A.P. & Freire J.R. (Eds.). *J. Legume Inoculants. Selection and Characterization of strains. Production, use and Manegement.* La plata, Argentina. 148p.

DE FELIPE, M. 2001. Aplicación de biotecnologías de inoculación microbiana para optimizar la reforestación en suelos marginales del sudeste de la comunidad de Madrid.

DEL BUSTO, A., L. PALOMINO, L. LEÓN, R. CRUZ, R. HERNÁNDEZ, M. GARCÍA y Y. SANTANA. 2002. [On-line] Aspectos biológicos del cultivo de *Lycopersicon esculentum* Mill, (Tomate) Disponible en: <http://www.buscagro.com/www.buscagro.com/biblioteca/Armando-del-Busto-Concepcion/Tomate.pdf>. Leído el: 24 de mayo de 2010.

DENARDIN, N., M. NITSCHKE y J. FREIRE. 1999. Sobrevivencia de estirpes de *Bradyrhizobium* en inoculantes formulados a base de goma xantana. *In:* XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador. 293p.

DÍAZ, P., R. FERRERA, J. ALMARAZ y G. ALCÁNTAR. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Redalyc Terra Latinoamericana* 19(4): 327-335.

FALLIK, E., K. SARG; and Y. OKON. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum* in wheat. pp. 77-85. In: Okon, Y. (Eds.). *Azospirillum plant association*. Boca Ratón: CRC Press. Florida, USA.

FELDE, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Mag. Sc. Thesis. Bonn, DE, University of Bonn. 53 p.

GAETANO, A. 2004. Efectos de la inoculación con *A. brasilense* sobre plantas de arroz (*Oryza sativa*). Memoria Lic. Agr. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 33p.

GARBAYE, J. 1994. Helper bacteria: a new dimensión to the mycorrhizal simbiosis. *Hew Phytol.* 128(1): 197-210.

HAMDAN, H.; D. WELLER and L. THOMASHOW. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(11):3270-3277.

HASS, D and G. DÉFAGO. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3(4): 307-319.

HOITINK, H.; A. STONE and D. HAN. 1996. Suppression of plant diseases by compost. pp. 47-52. In: VI Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas y V Taller Latinoamericano Sobre Moscas Blancas y Geminivirus. Memorias, Sep. 29-Oct.4, Acapulco, México.

HONORATO, R. 2000. Manual de Edafología, 4ta ed. Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, 241p.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA (INE), Chile. 2009. Censo Agropecuario 2007. [On-line]. Superficie cultivada con hortalizas, año agrícola 2006/2007, por sistema de cultivo, según región y especie. Disponible en: http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/censo_agropecuario_07.php. Leído el 5 de enero 2009.

JARAMILLO, J.; V. RODRÍGUEZ, M, GUZMÁN, M. ZAPATA y T. RENGIFO. 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO-MANA-CORPOICA y Gobernación de Antioquia (Eds), Centro de Investigación "La Selva", Antioquía. 331p.

JIMÉNEZ, B. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry* 33(2):167-172.

- JIMÉNEZ, J. 1996. Evaluación de inductores de resistencia a germinivirus y promotores del crecimiento en el cultivo del tomate. Tesis Magister Educación y desarrollo ambiental. Agrícolas y recursos. Costa Rica, Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza, Escuela de postgrado en Ciencias Agrícolas y recursos naturales. 74p.
- JIMÉNEZ, R., G. VIRGEN, S. TABARES y V. OLALDE, 2001. [On-line]. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Disponible en: <http://www.redepapa.org/delgadillo.pdf>. Leído el 30 de diciembre 2008.
- JOHAN, D., F. OROZCO Y C. GLASS, 1981. Manual para tomates. Editorial Trillas, S. México, D. F. (ISBN 968-24-1112-2). 34p.
- JONATHAN, E., K. BARKER, E. ABDEK-ALIM, T. VRAIN, D. DICKSON. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica* 30(2):231-240.
- JULCA, A., L. MENESES, R. BLAS y S. BELLO. 2006. [On-line]. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia* 24(1): 49-61.
- KATYAL, J., B. VENKATESWARLU and S. DAS. 1994. Biofertilizers for nutrient supplementation in dryland agriculture. Potentials and problems. *Fert. News* 39(4): 27-32.
- KIRK, G., C. BEGG and J. SOLIVAS. 1993. The chemistry of the lowland rice rhizosphere. *Plant Soil* 155(7): 83-86.
- KLOEPPER, J. 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents pp 225-274. In: Marcel Dekker (Eds). *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management.*, New York, Usa.
- KLOEPPER, J., M. SCHROTH and T. MILLER. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70: 1078-1082.
- KLOEPPER, J. and M. SCHROTH. 1991. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*. 71: 642-644.
- KLOEPPER, J., R. ZABLOTOWICZ, E. TIPPING y R. LIFSHITZ. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizer. pp. 315-326. In: D.L. Keister y P.B. Cregan (Eds.). *The rhizosphere and plant growth*. The Netherlands.
- KLOEPPER J. y C. BEAUCHAMP. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbil.* 38: 1219-1232.
- KLOEPPER, J. and C. CRYU. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced resistance. pp. 33-52. In: Schulz, B., C. Boyle and T. Sieber. (Eds). *Microbial root endophytes*. *Soil Biology Volume 9*. 367p.

