



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL
GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON
Rhizobium EN TOMATE DE MESA”**

Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo.

AUTORA:

Shirley Tatiana Jara Carreño.

DIRECTOR:

Ing. Iván Grandá Mora Mg. Sc.

Loja-Ecuador

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CERTIFICACIÓN

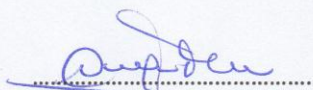
Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.

DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que el trabajo de investigación titulado "**CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON *Rhizobium* EN TOMATE DE MESA**", realizado por la egresada, **SHIRLEY TATIANA JARA CARREÑO**, previo a la obtención del Título de **INGENIERA AGRÓNOMO**, ha sido revisado y se autoriza su presentación final para la calificación correspondiente.

Loja, agosto del 2015



Ing. Iván Granda Mora, Mg. Sc.

DIRECTOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los miembros del tribunal de tesis, luego de proceder a realizar y verificar las observaciones realizadas en el trabajo de investigación "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON *Rhizobium* EN TOMATE DE MESA" de la egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica; Shirley Tatiana Jara Carreño, ha sido revisada y en la misma se han incorporado todas las sugerencias, por lo que aprobamos su impresión y publicación

Loja, agosto 2015



Ing. Gilberto Álvarez Cajas
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dr. Tulio Solano Castillo, Mg.Sc.

VOCAL DEL TRIBUNAL



Ing. Javier Guayllas Guayllas.

VOCAL DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

Yo, Shirley Tatiana Jara Carreño declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Shirley Tatiana Jara Carreño

Firma: .....

Cédula: 0706256344

Fecha: 11 de agosto del 2015

CARTA DE AUTORIZACIÓN

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, Shirley Tatiana Jara Carreño declaro ser autora de la tesis titulada "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON *Rhizobium* EN TOMATE DE MESA", como requisito para optar al grado de: INGENIERA AGRÓNOMO, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visualidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio a la universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los once días del mes de agosto de dos mil quince, firma la autora.

Firma: 

Autora: Shirley Tatiana Jara Carreño

Número de cédula: 0706256344

Dirección: Loja, San Sebastián

Correo electrónico: shirleytati@hotmail.es

Teléfono: 2680146

Celular: 0994430677

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de tesis: Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

Ing. Gilberto Álvarez Cajas

Dr. Tulio Solano Castillo, Mg.Sc.

Ing. Javier Guayllas Guayllas.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Loja, Institución que financió la Investigación.

A mi director de tesis, Ing. Klever Iván Granda Mora, por la oportunidad y confianza que deposito en mí y por el apoyo incondicional desde el inicio hasta el final de la Investigación.

A las personas que me apoyaron en asistencia técnica en el laboratorio y campo Doc. Roldan Torres, Ing. Ángel Robles.

Al Coordinador de la Carrera de Ingeniería Agronómica Ing. Gilberto Álvarez Cajas, por su apoyo y lealtad que han sido de suma importancia para terminar mis estudios con éxito.

Y a mis amigos quienes me brindaron su cariño, apoyo y confianza;

Doc. Marco Augusto Ocampo

Lcda. Lelia Edith Guaycha

Lcda. Maricela Gutiérrez

María José Gutiérrez

Catherine Ocampo

Rafael Gonzalez

Shirley Tatiana Jara Carreño

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y mi grado a:

Mis padres *Vicente William Jara Barreto, Sorayda del Cisne Carreño Chamba* quienes contribuyeron en mi formación personal.

También lo dedico a mis hermanos;

William Jara Carreño, Ginna Jara Carreño y a Karen Jara Carreño.

Shirley Tatiana Jara Carreño

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CONTENIDO	
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DIRECTOR	ii
CERTIFICACIÓN TRIBUNAL	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
TÍTULO	ix
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL CULTIVO DE TOMATE	3
2.1.1 Clasificación taxonómica	3
2.1.2 Origen del cultivo	3
2.1.3 Características botánicas de la planta	4
2.1.4 Requerimiento agroecológico	5
2.1.5 Fertilización y producción	5
2.1.6 Superficie sembrada	5
2.1.7 Composición nutricional	6
2.2 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO	6
2.3 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO(FBN)	7
2.4 MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ASIMBIÓTICOS	8
2.5 EL GÉNERO <i>Azotobacter</i>	9
2.5.1 Clasificación taxonómica de <i>Azotobacter</i>	9
2.5.2 Características del genero <i>Azotobacter</i>	9
2.5.3 Fijación de nitrógeno atmosférico por <i>Azotobacter</i>	10
2.5.4 Mecanismo químico de fijación biológica de nitrógeno por <i>Azotobacter</i>	11
2.6 EL GÉNERO <i>Rhizobium</i>	13
2.6.1 Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i>	13
2.6.2 Características del género <i>Rhizobium</i>	13
2.6.3 Descripción microscópica y macroscópica	14
2.6.4 Metabolismo	14
2.6.5 Ecología de <i>Rhizobium</i>	15
2.6.6 Mecanismo químico de fijación biológica de Nitrógeno por <i>Rhizobium</i> .	16

2.7 CO-INOCULACIÓN <i>Azotobacter - Rhizobium</i>	17
3 METODOLOGÍA	19
3.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO	19
3.1.1 Ubicación política	19
3.1.2 Ubicación geográfica	19
3.1.3 Ubicación ecológica	19
3.2 MATERIALES	20
3.2.1 Equipos de Laboratorio	20
3.2.2 Materiales de Laboratorio	20
3.2.3 Reactivos de Laboratorio	21
3.2.4 Materiales de Campo	21
3.3 METODOLOGÍA	22
3.3.1 Caracterizar morfológica y genéticamente las cepas de bacterias del género <i>Azotobacter</i> , de los cantones Sosoranga y Cariamanga	22
3.3.1.1 Caracterización morfológica de los aislados	23
3.3.1.2 Identificación genética	23
3.3.2 Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos	24
3.3.3 Evaluar el efecto de la co-inoculación <i>Azotobacter - Rhizobium</i> en el rendimiento de la biomasa en el cultivo de tomate de mesa bajo invernadero	25
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	26
3.4.1 Modelo Matemático	26
3.4.2 Esquema del ensayo	27
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
3.5.1 Hipótesis estadística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 CARACTERIZAR MORFOLÓGICA Y GENÉTICAMENTE LAS CEPAS DE BACTERIAS DEL GÉNERO <i>AZOTOBACTER</i> , DE LOS CANTONES SOSORANGA Y CARIAMANGA	29
4.1.1 Caracterización morfológica de los aislados	29
4.1.2 Identificación genética	30
4.2 CUANTIFICAR LA PRODUCCIÓN DE AUXINAS Y SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO DE LOS AISLADOS OBTENIDOS	31
4.2.1 Producción de auxinas	31
4.2.2 Solubilización de fosforo	32
4.3 EVALUAR EL EFECTO DE LA CO-INOCULACIÓN <i>AZOTOBACTER - RHIZOBIUM</i> EN EL RENDIMIENTO DE LA BIOMASA EN EL CULTIVO DE TOMATE DE MESA BAJO INVERNADERO	32

4.3.1	Influencia de la inoculación de los aislados sobre altura y número de hojas.	33
4.3.2	Influencia de la inoculación de los aislados sobre floración y número de frutos	34
4.3.3	determinación de la Biomasa	35
5	DISCUSIÓN	37
6	CONCLUSIONES	42
7	RECOMENDACIÓN	43
8	BIBLIOGRAFÍA	44
9	ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS:		Pág.
Tabla 1.	Composición nutricional de la planta de tomate	6
Tabla 2.	Tratamientos utilizados	25
Tabla 3.	Caracterización morfológica de las bacterias aisladas	29
Tabla 4.	Identificación genética de los aislados basado en la secuenciación de los genes 16S ADNr	30
Tabla 5.	Análisis de solubilización de fosforo por cada uno de los aislados	32
Tabla 6.	Altura y número de hojas del cultivo de tomate a los 7, 15, 30, 60 y 75 DDS	33

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS:		Pág.
Figura 1.	Croquis del diseño experimental de la Investigación	27
Figura 2.	Producción de auxinas (AIA), a las 24 horas.	31
Figura 3.	Producción de auxinas (AIA), a las 48 horas	32
Figura 4.	Número de flores y frutos del cultivo a los 60 y 75 DDS.	34
Figura 5.	Peso fresco de raíz (PFR), peso fresco del follaje (PFF) y peso fresco del fruto (P Fruto).	35
Figura 6.	Peso seco de raíz (PSR), y peso seco de follaje (PSF).	36

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS:		Pág.
Anexo 1.	Prueba de Tukey para AIA a las 24 y 48 horas.	52
Anexo 2.	Parámetros morfológicos, altura y número de hojas en diferentes etapas de crecimiento del cultivo.	53
Anexo 3.	Parámetros de biomasa del cultivo	55
Anexo 4.	Prueba de Tukey para altura del cultivo.	56
Anexo 5.	Prueba de Tukey para número de hojas del cultivo	56
Anexo 6.	Prueba de Tukey para número de flores y frutos del cultivo	56
Anexo 7.	Prueba de Tukey para peso fresco del cultivo.	57
Anexo 8.	Prueba de Tukey para peso seco del cultivo.	57
Anexo 9.	Tríptico de día de campo.	58
Anexo 10.	Evidencias fotográficas	60

“CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON *Rhizobium* EN TOMATE DE MESA”

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo caracterizar e identificar cepas nativas del género *Azotobacter* y su efecto en co-inoculación con *Rhizobium* en tomate de mesa bajo invernadero. Para el efecto se muestrearon localidades de los cantones de Sosoranga y Cariamanga. La determinación de los aislados bacterianos se realizó mediante la caracterización morfológica de las colonias aisladas, donde se evaluó la tinción al Gram, crecimiento, color, producción de mucus, bordes y elevación. La caracterización fisiológica consistió en la cuantificación de cada aislado en la producción de ácido indól acético (AIA) y solubilización de P. La identificación genética de los aislados resultantes de la caracterización morfológica y fisiológica se realizó mediante la secuenciación parcial de los genes de la subregión 16S ARNr. De un total de 14 aislados iniciales se identificaron 6 géneros bacterianos, entre ellos *Azotobacter* y *Rhizobium*. Todos los aislados fueron capaces de producir AIA y no así solubilizar fosforo. Los mejores resultados para los parámetros morfológicos en cuanto a la altura y número de hojas se obtuvieron con la inoculación del T3 (*Rhizobium* sp.), para la variable número de flores a los 60 días fue T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) y para la variable número de frutos a los 60 y 75 días se vio incrementado con la inoculación de T2 (*Azotobacter vinelandii*). Con respecto a los parámetros de biomasa, a los 75 DDS, tanto para el peso fresco de raíz (PFR) con 19.75 g y el peso fresco del follaje (PFF), con 113.14 g fueron influenciados positivamente con el T3 (*Rhizobium* sp.), para el peso fresco del fruto (PFFr) el mejor tratamiento correspondió a T2 (*Azotobacter vinelandii*) con 39.95 g. Y con respecto al peso seco de raíz (PSR) con 1.46 g y peso seco del follaje (PSF) con 14.70 g el tratamiento T3 (*Rhizobium* sp.), presentó los mejores resultados.

ABSTRACT

This research aimed to characterize and identify native strains of the genus *Azotobacter* and its effect on co-inoculation with *Rhizobium* in tomatoes in a greenhouse. For this purpose, locations within the Sosoranga and Cariamanga, cantons were sampled and geo-referenced using Global Positioning System (GPS). The establishment of bacterial isolates was conducted by means of morphological characterization of the isolated colonies and by using Gram staining, the growth, color, mucus production, and elevated edges were evaluated. The physiological characterization consisted of quantification of each isolate in the production of indole acetic acid (IAA) and solubilization of P. The genetic identification of isolates resulting from the morphological and physiological characterization was done by partial sequencing of the genes of the 16S rRNA sub region. From a total of 14 initial isolates 6 bacterial genera were identified, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Azotobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia* and *Rhizobium*. All isolates were able to produce IAA and not solubilize phosphorus. The best results for the morphological parameters as to the height and number of leaves were obtained with the T3 inoculation (*Rhizobium* sp.). With respect to the variable number of flowers after 60 days after sowing (DAS) was T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) and the variable number of fruit at 60 and 75 DAS increased with the inoculation of T2 (*Azotobacter vinelandii*). With respect to biomass parameters, these were influenced positively with the T3 (*Rhizobium* sp.) after 75 DDS, with the fresh weight of root (FWR) being 19.75 g and the fresh weight of the foliage (FWF) being 113.14 g. With respect to the fresh fruit weight (FFW) the best treatment corresponded to T2 (*Azotobacter vinelandii*) at 39.95 g. Treatment T3 (*Rhizobium* sp.) provided the most positive results with respect to the dry weight of the root (DWR) at 1.46 g and 14.70 g of dry weight of foliage (DWF).

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de gran importancia en Ecuador y particularmente en la provincia de Loja, ya que es consumido por la gran mayoría de las personas en sus diferentes formas debido a las propiedades alimenticias y antioxidantes que presentan. Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) 2013, la producción nacional de tomate fue de 12.745 Tm y a nivel de la provincia de Loja, de 1.787 Tm. En el 2008, la superficie mundial cultivada de esta solanácea ascendió a las 5.227.883 ha, con una producción de 129.649.883 Tm (FAO, 2008) haciendo de este, uno de los cultivos más importantes a nivel global.

El aumento de la productividad es importante para la rentabilidad de este cultivo; sin embargo, ésta se ve afectada por diversos factores limitantes como, la baja fertilidad del suelo, siendo necesario la aplicación de nitrógeno entre otros elementos como el fósforo y el potasio para asegurar el rendimiento adecuado (Loredo *et al.*, 2004). Ante esta situación, es necesario contar con tecnologías adecuadas a la realidad social, económica y ambiental de los agricultores, que permitan obtener productos sanos y de buena calidad y de esa manera reducir al mínimo el uso de fertilizantes químicos, ayudando al medio ambiente y a una alimentación más saludable para las personas (Loredo *et al.*, 2004).

Desde esta perspectiva la fijación biológica de nitrógeno (FBN), que es llevada a cabo por rizobacterias de vida libre como *Azotobacter* sp., y específica por bacterias del género *Rhizobium* sp., pueden contribuir a mejorar el crecimiento vegetal y la disponibilidad de nitrógeno, para una gran variedad de cultivos, incluidos el tomate (Santillana *et al.*, 2005). Debido a que estas bacterias en asociación mutua cumplen funciones específicas en los cultivos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización del fósforo, la producción de hormonas de crecimiento, la producción de antibióticos y la generación de agentes quelantes de hierro. (Jiménez, 2007), lo cual favorece enormemente en el incremento de los rendimientos agrícolas, a la reducción drástica de fertilizantes químicos y costos de producción.

En Ecuador, estudios relacionados con esta temática no existen, debido fundamentalmente al desconocimiento de estos microorganismos y a estudios previos que validen el efecto positivo que ejercen estas rizobacterias en el crecimiento vegetal y fijación de nitrógeno para el cultivo de tomate. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo, dilucidar el efecto de cepas de *Azotobacter* en co-inoculación con *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos y biomasa para este cultivo. Por tanto, la importancia de continuar con estas investigaciones es de primordial importancia, con el fin de obtener cepas-genotipos eficientes para la mejora del crecimiento de las plantas y para proporcionar la eficiencia deseada en la interacción bacterias rizosféricas y tomate de mesa.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, los objetivos que se cumplieron en la investigación fueron:

- Caracterizar morfológica y genéticamente las cepas de bacterias del género *Azotobacter*, de los cantones Sosoranga y Cariamanga.
- Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos.
- Evaluar el efecto de la co-inoculación *Azotobacter* - *Rhizobium* en el rendimiento de la biomasa en el cultivo de tomate de mesa bajo invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL CULTIVO DE TOMATE

2.1.1. Clasificación taxonómica

Según Jaramillo *et al.*, 2007 el tomate cuenta con la siguiente clasificación taxonómica.

Dominio:	Eucariota
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Subfamilia:	Solanoideae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie	<i>ycopersicum</i>
Descriptor:	Miller (1788)

2.1.2. Origen del cultivo

El tomate es importante para la región andina, pues se conoce que es originario de los andes, específicamente de Colombia, Perú, Chile, Ecuador y Bolivia (Arie, *et al.*, 2007; Nuez, 2001) en donde se encuentran todavía varias especies silvestres. Aunque no se conoce con exactitud el origen del tomate común cultivado, se cree que tuvo su origen en Perú y Ecuador.

2.1.3. Características botánicas de la planta

(Rodríguez *et al.*, 2001) manifiesta algunas de las características de la planta y de las cuales mencionamos a continuación:

Raíz: El sistema radicular del tomate consiste en una raíz principal pivotante, la cual crece alrededor de 3 cm por día hasta alcanzar los 60 cm de profundidad, al mismo tiempo crecen simultáneamente raíces adventicias que forman una red densa ocupando un volumen determinado en el suelo.

Tallo: El tallo es herbáceo y recto, durante los primeros días de desarrollo, para luego doblarse, por consecuencia del peso de la planta, por lo que se necesita de estacas para su apoyo. Este puede llegar a medir hasta 2,5 m y este tiene pelos agudos y glándulas que le dan a la planta su olor característico.

Hojas: Las hojas son compuestas y alternadas, el limbo está seccionado en 7, 9 hasta 11 folíolos y al igual que el tallo, las hojas tienen las mismas glándulas de secreción de olor.

Flores: Se presentan formando inflorescencias, las cuales pueden ser simples, cima unípara, cima bípara y cima multípara, pudiendo tener hasta 50 flores por inflorescencia. El tipo simple se encuentra más comúnmente en la parte baja de la planta, siendo los otros tipos más abundantes en las partes altas de la planta. Las flores son radiales y tienen 5 estambres. Presenta ovario súpero, bicarpelar y contiene varios primordios seminales. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano de la flor (Nuez, 2001). Está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo y la corola gamopétala con los estambres adheridos a la corola con las anteras que forman un tubo. El gineceo presenta de dos a treinta carpelos, que al desarrollarse darán forma a los lóbulos del fruto.

Fruto: Es una baya de color amarillo, rosado o rojo por la presencia de licopeno y carotenoides. Su forma va desde la redondeada, pasando por achatada, en forma de pera, alargada y de tamaño variable, según la variedad. En un corte

transversal, se puede observar la piel, la pulpa firme, el tejido placentario y la pulpa gelatinosa que envuelve las semillas.

Semillas: Son grisáceas, tienen forma oval y su superficie está cubierta de vellosidades y restos de tegumento. Miden de 3 a 5 mm de diámetro y en un gramo de semillas puede haber de 300 a 350 semillas. La semilla conserva su poder germinativo durante cuatro años o más si se la mantiene en condiciones adecuadas. La temperatura óptima para la germinación se da entre los 35°C y 10°C.

2.1.4. Requerimiento agroecológico

La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo está entre 21 y 24°C; los vientos fuertes y las temperaturas inferiores a 15°C alargan el período vegetativo. Las temperaturas por sobre los 35°C producirá aborto floral (Romero, 2006). El tomate de mesa prefiere suelos profundos de consistencia media, fértiles, bien equilibrados en sus componentes minerales, ricos en materia orgánica, permeables dados la susceptibilidad del tomate al exceso de agua. Tiene un buen comportamiento en suelos de pH 6 y 7, pero toleran pH de 6 a 8. Los requerimientos de agua para el ciclo de cultivo varían entre 1000 y 1500 mm. El riego debe ser oportuno, en lo posible con agua de excelente calidad. Los riegos se aplican de preferencia en la mañana. El exceso como la falta de agua provoca daños como rajaduras del tomate, ablandamiento o flacidez en los frutos (Romero, 2006).

2.1.5. Fertilización y producción

Según el INEC 2013, a nivel Nacional, la superficie sembrada de tomate sin fertilizante es de 29 Ha, dando una producción de 47 Tm. y la superficie sembrada con fertilizante es de 1.324 Ha, dando una producción de 13.74 Tm.

2.1.6. Superficie sembrada

Según el INEC 2013, la superficie sembrada de tomate a nivel Nacional es de 1.220 ha y la producción es de 12.745 Tm. y a nivel de la provincia de Loja, es de 178 ha y la producción es de 1.787 Tm. En el 2008, la superficie mundial cultivada ascendió a las 5227883 Ha con una producción de 129649883 de Tm (FAO, 2008) haciendo de este uno de los cultivos masivos más importantes a nivel mundial.

2.1.7. Composición nutricional

Las cantidades expuestas a continuación se refiere a 100 g de muestra (FAO, 2008)

Tabla 1. Composición nutricional de la planta de tomate.

Elemento	Cantidad
Agua	93,50%
Proteína	0,9 g
Grasa	0,1 g
Calorías	23
Carbohidratos	3,3 g
Fibra	0,8 g
Fósforo	19 mg
Calcio	7 mg
Hierro	0,7 mg
Vitamina A	1,100 UI
Vitamina B1	0,05 mg
Vitamina B2	0,02 mg
Vitamina C	20mg
Niacina	0,6mg

2.2. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los elementos químicos esenciales para todos los seres vivos ya que forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas y, por lo tanto, es fundamental en la estructura y el metabolismo celular (Boström, 2006). El nitrógeno molecular es el principal constituyente de la atmósfera. La concentración de nitrógeno es resultado del balance entre la fijación del

nitrógeno atmosférico por acción bacteriana, eléctrica y química, y su liberación se realiza a través de la descomposición de materias orgánicas por bacterias o por combustión.

Es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. En estado combinado, el nitrógeno se presenta en diversas formas. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido, los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las Eubacteria y Archaea, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Baca *et al.*, 2000).

2.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

Hasta la primera mitad del siglo pasado no se conocía que la acción fertilizante de las leguminosas se debía principalmente al incremento de nitrógeno en el suelo. La demostración de que la asimilación del nitrógeno atmosférico es realizado por ciertas bacterias *Rhizobium* que viven en simbiosis con las leguminosas formando nudosidades en sus raíces, fue realizado a la mitad del siglo XX (Nadal *et al.*, 2004).

El proceso global microbiano de fijación del nitrógeno, es realmente un proceso complicado que es objeto de una amplia investigación. La fijación biológica del nitrógeno es un proceso bioquímico importante en el medio ambiente y esencial para el crecimiento de las plantas en ausencia de fertilizantes sintéticos (Manahan, 2007).

Todos los organismos pueden convertir el amoníaco en nitrógeno orgánico, pero pocos tienen la capacidad de sintetizar NH_3 y compuestos orgánicos nitrogenados a partir del N_2 . La reducción de N_2 a NH_3 , denominada fijación biológica del nitrógeno, es realizada por algunas especies procarióticas, a veces en relación simbiótica con las plantas. Otras formas inorgánicas del nitrógeno, como el nitrato (NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-) pueden ser reducidas e incorporadas a la materia orgánica por la mayoría de los microorganismos y plantas. Entre las bacterias fijadoras de N_2 , hay algunas que viven en los suelos como

Azotobacter, otras son cianobacterias (algas verde-azuladas) Oliveira *et al.*, (2006) y hay otras que viven en simbiosis con las leguminosas e inducen a la formación de nódulos radicales como es el caso de *Rhizobium* (Peretó *et al.*, 2007).

La fijación efectuada por microorganismos de vida libre (viven independientemente en el suelo y en el agua) se llama fijación asimbiótica, y las que se asocian a especies leguminosas se denomina fijación simbiótica (género *Rhizobium*-leguminosa). Todos los microorganismos fijadores tiene una enzima común, la nitrogenasa, que regula el proceso de fijación transformando el nitrógeno atmosférico en amoníaco (Oliveira *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la fijación biológica del nitrógeno, Pedraza *et al.* (2010) menciona que, además de su importancia en la fertilidad del suelo, es uno de los mecanismos de reposición del nitrógeno que se pierde mediante la desnitrificación, absorción de los cultivos, percolación y erosión; por lo tanto es un proceso básico para que la vida continúe en la tierra. Este proceso biológico es considerado el segundo más importante en el planeta después de la fotosíntesis, junto con la descomposición de la materia orgánica.

2.4. MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ASIMBIÓTICOS

Las bacterias diazótroficas asimbióticas son aquellas que poseen capacidad de fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas, debido a que estas disponen de diferentes mecanismos de protección del complejo nitrogenasa. Además de fijar el nitrógeno atmosférico, estas bacterias favorecen el desarrollo del sistema radical de la planta con la cual conviven, a través de la producción de reguladores de crecimiento u hormonas (Cassán *et al.*, 2001), favoreciendo una mayor absorción de nutrientes por parte de la planta.