LESKOVAR, D. 2001. [On-line]. Producción y ecofisiología del trasplante hortícola. Disponible es: <http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Curso.pdf>. Leído el: 23 de abril de 2010.

LINDOW, S. and M. BRANDL, M. 1998. Contribution of Indole-3-Acetic Acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. Department of Plant and Microbial Biology, University of California. 220p.

LÓPEZ, P. 2004. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. pp. 189-191. In: Control biológico de plagas agrícolas., Manual Técnico N° 53. Turrialba, Quito Ecuador. 138p.

LOPER, J., T. SUSLOW and M. SCHROTH. 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology*. 74: 1454-1460.

LUCY, M., REED, E. Y GLICK, B. 2004. Applications of free living growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1): 1-25.

MAURHOFER, M., C. HAZE, P. MEUWLY, J. METRAUX and D. DEFAGO. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84(2): 139-146.

MENESES, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Tesis Magister. Sc. Turrialba, Universidad de Costa Rica, CATIE. Costa Rica, 67p.

MESSERER, D. 1998. Sustratos alternativos en la propagación de palto (*Persea americana*). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, Chile. 61p.

MEYER, J. and R. LINDERMAN. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular arbuscular. *Soil Biology and Biochemistry* 18(2): 185-190.

MILLER R., JASTROW J. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Y. Kapulnick, Douds (Eds). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer. 318 p.

OFICINA DE ESTUDIOS Y POLITICAS AGRARIAS (ODEPA), Chile. 2008. [On-line]. Boletín Estadístico Comercio Exterior Silvoagropecuario N° 51 Enero-Septiembre de 2008. Disponible en: <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/ComexTrim/Bol-Trimestral-51.pdf>. Leído el 30 de diciembre 2008.

OKON, Y. 1985. *Azospirillum* as a potencial inoculant for agriculture. *Trends Biotechnology* 3(9): 223-228.

- OKON, Y. and C. LABANDERA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field. *Soil Biology and Biochemistry* 26(12): 1591-1601.
- OLIVEIRA E., E. SIEVERDING and S. TORO. 1987. Interaction between three species of VAM fungi and one isolate of *Pseudomonas putida* on casava. *In*: Sylvia, D., L. HUNG AND J. GRAHAM (Eds.). *Mycorrhizae in the Next Decade, Practical Applications and Research Priorities*, University of Florida, Gainesville. 216p.
- OZERETSKOVSKAYA, O. 1995. Induced resistance in the solanaceae. pp. 31-62. *In*: Hammerschmidt, R. and J. KUC (Eds.). *Induced Resistance to Disease in Plants*. 182p.
- PÉREZ, M., F. GUTIÉRREZ, J. GONZÁLEZ y F. BERMÚDEZ. 1989. Entradas biológicas de nitrógeno en un bosque ribereño. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* 3: 207-210.
- PIERSON, E. y D. WELLER. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress Take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84(9):940-947.
- PIETERSE, C. y L. VAN-LOON. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends. Plant Science* 22(2): 291-296.
- POCASANGRE, L. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. pp. 33-39. *In*: Riveros, A.; L. Pocasangre y F. Rosales (Eds.). Turrialba. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas, Memoria del taller internacional realizado en CATIE Costa Rica. Agosto. 27-30, 2002.
- POCASANGRE, L., A. FELDE, C. CAÑIZARES, A. RIVEROS, F. ROSALES y R. SIKORA. 2004. [On-line]. Manejo alternativo de fitonemátodos en banano y plátano. Disponible en: http://musalit.inibap.org/pdf/IN050664_es.pdf. Leído el: 13 de mayo de 2010.
- RAMOS, B. 1999. Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género *Bacillus* para promover el crecimiento vegetal. Tesis Doctor en Biología, Madrid, España. Universidad San Pablo CEU, Facultad de ciencias experimentales y técnicas. 241p.
- REYES, I., L. ALVAREZ AND AYOUBI, L. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1): 37-48.
- ROBLES, C. y J. BAREA. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamericana* 22(1):59-69.

ROQUE, A., V. MARRERO, J. GUZMAN, A. CASTILLO y A. BUENO. 1994. Respuesta de la yuca (*Manihot esculenta*) a la fertilización nitrogenada y combinación con biofertilizantes. *Cultivos Tropicales* 15(3): 58: 66.

SANTILLANA, N., C. ARELLANO y D. ZÚÑIGA. 2005. Capacidad del Rhizobium de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). *Ecología aplicada*. 4(1-2): 47-51.

SCHOEBITZ, M. 2005. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.). Tesis Lic. en Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. 56p.

SCHROTH, M. AND HANCOCK, J. 1982. Disease suppressive soils and root colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.

SEMINIS, 2003. [On-line]. Maria Italia: Tomate híbrido indeterminado. Disponible en: <http://www.semilleria.cl/desarrollo/AdjuntosProd/355.PDF>. Leído el: 10 de febrero de 2010.