Como resultado de esta asociación se han obtenido incrementos del orden de 5% a 30% en los rendimientos de caña de azúcar, maíz, arroz, trigo y gramíneas forrajeras. Estas bacterias se encuentran prácticamente distribuidas en todos los

hábitats (Rodríguez *et al.*, 2003). Entre los principales géneros que se encuentran en vida libre o endófitos asociados a la rizósfera se destacan: *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* (Rodríguez *et al.*, 2003).

2.5. EL GÉNERO *Azotobacter*

2.5.1. Clasificación taxonómica de *Azotobacter*

Joint Genome Institute (2009) ubica a las bacterias del género *Azotobacter* dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobactea
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Azotobacter</i>
Especies:	<i>A. vinelandii</i> , <i>A. chroococcum</i> , <i>A. beijerinckii</i> , <i>A. nigricans</i> , <i>A. armeniacus</i> y <i>A. paspali</i> .

2.5.2. Características del género *Azotobacter*

Los microorganismos de este género comprenden bacterias con forma bacilar, reaccionan a la tinción de Gram como negativos y en cultivos viejos como Gram variables, las células son ovoides y miden aproximadamente de 2 a 4µm de diámetro, siendo las de mayor tamaño las de *A. chroococcum* que llegan a medir hasta 6 µm, puede llegar a formar cadenas de tamaños variables, la forma de resistencia es el quiste, son aerobios pero algunos pueden vivir en

tensiones bajas de oxígeno y su movilidad se debe a flagelos peritricos , además, producen pigmentos solubles en agua en medios específicos (Saribay, 2003).

En medio libre de nitrógeno con glucosa como única fuente de carbono, las células jóvenes de diferentes especies presentan una forma bacilar con extremos redondeados. Las células de cultivos viejos tienden a ser elipsoidales y en ciertos casos es común observar gránulos sudanofílicos y metacromáticos (PHBs) (Segura y Espín, 1998). Las colonias jóvenes de estos microorganismos son generalmente lisas, opacas poco convexas y viscosas.

Bioquímicamente son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato, producen el sulfuro de hidrógeno e hidrolizan almidón, producen promotores de crecimiento como giberelinas, auxinas y citoquininas (Santana *et al.*, 2002), las bacterias de este género fijan asimbióticamente nitrógeno y son solubizadoras de fosfato, además, realizan procesos de biodegradación de plaguicidas como el endosulfan (Castillo *et al.*, 2005). Son quimioorganotróficas, utilizan para su crecimiento azúcares, alcoholes y sales inorgánicas. Son fijadores de nitrógeno en vida libre, fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido (Holt, 2000).

Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Al igual que los demás fijadores de nitrógeno *Azotobacter* sp. es quimioheterótrofo, utiliza como fuente de carbono y energía una gran variedad de ácidos orgánicos, azúcares o sus derivados alcohólicos como el manitol que es el sustrato más empleado para aislarlos y cultivarlos, dentro las sustancias que utilizan como fuente de carbono y energía se encuentra la fructosa, glucosa, sacarosa, acetato, fumarato, piruvato, succinato, acetilmetilcarbinol y α -oxoglutarato (Holt, 2000).

Respecto a la fuente de nitrógeno pueden utilizar nitrato, sales de amonio y aminoácidos, pero ellos pueden además fijar el nitrógeno del ambiente (Garzón *et al.*, 2001), sin embargo, la adición de nitrato de potasio mejora la producción

de biomasa (Santana *et al.*, 2002). Adicionalmente necesita fuente de magnesio, potasio, calcio, hierro y fósforo para realizar la fijación de nitrógeno. Su crecimiento es normal cuando se encuentra a pH de 7.0 - 7.5, requieren una temperatura óptima de 30°C, susceptibles a pH ácido, (Balandreau, 1986) y altas concentraciones de NaCl y temperaturas mayores a 35°C (Saribay, 2003).

2.5.3. Fijación de nitrógeno atmosférico por *Azotobacter*

Azotobacter spp., pueden fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas, ya que estas poseen diferentes estrategias para proteger el complejo *nitrogenasa*. Estas bacterias se encuentran prácticamente en todos los hábitats: suelo, mar, fuentes de agua dulce y sedimentos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Se han realizado una gran cantidad de ensayos a campo donde se demuestra el efecto positivo de *Azotobacter* sobre el rendimiento de diferentes cultivos. Se han publicado los efectos sobre cultivos extensivos como maíz (Hussain *et al.*, 1987; Martínez-Toledo *et al.*, 1988; Pandey *et al.*, 1998) trigo (Zambre *et al.*, 1984; Behl, 2006; Kizilkaya, 2008) y arroz (Kannaiyan *et al.*, 1980; Kennedy *et al.*, 2004). Además del efecto sobre el rendimiento, algunos investigadores observaron que es posible reducir la fertilización nitrogenada hasta en un 50 % con la inoculación con este microorganismo (Kennedy *et al.*, 2004).

A pesar de la considerable cantidad de información experimental que demuestra los efectos positivos de *Azotobacter* sobre el desarrollo vegetal, los mecanismos de promoción del crecimiento en este género bacteriano, no han sido totalmente comprendidos. Los mecanismos que han sido relacionados con la capacidad de promover el crecimiento vegetal en el género *Azotobacter* son principalmente la fijación del nitrógeno atmosférico (Narula *et al.*, 2007), la producción de fitohormonas (Jackson *et al.*, 1964; Azcón y Barea 1975; Khalid *et al.*, 1999); la solubilización de fósforo (Kumar y Narula 1999) y la producción de sideróforos (Behl, 2006); sin embargo, son pocos los trabajos publicados que han intentado

vincular de una manera directa alguno de estos mecanismos con la respuesta observada en las plantas luego de la inoculación.

2.5.4. Mecanismo químico de fijación biológica de nitrógeno por *Azotobacter*

El Mecanismo de fijación biológica de Nitrógeno es explicado por varios autores (Haaker, 1988; Dixon y Kahn, 2004; Sylvia *et al.*, 2005). Las etapas importantes de dicho mecanismo son las siguientes:

- La dinitrogenasa reductasa (Fe) acepta electrones de un bajo donador redox, como la ferredoxina reducida o flavodoxina. Se une a dos moléculas de MgATP.
- Luego, transfiere electrones, uno por cada ciclo, a la dinitrogenasa (MoFe).
- La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) forman el complejo nitrogenasa, el electrón es transferido. Dos moléculas de MgATP son hidrolizadas a dos moléculas de MgATP más dos fosfatos (Pi).
- La dinitrogenasa reductasa (Fe) y la dinitrogenasa (MoFe) se disocian y el proceso se repite.
- Cuando la dinitrogenasa (MoFe) ha obtenido el número suficiente de electrones, se une a una molécula de nitrógeno atmosférico, la reduce y forma una molécula de NH_4^+ , que luego de la formación de una segunda molécula, se dispone en forma de amoníaco e hidrógeno ($2\text{NH}_3 + \text{H}_2$).
- Al final todo el ciclo se repite.

Al ser *Azotobacter* una bacteria heterótrofa, este género utiliza varias fuentes orgánicas de energía, que incluyen hemicelulosa, almidón, azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, que provienen de la materia orgánica presente en los suelos, desde los residuos vegetales de los cultivos y de las plantas silvestres, hasta raíces en descomposición y carbono proveniente de exudados radicales de plantas vivas. La tasa de fijación de nitrógeno, por cantidad de fuente de carbono

consumido, oscila entre los 7 y 16 miligramos de nitrógeno atmosférico por gramo de fuente de energía consumida. Esto se traduce en cerca de 13 kilogramos de nitrógeno atmosférico fijado, por tonelada de fuente de carbono. La variación se da en términos de la cantidad de oxígeno presente (Sylvia *et al.*, 2005; García, 2003).

Espín (2002) sostiene que bacterias como *A. vinelandii* producen polihidroxibutirato, que en ausencia de fuentes exógenas de carbono puede ser utilizado como una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, que es esencial para mantener una tasa respiratoria alta, que proteja a la nitrogenasa del oxígeno.

2.6. EL GÉNERO *Rhizobium*

2.6.1. Clasificación taxonómica de *Rhizobium*

Madigan, *et al.*, (2009), señala que *Rhizobium* se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Filum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Rhizobium*

Especies: *alamii*, *alkalisoli*, *cellulosilyticum*, *daejeonense*, *endophyticum*, *etli*, *galegae*, *gallicum*, *giardinii*, *hainanense*, *herbae*, *huautlense*, *indigoferae*, *leguminosarum*, *loessense*, *lusitanum*, *mesosinicum*, *miluonense*, *mongolense*, *multihospitium*, *oryzae*, *phaseoli*, *lisi*, *tibeticum*, *sullae*, *tropici*, *tubonense*, *undicola*, *vignae*, *yanglingense*.

(<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>).

2.6.2. Características del género *Rhizobium*

Nombre genérico con el que se designa a las bacterias formadoras de nódulos fijadoras de nitrógeno atmosférico principalmente en las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas. Son bacterias de tipo Gram negativas y aerobias obligadas dotadas de flagelos para facilitar su movilización en el suelo (Nadal *et al.*, 2004). Según Silva y Vinuesa (2007), las bacterias que ocupan los nódulos de las plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado rizobios, la característica fenotípica que las distingue de otras bacterias es desarrollar órganos llamados nódulos.

Un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*. Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación directa puede incluir la producción de hormonas, disolución y mineralización de fosfatos, fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico y producción de sideroforos y antibióticos. El ingreso del nitrógeno permite la estimulación de los procesos microbianos en la transformación de la materia orgánica y reciclaje de nutrientes necesarios en los sistemas agrícolas productivos, así como en aquellos considerados como agroecosistema sostenibles (Neyra S, 2013).

La capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosos (Neyra, S., 2013).

2.6.3. Descripción microscópica y macroscópica

Son bacilos de 0.5 - 1.0 x 1.2 - 3.0 μm , Gram negativos, móvil por flagelos peritricos (varios alrededor). Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente

de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en medio YMA (Yeast-Mannitol-Agar) o LMA (Levadura-Manitol-Agar) (Rivera, 2012).

2.6.4. Metabolismo

El género *Rhizobium* es aerobio, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30°C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40°C. El pH varía dependiendo de la especie, así *R. lupini* y *R. japonicum* se adaptan a pH que van desde 3.2 a 4.2, mientras que la mayoría de las especies se desarrolla mejor en suelos próximos a la neutralidad (Gomez, 2005). El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* sp. está entre 1.5 - 5.0 horas (Rivera, 2012).

Es quimiorganoheterótrofo (obtienen energía, carbono y equivalentes reductores para las reacciones biosintéticas de compuestos orgánicos), utilizan un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción ácida en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno (Rivera, 2012).

2.6.5. Ecología de *Rhizobium*

En esta clasificación, cada especie se componía de cepas que compartían un grupo de leguminosas huésped. Más tarde, en 1974, Jordan y Allen dividieron estas especies en dos grupos (Carranza, 2004):

Grupo I: de crecimiento rápido, productoras de ácido, con dos a seis flagelos, A este grupo pertenecen *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. meliloti*.

Grupo II: de crecimiento lento, productores de bases, con flagelos. Aquí se encuentra *R. japonicum* y *R. lupini* (Carranza, 2004).

Según Hernández (2004), indica que las bacterias del grupo *Rhizobium*, pueden desarrollarse como organismos de vida libre y son capaces de formar asociaciones con plantas de la familia de las leguminosas, a la vez que conecta la capacidad fotosintética de la planta con la capacidad de las bacterias de reducir el nitrógeno atmosférico, en donde, posteriormente se desarrolla un intercambio de señales químicas entre ambas partes que permite el reconocimiento e invasión de la leguminosa apropiada por el rizobio, seguido por la proliferación y diferenciación de una estructura altamente especializada denominada “nódulo”, en la cual las bacterias son transformadas en bacteroides.

Los rizobios cubren un espectro ecológico muy amplio: se les encuentra como saprófitos en el suelo, viven como rizobacterias en la zona radical de las leguminosas y otras plantas, y pueden colonizar el nicho ecológico único de los nódulos (Silva *et al.*, 2007).

2.6.6. Mecanismo químico de fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium*.

El proceso de FBN es utilizado en la naturaleza por diferentes géneros bacterianos. Las plantas se benefician de este proceso cuando las bacterias mueren y liberan el nitrógeno al suelo o cuando las bacterias viven en estrecha asociación con las plantas (Willems, 2003). Si bien existe una amplia gama de organismos y asociaciones vegetales que son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera, la relación simbiótica entre rizobios y leguminosas es responsable de contribuir con la mayor cantidad de nitrógeno fijado en especies agrícolas (Chianu *et al.*, 2011).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual el N₂ atmosférico es convertido en amonio, constituyendo la única forma en que los organismos pueden adquirir este elemento directamente de la atmósfera (Dobereiner, 1997). El N es el principal componente de la atmósfera (80 %) siendo la misma su mayor reservorio ambiental. El 60 % del nitrógeno total incorporado cada año al suelo se debe a la FBN, mientras que un 30 % se debe

al proceso industrial de Haber-Bosh y un 10 % proviene de procesos no biológicos realizados en la atmósfera (Frioni, 2011).

Todos estos organismos tienen en común el ser procariotas, que contienen el complejo enzimático nitrogenasa, responsable de la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco (Sylvia *et al.*, 2005). El complejo nitrogenasa está formado por dos componentes proteicos, que deben su nombre a su composición metálica. La proteína que contiene hierro y molibdeno es la dinitrogenasa (con abreviatura MoFe), mientras que la proteína que contiene solamente hierro se denomina dinitrogenasa reductasa (con abreviatura Fe).

Las principales características del complejo enzimático nitrogenasa son descritas por Sylvia *et al.*, (2005):

- Consiste de dos proteínas, la proteína dinitrogenasa (MoFe) y la proteína dinitrogenasa reductasa (Fe)
- Se destruye por acción del oxígeno
- Contiene hierro y molibdeno o vanadio
- Necesita iones de magnesio (Mg^{2+}) para activarse
- Convierte ATP a ADP
- Es inhibida por ADP
- Reduce nitrógeno atmosférico y otras moléculas pequeñas con triple enlace.
- Reduce H^+ a H_2 , incluso cuando el nitrógeno atmosférico está presente.

2.7. CO-INOCULACIÓN *Azotobacter* - *Rhizobium*

(Obando, 2012) manifiesta que la co-inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal ha sido reportada desde hace más de 30 años. Sin embargo, en Ecuador no existen evidencias científicas sobre investigaciones en este campo, razón por la cual es de gran relevancia evaluar herramientas biológicas de fácil acceso, con soportes científicos reproducibles en Ecuador.

La co-inoculación *Azotobacter* - *Rhizobium* puede mejorar algunos de los índices de crecimiento de habas en las condiciones de estrés hídrico, además aumentar del número de nódulos, el contenido total de nitrógeno, contenido relativo de agua, peso seco de raíz, significa germinación y la velocidad de germinación por día (Mokhtar *et al.*, 2011).

Jauhri *et al.* (1979) observaron que la respuesta de *Vigna radiata*, *Glycine max* y *Pisum sativum* con una inoculación doble de *Azotobacter* sp., y *Rhizobium* sp., presentaron los mejores rendimientos en comparación con la inoculación individual de *Rhizobium* sp. Rodelas *et al.* (1999) estudiaron la inoculación mixta de *Vicia faba* L. con cuatro diferentes combinaciones de *Rhizobium* - *Azospirillum* y *Rhizobium* - *Azotobacter*. Los resultados evidenciaron que las co-inoculaciones dieron lugar a cambios en el contenido total, concentración y distribución de K, P, Ca, Mg, Fe, B, Mn, Zn y Cu, en comparación con las plantas inoculadas sólo con *Rhizobium*.

También se ha obtenido una buena respuesta con la co-inoculación de bacterias rizosféricas, fundamentalmente *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter*. Esto ha permitido el desarrollo de biofertilizantes mixtos, que representan una alternativa muy segura, en equilibrio con el medio ambiente, para el manejo integrado de la nutrición de las plantas; en este sentido, la asociación Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) con estas rizobacterias representa un buen ejemplo de este potencial (Dibut, 2009).

3. METODOLOGÍA

3.1. UBICACIÓN DEL PROYECTO

3.1.1. Ubicación Política

La investigación se realizó en dos sectores: la fase de campo se desarrolló en el sector de Moraspamba de la Quinta Experimental Docente “La Argelia” donde se evaluó el efecto de la co-inoculación de los aislados de *Azotobacter - Rhizobium* sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate bajo invernadero; y, la fase de laboratorio en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, donde se realizó la caracterización morfológica y genética de los aislados bacterianos colectados en los cantones Sosoranga y Cariamanga.

3.1.2. Ubicación geográfica

Según el Centro Integrado de Geomática Ambiental (CINFA) (2013). La Quinta Experimental Docente “La Argelia” presenta la siguiente ubicación geográfica:

Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud (msnm)
04 °01'54''	79°11'55''	2138

El Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja presenta la siguiente ubicación geográfica:

Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud (msnm)
03°23'35''	79°11'55''	2138

3.1.3. Ubicación Ecológica

Según la clasificación de Holdridge, la zona de vida es Bosque seco Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura anual promedio de 15 ° C, precipitación de 812.6 mm año⁻¹, humedad relativa de 71.96 %; evaporación media de 111.33 mm

y una velocidad máxima del viento de 5.44 ms^{-1} y mínima de 3.64 ms^{-1} . Se ubica en el área de clima templado andino.

3.2. MATERIALES

Los materiales, equipos y reactivos que se emplearon para el desarrollo de la investigación, estuvieron a disposición en el Centro de Biotecnología y con recursos del Proyecto Bioinoculantes.

3.2.1. Equipos de Laboratorio

- Destilador de agua
- Agitador calentador
- Autoclave
- Flujo laminar
- Incubadora
- Estufa
- Incubadora giratoria
- Calentador de agua
- Balanza analítica
- Microscopio óptico
- Refrigeradora 4°C
- Contador de colonias
- Centrifuga
- Vortex
- Espectrofotómetro.

3.2.2. Materiales de Laboratorio

- Micropipetas (100 y 1000 ul)
- Puntas de micropipetas (100 y 1000 ul)
- Papel lumínico
- EllenMeyer

- Matraces
- Beakers
- Cajas Petri
- Microtubos 1.5 ml

3.2.3. Reactivos de Laboratorio

- Agar Nutriente
- Sacarosa
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- NaCl
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Agar-Agar
- Extracto de levadura
- Manitol
- Cloruro de Calcio
- Triptona
- Cloruro de calcio
- Carbonato de calcio
- Sulfato de magnesio
- Fosfato de potasio
- Agarosa
- Cebadores Universales
- Cebadores específicos
- Taq DNA polimerasa
- Kit de purificación QIAquick
- Kit de extracción de ADN

3.2.4. Materiales de Campo

- Plántulas de tomate
- Lampas

- Machetes
- Barretón
- Carretilla
- Baldes plásticos
- Fundas plásticas
- Turba
- Tierra negra
- Arena

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. “Caracterizar morfológica y genéticamente las cepas de bacterias del género *Azotobacter*, de los cantones Sosoranga y Cariamanga”

Para cumplir con este objetivo se inició colectando muestras de raíces y suelo del cultivo de tomate de los cantones Cariamanga y Sosoranga, puesto que estas son zonas productoras de tomate, para la colecta se tomaron en cuenta características como superficie y variedades sembradas. Estas zonas fueron georreferenciadas mediante la utilización del Sistema de Posicionamiento Global (GPS). En el laboratorio las muestras de raíces colectadas se lavaron con agua destilada y luego fragmentadas en segmentos de 1 a 1.5 cm de longitud, luego se realizó la desinfección superficial con una solución a base de etanol (70%) por un minuto, e hipoclorito de sodio al 3% por cinco minutos y cinco enjuagues con agua destilada estéril por cinco minutos (Rangel-Lucio, 2011).

Para las muestras de suelos se hicieron diluciones seriadas de hasta 10^{-7} y tanto los aislados obtenidos a partir de raíces y suelo se sembraron en cajas de Petri con agar nutriente e incubando a 30°C durante 72 horas para observar sus características morfo-culturales.

3.3.1.1. Caracterización morfológica de los aislados

La caracterización morfológica de los aislados se realizó mediante análisis de los parámetros morfológicos de las 14 colonias aisladas, tales como: crecimiento, color, bordes, elevación, respuesta a la tinción al Gram y caracterización morfológica de la célula mediante la observación en microscopio (Torres-Gutiérrez, 2008).

3.3.1.2. Identificación genética de los aislados

La identificación genética de los aislados bacterianos obtenidos luego de la caracterización morfológica, se realizaron en el Laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Loja, dichos estudios se llevaron a cabo mediante las técnicas de biología molecular 16S ADNr, específicamente el aislamiento de los genes de la región 16S ARNr, la cual es una región muy conservada del genoma de los microorganismos. Se llevó a cabo la extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo propuesto por Maloy (1989). El procedimiento consistió en realizar la suspensión de una colonia de *Azotobacter* en 5 ml de caldo nutritivo e incubar 48 h a temperatura ambiente a 150 rpm. Se transfirieron 1.5 ml del cultivo a tubos eppendorf estériles para centrifugar a 13000 rpm por 2 min y se desechó el sobrenadante.

El aislamiento del ADN de las colonias aisladas Gram negativas cultivables objeto de este estudio, se realizó utilizando el Kit de extracción de ADN (CHARGE SWITCHgDNA MINI BACTERIA KIT x 50) INVITROGEN (2014) siguiendo el protocolo del fabricante. Los genes de la región 16S ARNr se amplificaron con los primers universales: 5' TGGCTCAGAGAACGAACGCTGGCGGC' (Y1) y 5'TACCTTCTTACGACTTCACCCCAGTC' (Y2), los cuales amplifican prácticamente toda la región (150 pares de base) correspondiente a los genes 16S ARNr (Borda-Molina *et al.*, 2009).

Se realizó las siguientes secuencias de ciclos térmicos para la amplificación de la región 16S ARNr: con un paso inicial de desnaturalización del ADN de 93°C por dos min; 35 ciclos con un programa de temperatura de 93°C por 45 seg., de

desnaturalización a 62°C por 45 seg., de anillamiento y elongación a 72°C por cinco min y un paso final de extensión de los cebadores a 72°C (Borda-Molina *et al.*, 2009). Finalmente se redujo la temperatura a 10°C hasta retirar el producto de la amplificación del termociclador de PCR. El producto de la amplificación de los genes 16S ARNr se purificó con el kit de purificación (Purelink Quick Gel Extracction and PCR Purification) INVITROGEN (2014) acorde con las instrucciones del fabricante y se analizó posteriormente mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (1 g de agarosa en 150 ml de bufer TAE 1 X) a 110 V durante 45 min. Luego de ello se enviaron las muestras de ADN purificado para la reacción de secuenciación a MACROGEN EE-UU y posterior alineamiento de las secuencias, así como la cercanía de las mismas se llevó a cabo mediante el formato FASTA y la homología de las secuencias con las secuencias depositadas en la base de datos de nucleótidos internacional GeneBank.

Esta metodología permitió determinar los géneros bacterianos, descritos en la tabla 1 y tabla 3.

3.3.2. “Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos”

Esta determinación se realizó por método colorimétrico usando el reactivo Salkowski (12 g L de FeCl_3 en 7.9 M de H_2SO_4) (Glickman y Dessaux, 1995). Se inocularon cada una de las cepas aisladas en medio Ashby liquido suplementado con 2.5 g L^{-1} de triptófano durante 24 y 48 h a una temperatura de 30°C. Se tomaron 1 ml del cultivo crecido y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min, luego se tomó 0.5ml del sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 0.5 ml de reactivo Salkowski, dejándose a la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Luego del tiempo transcurrido, 1 ml de la solución mezclada se trasfirió a micro cubetas del espectrofotómetro para medir la absorbancia a 530 nm.

Para verificar la capacidad de las cepas de solubilizar fosfatos inorgánicos, estas se inocularon por estrías en medio de cultivo Pikovskaya modificado, esta técnica

consistió en sembrar cada aislado en el medio referido y observar al cabo de 72 horas a una temperatura de 30°C la presencia o no de un halo traslucido alrededor de la colonia de la bacteria, para esto se dispusieron de cuatro repeticiones por cada aislado o cepa analizada. (Borda *et al.*, 2009).