SIKORA, R. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30(1): 270-245.

SUBBA-RAO, N. and K. TILAK. 1985. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. *Soil Biology and Biochemistry*. 17(1): 119-121.

TAPIA, C. 2005. [On-line] Mercado del tomate para consumo en fresco. ODEPA. 2005. disponible en: <https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servlet/contenidos.ServletDetallesScr;jsessionid=99EF1CB7A5EE07>. Leído el 1 de marzo de 2009.

TERRY, A. y A. LEYVA. 2006. Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73

TERRY, A., A. LEYVA and A. HERNÁNDEZ. 2005. Beneficial microorganisms as efficient biofertilisers for tomato crops (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2) 47-54.

TERRY, E. 1996. Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Tesis master en ciencias agrícolas. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la Habana, La Habana, Cuba. 92p.

TURNER, D. 2003. Factors affecting the physiology of the banana root system. pp. 107-113. In: Turner, D. and F. Rosales (Eds.). *Proceedings of an international symposium, San José, Costa Rica, Nov, 3-5, 2003*. 52p.

ULLÉ, J. 2003. [On-line] Comportamiento post-transplante de hortalizas de hojas y brassicáceas, provenientes de diferente volumen de contenedor y mezclas de sustratos, a base de vermicompost, turba, perlita. Disponible en: http://www.inta.gob.ar/sanpedro/info/doc/hor/ju_007re.htm. Leído el 15 de marzo 2009.

UMALÍ, M., D. HUBBELL, H. GASKINS and F. DAZZO. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(1): 219-226.

VALENZUELA Y GALLARDO, 2003. [On-line] Un insumo clave en los sistemas de producción de plantines: Sustratos Hortícolas. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/horticola/hortalizas03.pdf>. Leído el 12 de marzo 2009.

VARGAS M. y M. HUNGRIA. 1997. Micorriza arbuscular pp 67-123. In: M. Vargas y M. Hungria. (Ed.). *Biología dos solos dos cerrados*. Embrapa-CPAC, Planaltina. 524p.

VAVRINA, C., P. ROBERTS, N. BURELLE, and E. ONTERMAA. 2004. Systemic resistance in tomato: greenhouse screening of commercial products and application programs. *Hortscience* 39(2): 433-437.

VESSEY, K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2): 571-586.

VIVAS A., I. VÖRÖS, B. BIRÓ, E. CAMPOS, J. BAREA and R. AZCÓN. 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution*. 126(2): 179-189.

WIJNANT, C. 2008. Efecto promotor del crecimiento vegetal de dos cepas de *Pantoea agglomerans* sobre ballica inglesa (*Lolium perenne* L.) C. Nui Memoria Licenciado en Agronomía. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 94p.

APÉNDICE

Apéndice I. Cuadros todas las fechas evaluadas para el desarrollo del cultivo (%).

Cuadro 8. Resultados de emergencia (%)

| Trat. | Sust. | Rept. | Emer (11-05-09) | Emer (13-05-09) | Emer (15-05-09) | Emer (05-06-09) | Emer (09-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| T1 | S1 | R1 | 8 | 78 | 97 | 73 | 72 |
| T1 | S1 | R2 | 15 | 63 | 88 | 68 | 73 |
| T1 | S1 | R3 | 37 | 82 | 98 | 90 | 75 |
| T1 | S1 | R4 | 10 | 60 | 77 | 77 | 75 |
| T1 | S1 | R5 | 10 | 53 | 85 | 82 | 82 |
| T1 | S1 | R6 | 3 | 55 | 78 | 90 | 87 |
| T2 | S1 | R1 | 0 | 50 | 80 | 75 | 73 |
| T2 | S1 | R2 | 13 | 70 | 85 | 68 | 68 |
| T2 | S1 | R3 | 17 | 83 | 98 | 85 | 90 |
| T2 | S1 | R4 | 10 | 72 | 95 | 90 | 78 |
| T2 | S1 | R5 | 18 | 72 | 100 | 92 | 93 |
| T2 | S1 | R6 | 0 | 53 | 82 | 62 | 83 |
| T3 | S1 | R1 | 2 | 55 | 82 | 80 | 78 |
| T3 | S1 | R2 | 20 | 95 | 100 | 85 | 72 |
| T3 | S1 | R3 | 7 | 63 | 85 | 67 | 83 |
| T3 | S1 | R4 | 7 | 82 | 90 | 87 | 82 |
| T3 | S1 | R5 | 3 | 57 | 77 | 73 | 68 |
| T3 | S1 | R6 | 0 | 45 | 77 | 60 | 77 |
| T4 | S1 | R1 | 3 | 57 | 72 | 72 | 62 |
| T4 | S1 | R2 | 13 | 83 | 98 | 88 | 83 |
| T4 | S1 | R3 | 13 | 58 | 83 | 72 | 73 |
| T4 | S1 | R4 | 5 | 60 | 85 | 68 | 70 |
| T4 | S1 | R5 | 12 | 75 | 100 | 93 | 97 |
| T4 | S1 | R6 | 2 | 53 | 83 | 80 | 75 |
| T1 | S2 | R1 | 0 | 17 | 28 | 37 | 45 |
| T1 | S2 | R2 | 10 | 33 | 65 | 65 | 75 |
| T1 | S2 | R3 | 0 | 25 | 43 | 43 | 50 |
| T1 | S2 | R4 | 5 | 25 | 50 | 48 | 52 |
| T1 | S2 | R5 | 3 | 22 | 42 | 45 | 48 |
| T1 | S2 | R6 | 0 | 32 | 65 | 65 | 73 |
| T2 | S2 | R1 | 0 | 18 | 37 | 45 | 57 |
| T2 | S2 | R2 | 2 | 30 | 58 | 57 | 62 |
| T2 | S2 | R3 | 0 | 30 | 38 | 47 | 50 |
| T2 | S2 | R4 | 3 | 22 | 45 | 45 | 53 |
| T2 | S2 | R5 | 7 | 30 | 65 | 62 | 67 |
| T2 | S2 | R6 | 8 | 35 | 67 | 68 | 77 |

Continúa

Cuadro 8. (Continuación)

| Trat. | Sust. | Rept. | Emer (11-05-09) | Emer (13-05-09) | Emer (15-05-09) | Emer (05-06-09) | Emer (09-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| T3 | S2 | R1 | 0 | 15 | 35 | 52 | 60 |
| T3 | S2 | R2 | 5 | 33 | 68 | 80 | 82 |
| T3 | S2 | R3 | 0 | 32 | 48 | 50 | 53 |
| T3 | S2 | R4 | 2 | 30 | 57 | 60 | 72 |
| T3 | S2 | R5 | 8 | 27 | 55 | 68 | 63 |
| T3 | S2 | R6 | 0 | 27 | 53 | 58 | 60 |
| T4 | S2 | R1 | 0 | 22 | 53 | 63 | 73 |
| T4 | S2 | R2 | 2 | 32 | 55 | 53 | 63 |
| T4 | S2 | R3 | 2 | 22 | 45 | 48 | 43 |
| T4 | S2 | R4 | 5 | 27 | 52 | 58 | 67 |
| T4 | S2 | R5 | 3 | 27 | 57 | 58 | 65 |
| T4 | S2 | R6 | 5 | 38 | 73 | 63 | 82 |

Cuadro 9. Resultados de emergencia y cotiledón expandido (%).

| Trat | Sust | Rept. | Emer (15-06-09) | Emer (13-07-09) | Cot. Exp. (13-05-09) | Cot. Exp. (15-05-09) | Cot. Exp. (18-05-09) |
|-------------|-------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| T1 | S1 | R1 | 82 | 85 | 39 | 102 | 114 |
| T1 | S1 | R2 | * | 73 | 34 | 86 | 107 |
| T1 | S1 | R3 | 97 | 97 | 45 | 81 | 100 |
| T1 | S1 | R4 | 80 | 80 | 38 | 77 | 104 |
| T1 | S1 | R5 | 88 | 90 | 15 | 76 | 94 |
| T1 | S1 | R6 | 90 | 90 | 11 | 70 | 83 |
| T2 | S1 | R1 | 83 | 85 | 37 | 76 | 94 |
| T2 | S1 | R2 | 80 | 70 | 29 | 95 | 112 |
| T2 | S1 | R3 | 100 | 93 | 32 | 88 | 102 |
| T2 | S1 | R4 | 93 | 93 | 34 | 82 | 96 |
| T2 | S1 | R5 | 98 | 100 | 22 | 77 | 97 |
| T2 | S1 | R6 | 95 | 93 | 13 | 70 | 91 |
| T3 | S1 | R1 | 97 | 95 | 26 | 75 | 84 |
| T3 | S1 | R2 | 100 | 92 | 27 | 102 | 111 |
| T3 | S1 | R3 | 90 | 87 | 21 | 77 | 87 |
| T3 | S1 | R4 | 93 | 97 | 16 | 84 | 93 |
| T3 | S1 | R5 | 83 | 80 | 17 | 65 | 96 |
| T3 | S1 | R6 | 82 | 52 | 19 | 106 | 152 |
| T4 | S1 | R1 | 78 | 77 | 24 | 89 | 91 |
| T4 | S1 | R2 | 98 | 100 | 35 | 85 | 100 |
| T4 | S1 | R3 | 85 | 82 | 27 | 78 | 98 |
| T4 | S1 | R4 | 82 | 85 | 24 | 88 | 92 |
| T4 | S1 | R5 | 98 | 97 | 21 | 84 | 100 |