3.3.3. “Evaluar el efecto de la co-inoculación *Azotobacter - Rhizobium* en el rendimiento de la biomasa en el cultivo de tomate de mesa bajo invernadero”

Para determinar el efecto de la co-inoculación *Azotobacter- Rhizobium*, se diseñó un experimento en condiciones controladas totalmente aleatorizado con 10 réplicas por cada tratamiento. Se monitoreó la temperatura, humedad relativa, riego, incidencia de plagas y enfermedades y el sustrato aplicar. Las macetas contuvieron 2 kg de sustrato (2:1:1 tierra, arena y turba respectivamente), el cual se esterilizó en estufa a 125°C previo a la siembra de las plántulas co-inoculadas (*Azotobacter vinelandii* CA6 + *Rhizobium* sp.) e inoculadas (*Azotobacter vinelandii* y *Rhizobium* sp.). Los tratamientos evaluados fueron la resultante de los aislados identificados morfológica, fisiológica y genéticamente por cada una de las zonas de muestreos, así como un tratamiento con fertilización nitrogenada y un control sin fertilización nitrogenada y sin inoculación (Tabla 1).

Tabla 2. Tratamientos utilizados

Descripción de los Tratamientos
T1 (Col 18 <i>Azotobacter vinelandii</i> CA6 + T8 <i>Rhizobium</i> sp.)
T2 (Col 18 <i>Azotobacter vinelandii</i> CA6)
T3 (T8 <i>Rhizobium</i> sp.)
T4 (Control)
T5 (Fertilizante)

Para la preparación del pre-inóculo se dispuso en tubos 10 ml del medio específico a utilizar por cada aislado identificado y se ajustó el pH a 7 añadiendo

HCl. Los tubos se incubaron a 30°C durante 24 h en incubadora giratoria para contar con títulos mínimos de 10^8 UFC ml⁻¹. Al cabo del tiempo establecido se inoculó el cultivo de cada cepa en 500 ml para obtenerse el inóculo final, el cual se incubó a 30°C durante 48 h en incubadora giratoria a 250 rpm., Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias se realizó el conteo de las células viables en cada uno de los aislados. Todas las cepas contaron con títulos superiores a 10^8 UFC ml Para la realización de la inoculación y co-inoculación en las plántulas directamente. Este último paso se realizó aplicando 3 ml del cultivo de cada uno de los aislados en las 10 réplicas en el momento de la siembra. A partir de los 7 días de la siembra se evaluó la altura (cm) y el número de hojas de las plantas. Estas evaluaciones se continuaron a los 15, 21, 30, 60 y 75 días. A los 60 y 75 días después de la siembra (DDS) se evaluaron el número de flores y frutos y a los 75 DDS los parámetros de biomasa del cultivo. Para los análisis descritos anteriormente se dispuso de 10 muestras por cada tratamiento.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento en condiciones controladas se desarrolló utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 5 tratamientos y 10 réplicas por cada uno de los tratamientos.

3.4.1. Modelo Matemático

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental

μ = Efecto de la media general

t_i = Efecto del i-esimo tratamiento

ϵ_{ij} = Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

3.4.2. Esquema del ensayo

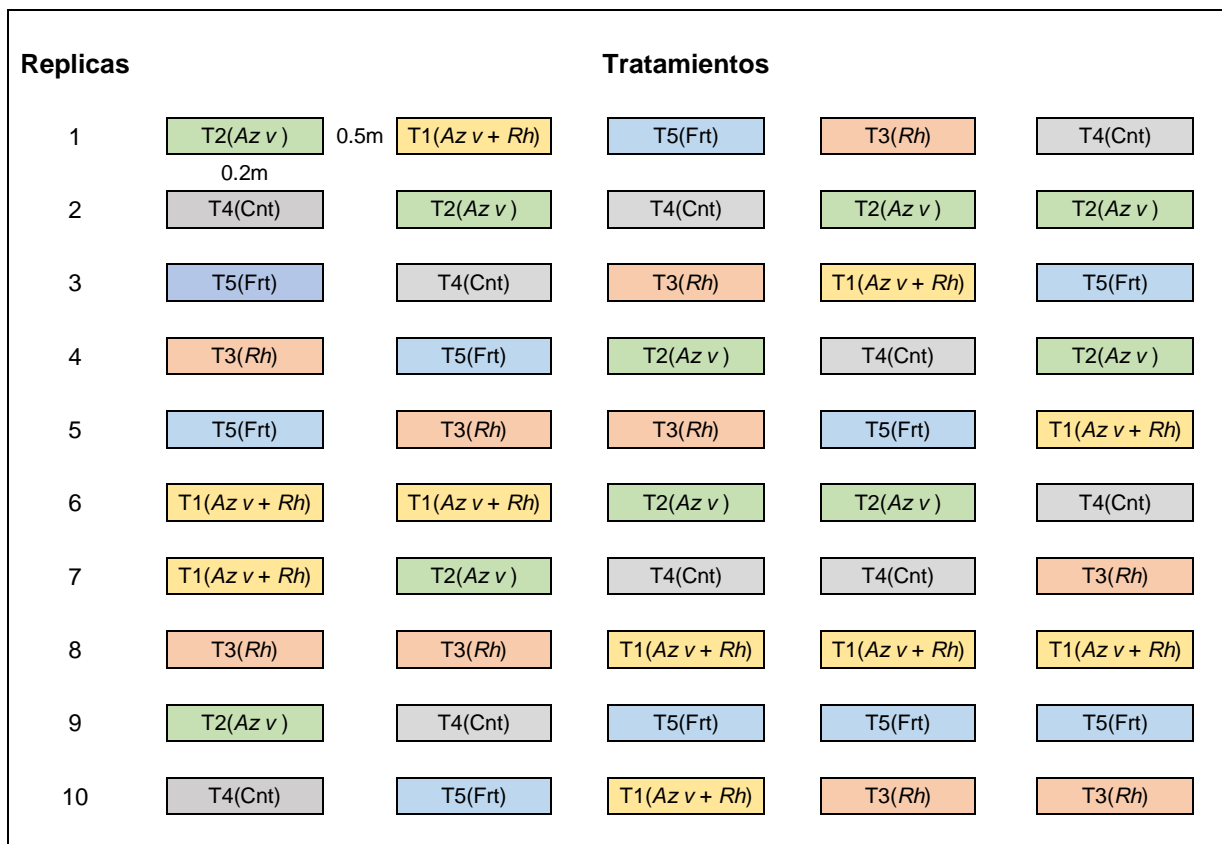


Figura 1. Croquis del diseño experimental de la Investigación.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se procesaron utilizándose el paquete STATGRAPHIC® Plus ver. 5.0. Previamente se realizaron análisis de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas para posteriormente determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, mediante un análisis de varianza simple, utilizándose la prueba de Tukey HSD.

Este programa STATGRAPHIC® permite realizar análisis de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas, en este caso los datos se ajustaron a estas, lo que permitió hacer análisis con pruebas paramétricas mediante el análisis de varianza simple utilizándose la prueba de Tukey de comparación.

3.5.1. Hipótesis estadística

HO: La co-inoculación *Azotobacter-Rhizobium* no influye en el incremento de la biomasa en ninguno de los tratamientos para el cultivo de tomate.

H1: La co-inoculación *Azotobacter-Rhizobium* incrementa la biomasa en al menos uno de los tratamientos para el cultivo de tomate.

4. RESULTADOS

4.1. “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Azotobacter*, DE LOS CANTONES SOSORANGA Y CARIAMANGA”

4.1.1. Caracterización morfológica de los aislados

Se obtuvieron 20 aislados de los cuales 14 corresponden a las características morfológicas del género *Azotobacter*. En la tabla 3 se muestran las zonas muestreadas y las diferencias morfológicas de cada uno de estos. De un total de 14 aislados 28 % (4) presentaron una morfología de coco bacilos, el 58 % (8) bacilos cortos y el 14 % (2) bacilos largos. En todos los aislados se observaron bacterias Gram negativas y presencia de capsula a excepción de Cruz 11, coloraciones blanco opaco, translucido y transparente, así como el crecimiento de ligero a moderado, con una mucosidad ligera. Todas las colonias crecieron con elevación plana a excepción de Cruz 3, mientras que el 100 % de los aislados presentaron bordes lisos.

Tabla 3. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas

Localidad	PARÁMETROS MORFOLÓGICOS							
	Crec ^a	Color ^b	Mucus ^c	Bordes ^d	Elevac ^e	Gram ^f	Forma ^g	Cápsula ^h
Col 3	+	2	+	1	+	-	CB	+
Col 6	+	2	+	1	+	-	BC	+
Col 8	+	2	+	1	+	-	BC	+
Col 11	++	2	+	1	+	-	CB	+
Col 16	+	1	+	1	+	+	BL	+
Col 18	+	2	+	1	+	-	BL	+
Cruz 3	++	4	++	1	++	-	BC	+
Cruz 4	+	2	+	1	+	-	BC	+
Cruz 7	+	2	+	1	+	+	CB	+
Cruz 11	+	4	+	1	+	-	BC	-
Cruz 12	+	2	+	1	+	-	BC	+
TN 1	+	2	+	1	+	-	BC	+
TN 2	++	2	+	1	+	-	BC	+
TN 11	+	2	+	1	+	-	CB	+

a: Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante; b: Color: (1) trasparente, (2) traslucido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema; c: Mucosidad: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d: Bordes: (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado; e: Elevación: (+) plana, (++) elevado f: Gram: (-) negativo, positivo (+); g: Forma: BC (bacilo corto), BL (bacilo largo), CB (coco-bacilo); h: Cápsula: positiva (+), negativa (-); Abreviaturas de las localidades de aislamientos: Colaisaca (Col 3, Col 6, Col 8, Col 11, Col 16, Col 18); La Cruz (Cruz 3, Cruz 4, Cruz 7, Cruz11, Cruz 12) Tambo Negro (TN 1, TN 2, TN 11).

4.1.2. Identificación genética de los aislados

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación de los aislados. De un total de 14 secuencias analizadas se identificaron 6 géneros bacterianos, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Azotobacter*, *Comamonas*, *Ralstonia* y *Rhizobium*. Del total de secuencias analizadas se identificaron tres especies diferentes para el género *Sphingomonas*, dos especies para *Ralstonia* y una especie para cada uno de los géneros identificados, se destaca *Azotobacter vinelandii* como el organismo más diverso en los sitios de colecta.

Tabla 4. . Identificación genética de los aislados basado en las secuenciación de los genes 16S ADNr

Código	Sitio de muestreo	Cantón	Organismo	Identidad de secuencia (%)	Accesión
Col3	Colaisaca	Calvas	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CV67Nov	98	KJ482858.1
Col6	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas melonis</i>	98	AB334774.1
Col8	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas melonis</i>	98	AB334774.1
Col11	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas hankookensis</i>	99	NR_116570.1
Col16	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas panni</i> st. C52	97	NR_042193.1
Col18	Colaisaca	Calvas	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz3	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz4	La Cruz	Sosoranga	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	99	NR_121736.1
Cruz7	La Cruz	Sosoranga	<i>Comamonas testosteroni</i> TK102	98	CP006704.1
Cruz11	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz12	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
TN1	Tambo Negro	Macará	<i>Ralstonia</i> sp. 1F2	99	AY509958.1
TN2	Tambo Negro	Macará	<i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	98	HG518323.1
TN11	Tambo Negro	Macará	<i>Ralstonia insidiosa</i> st. JN190	99	KF150429.1

4.2. “CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AUXINAS Y SOLUBILIZACIÓN DE FOSFORO DE LOS AISLADOS OBTENIDOS”

4.2.1. Producción de auxinas

A las 24 horas, con un valor significativo al resto de aislados, la cepa (Col 18- *Azotobacter vinelandii* CA6) con 2,515 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA, a pesar que no difiere estadísticamente con el resto de aislados, es la que mayor cantidad de AIA produce. Por su parte los aislados (Col 6- *Sphingomonas melonis*) con 1.358 $\mu\text{g ml}^{-1}$, (Cruz 3- *Azotobacter vinelandii* CA6) con 1.868 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y (Cruz 11- *Azotobacter vinelandii* CA6) con 0.272 $\mu\text{g ml}^{-1}$ presentaron los resultados más bajos.