Continúa

Cuadro 9. (Continuación)

| Trat | Sust | Rept. | Emer (15-06-09) | Emer (13-07-09) | Cot. Exp. (13-05-09) | Cot. Exp. (15-05-09) | Cot. Exp. (18-05-09) |
|-------------|-------------|--------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| T1 | S2 | R1 | 63 | 63 | 16 | 32 | 53 |
| T1 | S2 | R2 | 87 | 87 | 29 | 63 | 85 |
| T1 | S2 | R3 | 65 | 68 | 22 | 46 | 71 |
| T1 | S2 | R4 | 70 | 70 | 31 | 60 | 81 |
| T1 | S2 | R5 | 68 | 73 | 18 | 39 | 68 |
| T1 | S2 | R6 | 88 | 88 | 32 | 58 | 75 |
| T2 | S2 | R1 | 75 | 73 | 18 | 39 | 68 |
| T2 | S2 | R2 | 87 | 85 | 29 | 55 | 84 |
| T2 | S2 | R3 | 80 | 80 | 15 | 27 | 50 |
| T2 | S2 | R4 | 75 | 75 | 22 | 49 | 58 |
| T2 | S2 | R5 | 83 | 88 | 26 | 53 | 72 |
| T2 | S2 | R6 | 90 | 92 | 33 | 65 | 78 |
| T3 | S2 | R1 | 73 | 73 | 11 | 27 | 48 |
| T3 | S2 | R2 | 88 | 93 | 30 | 61 | 73 |
| T3 | S2 | R3 | 70 | 70 | 21 | 43 | 69 |
| T3 | S2 | R4 | 87 | 85 | 25 | 55 | 63 |
| T3 | S2 | R5 | 82 | 80 | 25 | 50 | 83 |
| T3 | S2 | R6 | 75 | 78 | 28 | 57 | 74 |
| T4 | S2 | R1 | 92 | 92 | 22 | 42 | 65 |
| T4 | S2 | R2 | 75 | 75 | 29 | 53 | 69 |
| T4 | S2 | R3 | 78 | 82 | 22 | 49 | 59 |
| T4 | S2 | R4 | 82 | 80 | 29 | 58 | 85 |
| T4 | S2 | R5 | 97 | 97 | 19 | 38 | 53 |
| T4 | S2 | R6 | 95 | 95 | 21 | 58 | 79 |

Cuadro 10. Resultados de cotiledón expandido y primera hoja verdadera (%).

| Trat. | Sust. | Rept. | Cot. Exp. (22-05-09) | 1ª hoja (23-05-09) | 1ª hoja (05-06-09) | 1ª hoja (09-06-09) | 1ª hoja (12-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T1 | S1 | R1 | 92 | 76 | 53 | 35 | 27 |
| T1 | S1 | R2 | 120 | 105 | 84 | 61 | * |
| T1 | S1 | R3 | 105 | 90 | 76 | 28 | 12 |
| T1 | S1 | R4 | 104 | 88 | 73 | 46 | 21 |
| T1 | S1 | R5 | 96 | 85 | 69 | 24 | 17 |
| T1 | S1 | R6 | 96 | 91 | 70 | 28 | 9 |
| T2 | S1 | R1 | 94 | 76 | 63 | 33 | 22 |
| T2 | S1 | R2 | 114 | 105 | 74 | 38 | 33 |
| T2 | S1 | R3 | 105 | 93 | 70 | 50 | 18 |
| T2 | S1 | R4 | 98 | 71 | 66 | 30 | 13 |

Continúa

Cuadro 10. (Continuación)

| Trat. | Sust. | Rept. | Cot. Exp. (22-05-09) | 1ª hoja (23-05-09) | 1ª hoja (05-06-09) | 1ª hoja (09-06-09) | 1ª hoja (12-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T2 | S1 | R5 | 100 | 90 | 60 | 40 | 22 |
| T2 | S1 | R6 | 98 | 86 | 39 | 21 | 25 |
| T3 | S1 | R1 | 102 | 96 | 61 | 28 | 18 |
| T3 | S1 | R2 | 115 | 100 | 56 | 20 | 96 |
| T3 | S1 | R3 | 98 | 77 | 52 | 25 | 25 |
| T3 | S1 | R4 | 95 | 79 | 69 | 40 | 29 |
| T3 | S1 | R5 | 100 | 90 | 69 | 33 | 25 |
| T3 | S1 | R6 | 145 | 129 | 71 | 48 | 26 |
| T4 | S1 | R1 | 96 | 87 | 52 | 17 | 24 |
| T4 | S1 | R2 | 88 | 87 | 63 | 30 | 20 |
| T4 | S1 | R3 | 102 | 84 | 69 | 49 | 39 |
| T4 | S1 | R4 | 90 | 75 | 65 | 22 | 31 |
| T4 | S1 | R5 | 100 | 88 | 71 | 41 | 26 |
| T4 | S1 | R6 | 96 | 87 | 60 | 25 | 36 |
| T1 | S2 | R1 | 71 | 39 | 55 | 68 | 79 |
| T1 | S2 | R2 | 87 | 54 | 63 | 67 | 77 |
| T1 | S2 | R3 | 68 | 32 | 56 | 63 | 78 |
| T1 | S2 | R4 | 79 | 43 | 67 | 67 | 71 |
| T1 | S2 | R5 | 68 | 45 | 57 | 59 | 77 |
| T1 | S2 | R6 | 83 | 43 | 64 | 72 | 66 |
| T2 | S2 | R1 | 80 | 45 | 57 | 66 | 75 |
| T2 | S2 | R2 | 67 | 33 | 61 | 61 | 75 |
| T2 | S2 | R3 | 60 | 40 | 54 | 58 | 71 |
| T2 | S2 | R4 | 64 | 49 | 56 | 53 | 64 |
| T2 | S2 | R5 | 83 | 47 | 70 | 70 | 66 |
| T2 | S2 | R6 | 85 | 29 | 67 | 73 | 73 |
| T3 | S2 | R1 | 82 | 34 | 64 | 59 | 61 |
| T3 | S2 | R2 | 80 | 34 | 82 | 79 | 64 |
| T3 | S2 | R3 | 67 | 45 | 69 | 74 | 14 |
| T3 | S2 | R4 | 75 | 37 | 65 | 67 | 65 |
| T3 | S2 | R5 | 88 | 69 | 75 | 56 | 67 |
| T3 | S2 | R6 | 81 | 66 | 72 | 70 | 64 |
| T4 | S2 | R1 | 76 | 56 | 60 | 55 | 62 |
| T4 | S2 | R2 | 80 | 51 | 58 | 56 | 64 |
| T4 | S2 | R3 | 61 | 53 | 55 | 47 | 67 |
| T4 | S2 | R4 | 83 | 50 | 69 | 75 | 77 |
| T4 | S2 | R5 | 66 | 45 | 53 | 55 | 71 |
| T4 | S2 | R6 | 82 | 67 | 61 | 79 | 79 |

Cuadro 11. Resultados de primera y segunda hoja verdadera (%).

| Trat. | Sust. | Rept. | 1ª hoja (16-06-09) | 2ª hoja (05-06-09) | 2ª hoja (09-06-09) | 2ª hoja (12-06-09) | 2ª hoja (16-06-09) |
|-------|-------|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| T1 | S1 | R1 | 14 | 33 | 49 | 69 | 82 |
| T1 | S1 | R2 | * | 9 | 39 | 80 | 82 |
| T1 | S1 | R3 | 19 | 17 | 50 | 88 | 81 |
| T1 | S1 | R4 | 6 | 23 | 48 | 79 | 94 |
| T1 | S1 | R5 | 13 | 22 | 67 | 81 | 85 |
| T1 | S1 | R6 | 13 | 30 | 69 | 91 | 87 |
| T2 | S1 | R1 | 24 | 25 | 53 | 76 | 75 |
| T2 | S1 | R2 | 29 | 24 | 60 | 81 | 86 |
| T2 | S1 | R3 | 18 | 21 | 46 | 89 | 89 |
| T2 | S1 | R4 | 16 | 30 | 54 | 88 | 84 |
| T2 | S1 | R5 | 5 | 32 | 53 | 77 | 93 |
| T2 | S1 | R6 | 21 | 27 | 68 | 77 | 80 |
| T3 | S1 | R1 | 25 | 23 | 54 | 84 | 77 |
| T3 | S1 | R2 | 27 | 36 | 58 | 13 | 82 |
| T3 | S1 | R3 | 31 | 25 | 71 | 79 | 73 |
| T3 | S1 | R4 | 26 | 21 | 45 | 67 | 71 |
| T3 | S1 | R5 | 29 | 23 | 52 | 79 | 75 |
| T3 | S1 | R6 | 29 | 45 | 100 | 132 | 129 |
| T4 | S1 | R1 | 22 | 41 | 63 | 78 | 80 |
| T4 | S1 | R2 | 22 | 25 | 53 | 78 | 77 |
| T4 | S1 | R3 | 37 | 18 | 41 | 65 | 67 |
| T4 | S1 | R4 | 24 | 16 | 61 | 65 | 73 |
| T4 | S1 | R5 | 34 | 26 | 59 | 76 | 67 |
| T4 | S1 | R6 | 40 | 27 | 56 | 67 | 64 |
| T1 | S2 | R1 | 63 | 3 | 3 | 21 | 37 |
| T1 | S2 | R2 | 29 | 12 | 19 | 23 | 71 |
| T1 | S2 | R3 | 59 | 7 | 10 | 17 | 37 |
| T1 | S2 | R4 | 48 | 2 | 7 | 29 | 52 |
| T1 | S2 | R5 | 55 | 5 | 7 | 16 | 39 |
| T1 | S2 | R6 | 51 | 9 | 11 | 34 | 49 |
| T2 | S2 | R1 | 57 | 5 | 11 | 27 | 45 |
| T2 | S2 | R2 | 45 | 6 | 12 | 27 | 57 |
| T2 | S2 | R3 | 65 | 4 | 4 | 29 | 35 |
| T2 | S2 | R4 | 51 | 4 | 18 | 36 | 49 |
| T2 | S2 | R5 | 53 | 0 | 6 | 28 | 42 |
| T2 | S2 | R6 | 49 | 7 | 11 | 25 | 49 |