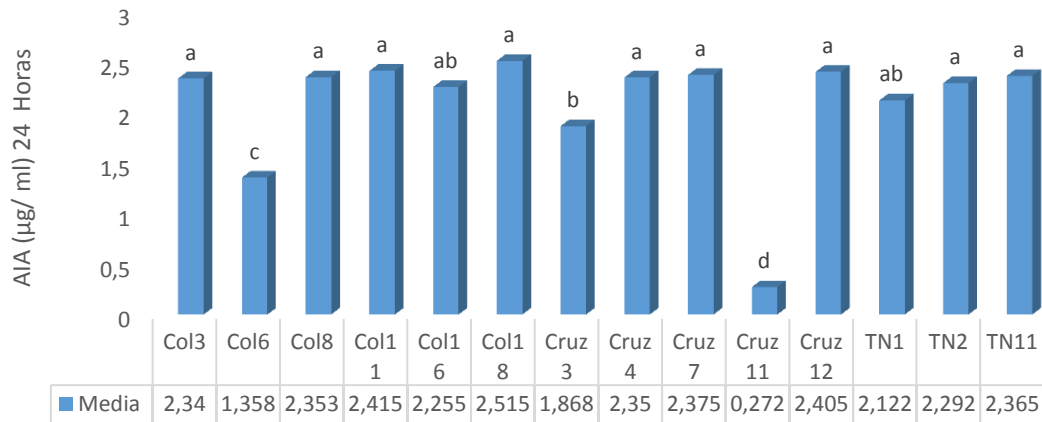


Figura 2. Producción de auxinas (AIA), a las 24 horas. Col3, Col 6, Col 8, Col 11, Col 16, Col 18, Cruz 3, Cruz 4, Cruz 7, Cruz 11, Cruz 12, TN1, TN 2, TN 11.

A las 48 horas vuelve a relucir la cepa (Col 18-*Azotobacter vinelandii* CA6) con 3 ug ml⁻¹ de AIA producido, seguida de (TN11- *Ralstonia insidiosa* st. JN190) con 2.992 ug ml⁻¹. Mientras los aislados de (Col 6- *Sphingomonas melonis*) con 2.609 ug ml⁻¹, (Cruz 3- *Azotobacter vinelandii* CA6) con 2.429 ug ml⁻¹ y (Cruz 11- *Azotobacter vinelandii* CA6) con 0.715 ug ml⁻¹ presentaron los resultados más bajos.

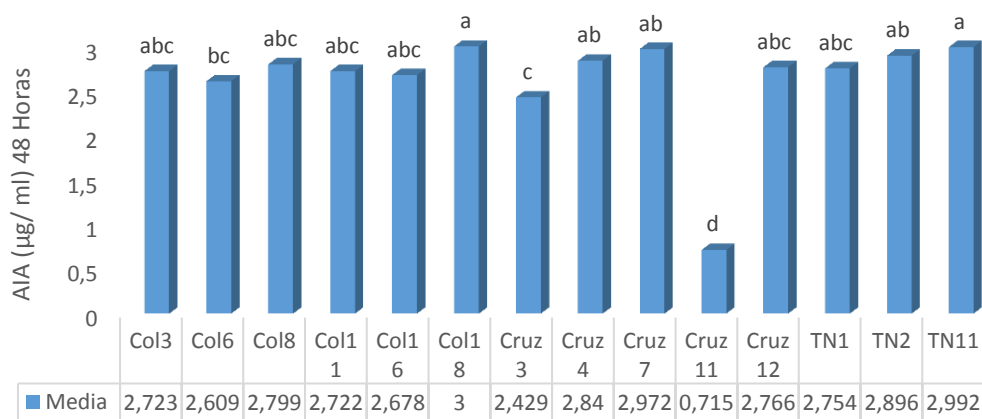


Figura 3. Producción de auxinas (AIA), a las 48 horas: Col3, Col 6, Col 8, Col 11, Col 16, Col 18, Cruz 3, Cruz 4, Cruz 7, Cruz 11, Cruz 12, TN1, TN 2, TN 11 .

4.2.2. Solubilización de fosforo

De los resultados obtenidos (Tabla 5), se evidencia que ninguno de los aislados bacterianos solubilizaron fosforo inorgánico en medio de cultivo Pikovskaya.

Tabla 5. Análisis de solubilización de fosforo por cada uno de los aislados

Código de muestreo	Organismo	Solubilización de fosforo (P)
Col 3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CV67Nov	-
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	-
Col 8	<i>Sphingomonas melonis</i>	-
Col 11	<i>Sphingomonas hankookensis</i>	-
Col 16	<i>Sphingomonas panni</i> st. C52	-
Col 18	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 3	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 4	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	-
La cruz 7	<i>Comamonas testosteroni</i> TK102	-
La cruz 11	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 12	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
TN 1	<i>Ralstonia</i> sp. 1F2	-
TN 2	<i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	-
TN 11	<i>Ralstonia insidiososa</i> st. JN190	-

4.3. “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CO-INOCULACION *Azotobacter* - *Rhizobium* EN EL RENDIMIENTO DE LA BIOMASA EN EL CULTIVO DE TOMATE DE MESA BAJO INVERNADERO”

4.3.1. Influencia de la inoculación de los aislados sobre altura y número de hojas.

En la tabla 6, se muestra los resultados correspondientes a la altura (cm) y número de hojas. En cuanto a altura, a los 7, 15 y 30 DDS, hubo crecimiento homogéneo en el cultivo de tomate por lo que no existen diferencias significativas entre los tratamientos analizados. A los 60 DDS el tratamiento (T3-*Rhizobium* sp.) presenta los mejores resultados con 0,959 cm, el cual difiere significativamente con los demás tratamientos. A los 75 días los tratamientos T2 (*Azotobacter vinelandii*) con 1.175 cm y T3 (*Rhizobium* sp.) con 1.275 cm proyectaron los

mejores resultados, siendo T3 (*Rhizobium* sp.) el mejor, contrario a esto los resultados más bajos los presentó T4 (Control) con 1.106 cm.

Tabla 6. Altura y número de hojas del cultivo de tomate a los 7, 15, 30, 60 y 75 DDS

Tratamiento	7 DDS		15 DDS		30 DDS		60 DDS		75 DDS	
	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas
T1 (<i>Azotobacter vinelandii</i> + <i>Rhizobium</i> sp.)	0,157 ^a	3,9 ^a	0,284 ^a	6,1 ^{ab}	0,437 ^a	7,6 ^a	0,869 ^a	9,6 ^{bc}	1,119 ^b	14,2 ^{ab}
T2 (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	0,158 ^a	4,0 ^a	0,297 ^a	6,4 ^a	0,449 ^a	8,6 ^a	0,883 ^b	11,0 ^{ab}	1,175 ^{ab}	15,7 ^{ab}
T3 (<i>Rhizobium</i> sp.)	0,162 ^a	3,9 ^a	0,284 ^a	6,3 ^{ab}	0,43 ^a	8,3 ^a	0,959 ^a	12,1 ^a	1,275 ^a	16,1 ^a
T4 (Control)	0,173 ^a	4,0 ^a	0,299 ^a	5,9 ^{ab}	0,421 ^a	8,4 ^a	0,809 ^c	9,0 ^c	1,106 ^b	13,1 ^b
T5 (Fertilización)	0,157 ^a	3,6 ^a	0,296 ^a	5,6 ^b	0,412 ^a	7,9 ^a	0,875 ^b	10,4 ^{bc}	1,13 ^b	15,0 ^{ab}
Error Estándar	0,005	0,134	0,011	0,192	0,021	0,259	0,013	0,415	0,028	0,707

Leyenda: Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp.) T4- Control y T5-Fertilización. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

En cuanto al número de hojas, a los 7 días no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. A los 15 días el tratamiento T2 (*Azotobacter vinelandii*) con 6.4 hojas se destaca como el mejor y difiere significativamente con el T5 (Fertilización) con 5.6 hojas y no así con los demás tratamientos. A los 30 días el número de hojas en todos los tratamientos es homogéneo por tanto no presentan diferencias significativas entre estos. A los 60 y 75 días los mejores resultados se obtienen con el T3 (*Rhizobium* sp.) con 12.1 y 16.1 hojas respectivamente, no así el T4 (Control) que a los 60 días con 9 hojas y a los 75 días con 13.1 hojas, presentaron los resultados más bajos.

4.3.2. Influencia de la inoculación de los aislados sobre floración y número de frutos

Los resultados correspondientes a número de flores y frutos, a los 60 y 75 DDS no se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. La co-inoculación, inoculación, control y fertilización no ejercen un efecto marcado para estas variables evaluadas.

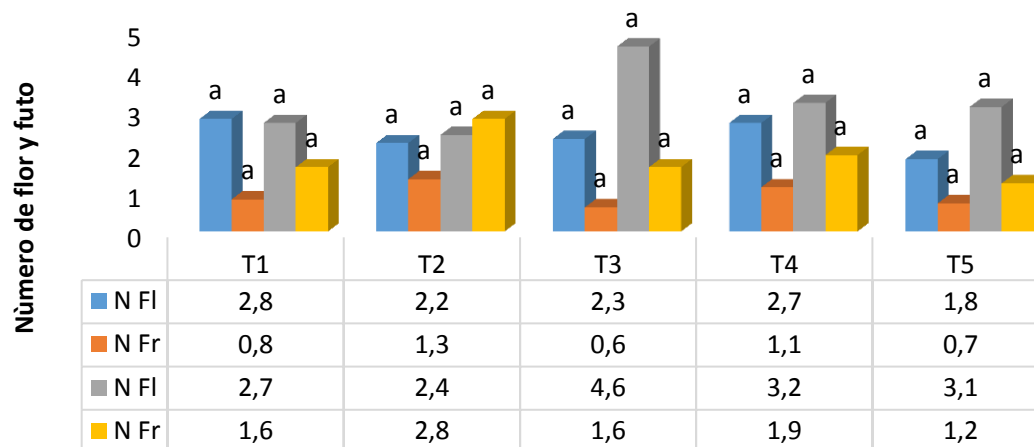


Figura 4. Número de flores y frutos del cultivo a los 60 y 75 DDS. Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp.) T4- Control y T5- Fertilización.

4.3.3. Determinación de la Biomasa

En la Figura 4, se muestra los resultados correspondientes al peso fresco de la raíz, follaje y frutos. En cuanto al peso fresco de la raíz (PFR) con 19.753 g y peso fresco del follaje (PFF) con 113.146 g, el tratamiento T3 (*Rhizobium* sp.), presentó los mejores resultados para ambas variables evaluadas, con una diferencia del 35.12% y 43.97% respectivamente, frente al tratamiento T4 (Control) que presentó el resultado más bajo con 12.814 g para PFR y con 63.393 g para PFF. Para la variable peso fresco del fruto (P Fruto), los datos son homogéneos entre los tratamientos analizados, siendo T2 (*Azotobacter* sp.), con 39.956 g el mejor.

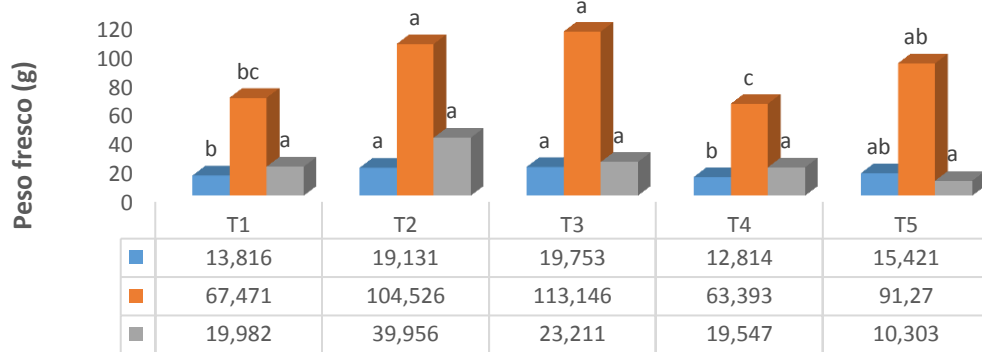


Figura 5. Peso fresco de raíz (PFR), peso fresco del follaje (PFF) y peso fresco del fruto (P Fruto). Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp.) T4 (Control) y T5 (Fertilización).