Continúa

Cuadro 11. (Continuación)

| Trat. | Sust. | Rept. | 1ª hoja (16-06-09) | 2ª hoja (05-06-09) | 2ª hoja (09-06-09) | 2ª hoja (12-06-09) | 2ª hoja (16-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T3 | S2 | R1 | 45 | 7 | 23 | 39 | 55 |
| T3 | S2 | R2 | 41 | 4 | 9 | 30 | 54 |
| T3 | S2 | R3 | 64 | 2 | 2 | 86 | 36 |
| T3 | S2 | R4 | 53 | 6 | 18 | 37 | 49 |
| T3 | S2 | R5 | 52 | 10 | 23 | 35 | 50 |
| T3 | S2 | R6 | 32 | 2 | 6 | 32 | 64 |
| T4 | S2 | R1 | 40 | 9 | 25 | 38 | 60 |
| T4 | S2 | R2 | 44 | 13 | 29 | 36 | 56 |
| T4 | S2 | R3 | 49 | 4 | 6 | 29 | 47 |
| T4 | S2 | R4 | 42 | 4 | 8 | 25 | 60 |
| T4 | S2 | R5 | 53 | 7 | 12 | 29 | 47 |
| T4 | S2 | R6 | 40 | 5 | 7 | 21 | 60 |

Cuadro 12. Resultados de segunda y tercera hoja verdadera (%).

| Trat. | Sust. | Rept. | 2ª hoja (20-06-09) | 2ª hoja (23-06-09) | 2ª hoja (27-06-09) | 3ª hoja (27-06-09) | 3ª hoja (02-07-09) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T1 | S1 | R1 | 76 | 76 | 76 | 16 | 31 |
| T1 | S1 | R2 | 80 | 86 | 80 | 7 | 57 |
| T1 | S1 | R3 | 86 | 48 | 66 | 12 | 28 |
| T1 | S1 | R4 | 90 | 94 | 96 | 10 | 35 |
| T1 | S1 | R5 | 85 | 67 | 81 | 15 | 43 |
| T1 | S1 | R6 | 93 | 89 | 85 | 13 | 43 |
| T2 | S1 | R1 | 84 | 80 | 84 | 8 | 49 |
| T2 | S1 | R2 | 93 | 86 | 81 | 19 | 57 |
| T2 | S1 | R3 | 89 | 54 | 68 | 5 | 41 |
| T2 | S1 | R4 | 89 | 91 | 89 | 21 | 39 |
| T2 | S1 | R5 | 92 | 58 | 93 | 18 | 25 |
| T2 | S1 | R6 | 89 | 84 | 80 | 16 | 30 |
| T3 | S1 | R1 | 84 | 81 | 82 | 11 | 44 |
| T3 | S1 | R2 | 84 | 85 | 82 | 20 | 51 |
| T3 | S1 | R3 | 79 | 58 | 67 | 10 | 33 |
| T3 | S1 | R4 | 76 | 74 | 74 | 17 | 29 |
| T3 | S1 | R5 | 83 | 81 | 79 | 13 | 35 |
| T3 | S1 | R6 | 139 | 113 | 65 | 0 | 29 |
| T4 | S1 | R1 | 80 | 76 | 83 | 17 | 35 |
| T4 | S1 | R2 | 83 | 78 | 78 | 15 | 38 |
| T4 | S1 | R3 | 71 | 65 | 76 | 10 | 27 |
| T4 | S1 | R4 | 69 | 73 | 67 | 12 | 22 |
| T4 | S1 | R5 | 76 | 78 | 88 | 16 | 26 |

Continúa

Cuadro 12. (Continuación)

| Trat. | Sust. | Rept. | 1ª hoja (16-06-09) | 2ª hoja (05-06-09) | 2ª hoja (09-06-09) | 2ª hoja (12-06-09) | 2ª hoja (16-06-09) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T4 | S1 | R6 | 64 | 65 | 55 | 9 | 22 |
| T1 | S2 | R1 | 61 | 71 | 76 | 0 | 21 |
| T1 | S2 | R2 | 75 | 83 | 81 | 2 | 21 |
| T1 | S2 | R3 | 63 | 73 | 71 | 2 | 12 |
| T1 | S2 | R4 | 62 | 74 | 69 | 0 | 14 |
| T1 | S2 | R5 | 64 | 77 | 77 | 2 | 11 |
| T1 | S2 | R6 | 64 | 79 | 75 | 0 | 4 |
| T2 | S2 | R1 | 68 | 75 | 73 | 0 | 32 |
| T2 | S2 | R2 | 63 | 71 | 71 | 4 | 20 |
| T2 | S2 | R3 | 56 | 65 | 63 | 0 | 19 |
| T2 | S2 | R4 | 60 | 71 | 73 | 0 | 13 |
| T2 | S2 | R5 | 57 | 66 | 66 | 0 | 9 |
| T2 | S2 | R6 | 71 | 78 | 76 | 0 | 5 |
| T3 | S2 | R1 | 77 | 82 | 84 | 5 | 14 |
| T3 | S2 | R2 | 73 | 84 | 84 | 0 | 18 |
| T3 | S2 | R3 | 57 | 81 | 86 | 0 | 7 |
| T3 | S2 | R4 | 71 | 75 | 75 | 0 | 12 |
| T3 | S2 | R5 | 79 | 85 | 85 | 0 | 23 |
| T3 | S2 | R6 | 77 | 79 | 79 | 0 | 2 |
| T4 | S2 | R1 | 71 | 75 | 76 | 2 | 29 |
| T4 | S2 | R2 | 76 | 76 | 76 | 2 | 31 |
| T4 | S2 | R3 | 53 | 69 | 69 | 4 | 10 |
| T4 | S2 | R4 | 65 | 75 | 73 | 0 | 8 |
| T4 | S2 | R5 | 66 | 78 | 78 | 3 | 17 |
| T4 | S2 | R6 | 68 | 77 | 72 | 0 | 7 |

Cuadro 13. Resultados de tercera hoja verdadera (%).

| Trat. | Sust. | Rept. | 3ª hoja (06-07-09) | 3ª hoja (10-07-09) | 3ª hoja (13-07-09) | 3ª hoja (17-07-09) | 3ª hoja (22-07-09) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T1 | S1 | R1 | 35 | 59 | 61 | 63 | 63 |
| T1 | S1 | R2 | 59 | 64 | 68 | 77 | 80 |
| T1 | S1 | R3 | 33 | 47 | 48 | 52 | 52 |
| T1 | S1 | R4 | 40 | 73 | 73 | 73 | 73 |
| T1 | S1 | R5 | 44 | 63 | 67 | 72 | 78 |
| T1 | S1 | R6 | 46 | 61 | 65 | 69 | 80 |
| T2 | S1 | R1 | 51 | 57 | 63 | 69 | 69 |
| T2 | S1 | R2 | 60 | 71 | 69 | 69 | 71 |
| T2 | S1 | R3 | 43 | 45 | 46 | 46 | 54 |
| T2 | S1 | R4 | 45 | 57 | 63 | 70 | 80 |

Continúa

Cuadro 13. (Continuación)

| Trat. | Sust. | Rept. | 3ª hoja (06-07-09) | 3ª hoja (10-07-09) | 3ª hoja (13-07-09) | 3ª hoja (17-07-09) | 3ª hoja (22-07-09) |
|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| T2 | S1 | R5 | 28 | 67 | 75 | 80 | 83 |
| T2 | S1 | R6 | 36 | 55 | 66 | 70 | 70 |
| T3 | S1 | R1 | 47 | 65 | 68 | 68 | 70 |
| T3 | S1 | R2 | 53 | 65 | 71 | 75 | 76 |
| T3 | S1 | R3 | 37 | 50 | 58 | 63 | 65 |
| T3 | S1 | R4 | 34 | 41 | 48 | 57 | 60 |
| T3 | S1 | R5 | 38 | 52 | 58 | 63 | 73 |
| T3 | S1 | R6 | 35 | 97 | 100 | 100 | 48 |
| T4 | S1 | R1 | 41 | 43 | 54 | 63 | 65 |
| T4 | S1 | R2 | 40 | 40 | 50 | 67 | 67 |
| T4 | S1 | R3 | 33 | 39 | 41 | 47 | 61 |
| T4 | S1 | R4 | 25 | 29 | 55 | 63 | 63 |
| T4 | S1 | R5 | 29 | 31 | 48 | 59 | 59 |
| T4 | S1 | R6 | 27 | 42 | 55 | 73 | 33 |
| T1 | S2 | R1 | 21 | 26 | 32 | 37 | 53 |
| T1 | S2 | R2 | 23 | 48 | 44 | 44 | 44 |
| T1 | S2 | R3 | 20 | 32 | 44 | 49 | 59 |
| T1 | S2 | R4 | 24 | 43 | 50 | 55 | 71 |
| T1 | S2 | R5 | 14 | 18 | 23 | 27 | 50 |
| T1 | S2 | R6 | 23 | 42 | 45 | 49 | 51 |
| T2 | S2 | R1 | 34 | 34 | 39 | 45 | 68 |
| T2 | S2 | R2 | 25 | 35 | 39 | 43 | 59 |
| T2 | S2 | R3 | 23 | 42 | 48 | 52 | 56 |
| T2 | S2 | R4 | 20 | 29 | 31 | 36 | 64 |
| T2 | S2 | R5 | 15 | 21 | 28 | 32 | 51 |
| T2 | S2 | R6 | 27 | 44 | 51 | 55 | 65 |
| T3 | S2 | R1 | 20 | 27 | 34 | 43 | 50 |
| T3 | S2 | R2 | 21 | 39 | 55 | 57 | 63 |
| T3 | S2 | R3 | 14 | 31 | 36 | 40 | 50 |
| T3 | S2 | R4 | 29 | 41 | 49 | 53 | 55 |
| T3 | S2 | R5 | 25 | 40 | 44 | 48 | 56 |
| T3 | S2 | R6 | 28 | 38 | 43 | 47 | 62 |
| T4 | S2 | R1 | 31 | 53 | 56 | 62 | 69 |
| T4 | S2 | R2 | 36 | 58 | 60 | 62 | 62 |
| T4 | S2 | R3 | 16 | 33 | 43 | 43 | 57 |
| T4 | S2 | R4 | 15 | 40 | 48 | 58 | 69 |
| T4 | S2 | R5 | 19 | 45 | 48 | 52 | 66 |
| T4 | S2 | R6 | 23 | 39 | 42 | 46 | 56 |