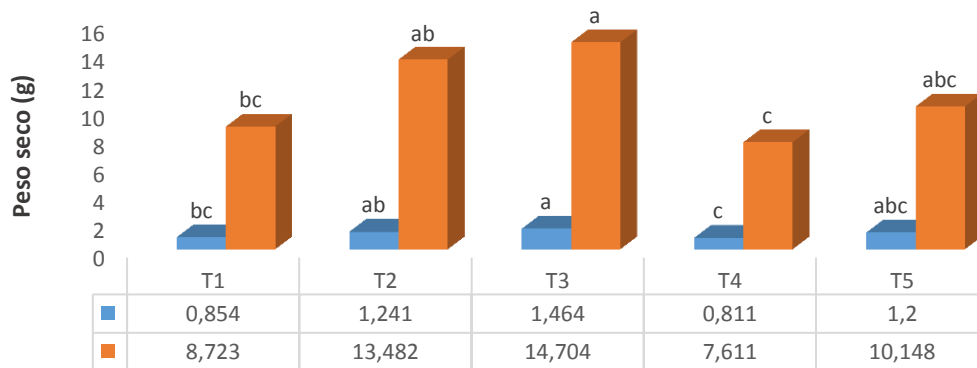


Figura 6. Peso seco de raíz (PSR), y peso seco de follaje (PSF). Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp.) T4 (Control) y T5 (Fertilización).

En la figura 6, se muestran los resultados para peso seco de raíz (PSR) y peso seco del follaje (PSF). Los tratamientos, T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp.) y T5 (Fertilizante) son los que presentan los mejores resultados, siendo el tratamiento T3 (*Rhizobium* sp.) con 1.464 g para PSR y 14.704 g para PSF, el de mejores resultados. Los tratamientos T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) y T4 (Control) presentaron los resultados más bajos, siendo T4 (Control) con 0.811 para PSR y con 7.611 para PSF, el más bajo.

5. DISCUSIÓN

En todos los aislados analizados que corresponden a la caracterización morfológica, se observaron bacterias Gram negativas, bacilos cortos en su mayoría, coloraciones blanco opaco, translucidos y transparentes, crecimiento y mucosidad ligero a moderado, presencia de capsula en todos los aislados, siendo característico de este género (*Azotobacter*). Características similares reportan Saribay (2003), los microorganismos del género *Azotobacter*, comprenden bacterias con forma bacilar, reaccionan a la tinción de Gram como negativos. En medio libre de nitrógeno con glucosa como única fuente de carbono, las células jóvenes de diferentes especies presentan una forma bacilar con extremos redondeados. Las colonias jóvenes de estos microorganismos son generalmente lisas, opacas, convexas y viscosas (Segura y Espín, 1998; Tejera *et al.*, 2005).

De un total de 14 aislados que fueron procesados siguiendo los protocolos del análisis de secuenciación 16S ADNr, se reporta 6 géneros bacterianos (Romero, 2009) señala que las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden dividirse en dos grupos: las de vida libre, como *Azotobacter* y las que fijan nitrógeno a partir del establecimiento de una simbiosis con las plantas leguminosas como *Rhizobium*.

Se destaca *Azotobacter vinelandii* como el organismo más diverso en los sitios de colecta. Los resultados demuestran una estrecha homología de las secuencias obtenidas con aquellas alineadas en la base de datos del inglés: National Center for Biotechnology Information (NCBI), lo cual refuerza la hipótesis de la identificación a nivel de género y especie. Según Stackebrandt y Goebel (1994), dos cepas que muestran homología en sus secuencias del 97,5 % o menos, presentan menos del 60 o 70% de similitud del ADN y por esta razón no pertenecen a la misma especie, en este caso todos los aislados secuenciados tiene una homología por arriba del 98%.

El 78.5 % de los aislados resultaron ser capaces de producir ácido indól acético (AIA), (Col18- *Azotobacter vinelandii*) fue el que produjo la mayor cantidad de AIA con 2,515 ug ml⁻¹ y 3 ug ml⁻¹ a las 24 y 48 horas respectivamente. Contrario a los resultados (Ravikumar *et al.*, 2004) reportaron cepas aisladas de *Azotobacter*

chroococcum con una producción de ácido indól acético elevadas de $18,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, seguido por *A. beijerinckii* con $16,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y *A. vinelandii* $13,8 \mu\text{g ml}^{-1}$. En trabajos similares Torres *et al.*, (2000) reporta el aislamiento de 18 cepas del género *Azotobacter* sp., y en dichos estudios encontraron importantes producciones de hormonas indólicas del tipo ácido indól acético (AIA), incluyendo a *A. vinelandii* con $32,22 \mu\text{g ml}^{-1}$ y *A. chroococcum* con $30,07 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA. De igual manera Gallardo (2008) observaron un aumento lineal en la producción de auxinas hasta el sexto día de crecimiento en cultivos de *A. vinelandii* ATCC12518 empleando un medio con triptona como fuente de triptófano.

En cuanto a la solubilización de fosfatos, los resultados evidencian que ninguna de las cepas aisladas solubilizó fósforo inorgánico a las 72 horas de evaluación. Similares resultados obtienen (Rubio, 2003), donde verificó que ninguna de las cepas produjo halo de solubilización en los medios NBRIP, Pikovskaya y Burk modificado, conteniendo fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. (Mantilla, 2007 y Jiménez, 2007) no observaron los típicos halos de solubilización de fósforo. De igual manera, Borda *et al.*, (2009) cultivaron *Azotobacter* spp., en medio Pikovskaya modificado demostrando la acidificación del medio, pero no los halos de solubilización.

Para la variable altura de las plantas, todos los tratamientos analizados a los 7, 15 y 30 DDS no presentaron diferencias estadísticas significativas. A los 60 días el tratamiento T3 (*Rhizobium* sp.), se destaca como el mejor. A los 75 DDS, los tratamientos T3 (*Rhizobium* sp.), con 1.275 cm y T2 (*Azotobacter*) con 1.175 cm presentan los mejores resultados, contrario a esto el resultado más bajo correspondió al tratamiento T4 (Control) con 1.106 cm. Autores como Santillana *et al.*, (2005) y Paredes (2013) coinciden que el AIA producido por las cepas inoculadas y la fijación de N., son los principales componentes que inducen el crecimiento de las plantas, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos, efectos que se ven reflejados en un mayor contenido de biomasa.

Santillana *et al.*, (2005) reporta que el 37% de las cepas de *Rhizobium* evaluadas estimularon el crecimiento de las plantas de tomate.

En cuanto al número de hojas, a los 7 días los tratamientos fueron homogéneos. A los 15 días con 6.4 hojas y a los 30 días con 8.6 hojas el tratamiento T2 (*Azotobacter* sp.), obtuvo los mayores valores. González (2000), evidenció un aumento del 18% en el número de hojas de las plantas inoculadas con la cepa nativa *Azotobacter* FS-2 respecto al testigo sin inocular con un aumento del 9%. A los 75 DDS el mejor resultado se obtiene con la inoculación de T3 (*Rhizobium* sp.) con 16 hojas, el resultado más bajo lo obtuvo T4 (Control) con 13.1 hojas. Neyra (2013), menciona que *Rhizobium* se caracteriza por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación directa puede incluir la producción de hormonas y fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico.

Respecto al número de flores y frutos a los 60 y 75 días, los tratamientos no difieren estadísticamente uno de otro, no obstante los mejores valores para el número de flores a los 60 días corresponde a T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) con 2.8 flores, el resultado más bajo lo presentó T5 (Fertilización) con 1.8 flores, a los 75 días el mejor resultado corresponde a T3 (*Rhizobium* sp.) con 4.6 flores, el resultado más bajo lo presentó T2 (*Azotobacter vinelandii*.) con 2.4 flores. Con respecto al número de frutos los mejores resultados a los 60 y 75 días se presentan con la inoculación T2 (*Azotobacter vinelandii*.) con 1.3 y 2.8 frutos respectivamente y el resultado más bajo a los 60 días con 0.6 frutos pertenece a T3 (*Rhizobium* sp.) y a los 75 días con 1.2 lo presentó T5 (Fertilización). (Celis y Gallardo, 2008 y Hernández *et al.*, 2015) reportan que cepas de *Rhizobium* y *Azotobacter* tienen la capacidad de producir AIA y otros metabolitos, lo cual pueden favorecer al desarrollo de flores y frutos, evento que pudo estar de manifiesto con la inoculación de T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) y T2 (*Azotobacter vinelandii*), que como se dijo no influyeron significativamente con el resto de tratamientos pero si presentan los valores más altos para las variables antes descritas.

Para el peso fresco de la raíz y del follaje los mejores resultados se obtienen con la inoculación de la cepa T3 (*Rhizobium* sp.) con 19.753 g y con 113.146 g, respectivamente, y el tratamiento T4 (Control) para PFR con 12.814 y para PFF con 63.393 correspondieron a los más bajos, contrario a estos resultados, La Torre, C. y Zúñiga, D. (2009), indican que las cepas de *Azotobacter*, en relación con el crecimiento de las plántulas de tomate, mostraron un incremento significativo respecto al control en altura, área foliar, peso seco radicular y peso fresco y seco de la parte aérea.

Para el peso fresco del fruto el mejor tratamiento corresponde a T2 (*Azotobacter vinelandii*) con 39.956 g y el más bajo corresponde al T5 (Fertilización) con 10.303 g. Dibut (2009) señala que la inoculación de *Azotobacter* en la planta, mejora notablemente el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate, lo cual pudiera estar relacionado con la capacidad de esta bacteria de sintetizar proteínas, las cuales favorecen el incremento del vigor general de las plantas, acelerar los procesos de floración y fructificación. En estudios realizados por Ramakrishnan y Selvakumar (2012) confirman que la aplicación de un biopreparado a base bacterias del género *Azotobacter* mejoró significativamente el crecimiento e incrementó la productividad y la calidad de frutos de tomate. Sin duda estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación. Contrario a esto, Peña y Reyes (2007) reportan que ciertas cepas de *Rhizobium* inoculadas en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) aumentaron su crecimiento debido a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que promueve la producción de frutos (Gravel et al., 2007).

Para peso seco de la raíz (PSR) y peso seco del follaje (PSF) no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos analizados. Con respecto a PSR y PSF los valores más altos corresponden a la inoculación con T3 (*Rhizobium* sp.) con 1.464 g y 14.704 g respectivamente. Resultados similares a los nuestros reporta Santillana *et al.*, (2005), que al inocular *Rhizobium* en tomate de mesa, observó mayores incrementos de la materia seca de la raíz con relación a la materia seca de la parte aérea, incrementos que superaron a la fertilización

química. Martínez (2001) encontró resultados similares, donde evidenció incrementos del 42% de la materia seca de la parte aérea y de 49% de la materia seca de raíz en plantas de maíz inoculadas con *Rhizobium. etli*.

6. CONCLUSIONES

- El 90 % de los aislados bacterianos corresponde con características morfológicas del genero *Azotobacter*, en cuanto a su morfología bacilar y presencia de capsula propia para este género.
- Se identificaron 6 géneros bacterianos, entre ellos *Azotobacter* y *Rhizobium*., determinando una alta diversidad de bacterias rizosféricas en el cultivo de tomate de mesa en los cantones de Sosoranga y Cariamanga.
- Todas las cepas aisladas son capaces de producir AIA, se destaca la cepa aislada de Colaisaca (*Azotobacter vinelandii* CA6) quien produjo la mayor cantidad de AIA a las 24 y 48 horas.
- Ninguna de las cepas aisladas tuvo la capacidad de solubilizar fosforo inorgánico a las 72 horas de evaluación.
- A los 60 y 75 DDS, el tratamiento T3 (*Rhizobium* sp.), influyo positivamente en la altura de la planta y número de hojas.
- A los 60 y 75 DDS, los tratamientos T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp.) y T2 (*Azotobacter vinelandii*) ejercieron favorablemente en el número de flores y por ende en el número de frutos.
- Los parámetros de biomasa se vieron estimulados con la inoculación del T3 (*Rhizobium* sp.) y T2 (*Azotobacter vinelandii*), especialmente en la variables peso seco de la raíz y peso seco del follaje.

7. RECOMENDACIÓN:

- Realizar estudios de co-inoculación con los aislados bacterianos obtenidos a nivel de campo, para corroborar el efecto benéfico que ejercen estos microorganismos en el crecimiento y desarrollo de otros cultivos.

8. BIBLIOGRAFÍA:

1. ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M. Y TERAOKA, T. 2007. Tomato as a model plant for plant- pathogen interaction, *Plant Biotechnology*, Vol 24, pg: 135-147.
2. Azcon R, Barea JM (1975) Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil* 43:609-619
3. BACA, B.; SOTO, L.; PARDO, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. Consultado 13 sep 2012. Disponible en línea: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/294/29403808.pdf>
4. BALANDREAU, J. 1986. Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant and Soil*. Vol 90. Pp 73.
5. Behl RK, Narula N, Vasudeva M, Sato A, Shinano T, Osaki M (2006) Harnessing wheat genotype x *Azotobacter* strain interactions for sustainable wheat production in semi arid tropics. *Tropics* 15(1):121-133
6. BORDA, D.; PARDO, J.; MARTÍNEZ, M.; MONTAÑA, J. 2009. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigrigans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Revista Universitas Scientiarum* 14. Consultado 16 jun 2015. Disponible en línea: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetCaracterizacionDeCepasNativasDeAzotobacter SppYSuEf-3709173%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetCaracterizacionDeCepasNativasDeAzotobacterSppYSuEf-3709173%20(4).pdf)
7. BORDA, D.; MOLINA, D.; PARDO, J.; GARCÍA, M.; MARTÍNEZ, M.; SALGADO, M. Y MONTANA, J.; LARA, J. 2009. Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigrigans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Univ. Sci.* vol.14, n.1 pp. 71-78.
8. BOSTRÖM, KH. 2006. Nitrogen Fixation Among Marine Bacterioplankton. Department of Biology & Environmental Science, University of Kalmar. Sweden, 26 p.
9. CARRANZA, L. 2004. Aislamiento e Identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum biovarphaseoli*, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Consultado 28 ene 2013. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2236.pdf
10. CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hidrolize conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁. In seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol.* 125: 2053-2058.
11. CASTILLO, J.; CASAS, J. Y MARTINEZ, M. 2005. Evaluación de la degradación de endosulfan por *Azotobacter chroococcum* y determinación del efecto plaguicida sobre la

- fijación biológica de nitrógeno y sobre la producción de auxinas. Tesis de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 13, 14.
12. CHIANU, J.; NKONYA, E.; MAIRURA, F.; CHIANU, J.; AKINNIFESI, F. 2011. Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 31:139–154.
 13. CINFA. 2013. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador.
 14. DIBUT, B. 2009. Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. La Habana, Cuba. Editorial Universitaria. Disponible en: <http://revistas.mes.edu.cu>.
 15. DOBEREINER, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry* 29:771-774.
 16. FAO. 2008. “Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*”. Sangolquí. Consultado 4 oct de 2014. Disponible en línea: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2640/1/T-ESPE-030038.pdf>.
 17. FRIONI, L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Primera. Orientación Grafica Editorial, Buenos Aires.
 18. GALLARDO, I. Y CELIS, L. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Gebirelinas) en cultivos microbianos, Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, pp 1-159.
 19. GARCÍA, F.; MUÑOZ, H.; CARREÑO, C.; MENDOZA, G. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Sci. Agropec.* 1:107- 116.
 20. GARZON, S.; LAMPREA, S. Y MARTINEZ, M. 2001. Desarrollo de una preparación líquida de *Azotobacter* utilizando como medio de cultivo los subproductos de la industria sucroquímica. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 25.
 21. GOMEZ, D. 2005. Praticultura. Universidad Pontificia de Valencia. 253 pag.
 22. GONZÁLEZ, M. 2000. Efecto de un inoculante microbiano a partir de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* sobre el rendimiento en secuencias de cultivos hortícolas. UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY INSTITUTO DE SUELOS. Consultado 16 jun 2015.

- Disponible en línea:
<http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/tesis/index/assoc/HASH01ec.dir/doc.pdf>
23. GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39:1968- 1977
 24. HERNÁNDEZ, V. 2004. Caracterización proteómica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Consultado 25 enero 2013. Disponible en: <http://www.um.es/estructura/equipo/vic-estudiantes/arquimedes2003/pdf/004-Virginiamarugan.pdf>
 25. HERNÁNDEZ, I.; NÁPOLES, M. Y MORALES, B. 2015. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. Cuba. Consultado 16 jun 2015. Disponible en línea: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S025859362015000100008&script=sci_arttext
 26. HOLT, J. 2000. Bergey's manual to determinative bacteriology. Novena Edicion. Baltimore. Maryland. Ed Williams & Wilikins. USA. Pp 77,105, 118, 135.
 27. HUSSAIN, A.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, A.; HUSSAIN, F. 1987. Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biol Fertil Soil* 4:73-77. INEC. 2013. Censo Nacional Agropecuario. Consultado 15 sep 2014. Disponible en línea: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/procesador-de-estadisticas-agropecuarias-3/>.
 28. JACKSON, RM.; BROWN, ME.; BURLINGHUM SK. (1964) Similar effects on tomato Plants of *Azotobacter* inoculation and application of gibberellins. *Nature* 203:851-852
 29. JARAMILLO, J.; RODRÍGUEZ, V.; GUZMÁN, M.; ZAPATA, M.; RENGIFO, T. 2007. Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Consultado 17 Sep 2014. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>
 30. JAUHRI, K.; BHATNAGAR, R.; ISWARAN, V. 1979. Associative effect of inoculation of different strains of *Azotobacter* and homologous *Rhizobium* on the yield of moong (*Vigna radiata*), soybean (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum*). *Plant and soil.* 53 (1), pp105-108.
 31. JIMÉNEZ, D. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis Microbiólogo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Consultado 16 jun

2015. Disponible en:
file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetCaracterizacionDeCepasNativasDeAzotobacter
SppYSuEf-3709173%20(4).pdf
32. JOINT GENOME INSTITUTE. 2009. "Taxon Details".
http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=638341010
 33. KANNAIYAN, S.; GOVINDARAJAN, K.; LEWIN, H.; 1980. Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant Soil* 56:487-490.
 34. KHALID, M.; ZAHIR, ZA; WASEEM, A.; ARSHAD, M. (1999) *Azotobacter* and L-tryptophan application for improving wheat yield. *Pak J Biol Sci* 2:739-742
 35. KENNEDY, I.; CHOUDHURY, A.; KECSKÉS, M. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:1229-1244.
 36. KIZILKAYA, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol Eng* 33:150-156.
 37. KUMAR, V.; NARULA, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol Fertil Soils* 28:301-305
 38. LA TORRE, C. Y ZÚÑIGA, D. 2009. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento en la emergencia y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). En: Memorias de la XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXIV RELAR) y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas MicroorganismoPlanta-Ambiente (I IBEMPA) Solubilizadores de fósforo y PGPRs, 2009. ISBN 978-959-16-1030-0. A4-26.
 39. LOREDO, C.; LÓPEZ, L.; ESPINOSA, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2): 225-239.
 40. LLUCH, C.; MARTINEZ, M. Y GONZALEZ, J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*. Vol 27. Pp 223–232. Consultado 12 julio 2014. Disponible en línea: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis14.pdf>.
 41. MALOY, S. (1989) *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*. Jones y Barlett Publishers Boston. Department of Microbiology University of Illinois. Disponible en:

- http://books.google.com.mx/books?id=uqXAVLuyQhYCyprintsec=frontcoverydq=Experimental+Techniques+in+Bacterial+Geneticsylr=lang_en
42. MADIGAN, M. 2009. Biología de los microorganismos de Brock. 9 ed. Prentice - Hall. Makarenko, A.A., Arinbasarova, A., Kuvichkina, T.N., Balashov, S.V., Reshetilov, A.N. (2005). Degradation of p-toluenesulfonate by immobilized *Comamonas testosteroni* BS1310 (pBS1010) cells. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologii*, 41(5), 521-4.
 43. MANAHAN, S. 2007. Introducción a la Química Ambiental. Editorial Puente UNAM 2007. Impreso en España. 603 pag. Consultado 26 mar 2013. Disponible en línea: <http://books.google.com.ec/>
 44. MANTILLA, M. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoko ono) en periodo de enraizamiento. Tesis Microbiólogo Agrícola. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Consultado 16 jun 2015. Disponible en línea: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetCaracterizacionDeCepasNativasDeAzotobacterSppYSuEf-3709173%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetCaracterizacionDeCepasNativasDeAzotobacterSppYSuEf-3709173%20(4).pdf)
 45. MARTINEZ, M.; TOLEDO, V.; MORENO, J.; DE LA RUBIA, T.; GONZÁLEZ, J. 1988. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil* 110:149-152.
 46. MARTINEZ, E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*. 91: 117-126.
 47. MOKHTAR, D.; HOUSHANG, K.; ABDOLAMIR, M.; HABIB, N., MOKHTAR, H. AND ROUHOLLAH, R. 2011. Co-Inoculation of *Rhizobium* and *Azotobacter* on Growth Indices of Faba Bean under Water Stress in the Green House Condition. Department of soil Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University, Khouzestan, Iran mokhtar336@yahoo.com
 48. NADAL, S.; MORENO, M.; CUBERO, J. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Consejo de Agricultura y Pesca. Ed Mundi-Prensa. 313 pg.
 49. NARULA, N.; REMUS, R.; DEUBEL, A.; GRANSE, A.; DUDEJA, S.; BEHL, R., MERBACH, W. 2007. Comparison of the effectiveness of wheat roots colonization by *Azotobacter chroococcum* and *Pantoea agglomerans* using serological techniques. *Plant Soil Environ* 53:167-176
 50. NEYRA, S. 2013. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *longum*. Consultado 12 jul 2014. Disponible en línea en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/176-333-1-PB.pdf>.

51. NUEZ, F. 2001. El cultivo del tomate, *Ed. Mundiprensa*, 1ra ed. Reimpresa, Madrid, España, pg: 32, 35, 36.
52. OBANDO, D. 2012. "RESPUESTA fisiológica del frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* Y *Rhizobium* en suelos del departamento del cesar". Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7266/1/07790779.2012.pdf>
53. OLIVEIRA, J. *et al.* 2006. Análisis de Suelos y Plantas y Recomendaciones de Abonado. Universidad de Oviedo. 147 pág.
54. PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biol Biochem* 30: 379-384.
55. PAREDES, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>
56. PEDRAZA, R.; TEIXEIRA, R. *et al.* 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Consultado 12 jul 2014. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/Microorganismos.pdf>.
57. PEÑA, H.; REYES, I.; 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 32:560- 565
58. PERETÓ, J. *et al.* 2007. Fundamentos Bioquímicos. 369 pág.
59. RAMAKRISHNAN, K.; SELVAKUMAR, G. 2012. Effect of biofertilizers on enhancement of growth and yield on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Research in Botany*, 2(4):20-23.
60. RANGEL, J.; LUCIO, J.; RODRÍGUEZ, M.; MENDOZA, M.; FERRERA, R.; CERRATO, R.; CASTELLANOS, J.; RAMOS, J.; RAMÍREZ, R.; GAMA, R.; ALVARADO, E., BÁRCENAS, E. 2011. Afinidad y efecto de *Azospirillum sp.*, en maíz. *Agronomía Mesoamericana* 22(2):269-279. 2011, ISSN: 1021-744.
61. RAVIKUMAR, S.; KATHIRESAN, K.; THADEDUS, M.; LGNATIAMMAL, S.; BABU, M.; SHANTHY, S. 2004. Nitrogen-fixing *Azotobacter* from mangrove habitat and their utility as marine biofertilizers. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.*312:5-17.

62. RIVERA, D. 2012. Formulación de un prototipo de Biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Consultado 4 may 2013. Disponible en línea: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7026/1/01192544.2012.pdf>
63. RODELAS, B.; SALMERÓN, V.; MARTÍNEZ – TOLEDO, M.V.; POZO, C. Y GONZÁLEZ – LÓPEZ, J. 1999. Interacción *Rhizobium/Azospirillum* y *Rhizobium/Azotobacter*. Efecto sobre el crecimiento, nodulación y fijación simbiótica de N₂ en Vicia faba (L.). Grupo de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología (Facultad de Farmacia) e Instituto del Agua, Universidad de Granada. 18071 Granada, España. Abstract Volume 29 Issue 2 pp 165 – 169.
64. RODRÍGUEZ, A.; ROJAS, M.; TRUJILLO, I.; MANZANO, J.; HEYDRICH, M. 2003. Caracterización de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. En: Memorias. V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos FITOGEN 2003. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba. Consultado 23 jun 2015. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7266/1/07790779.2012.pdf>
65. ROMERO, P. 2006. Estudio de parámetros para la cosecha de tomate. *Facultad de ciencias de la ingeniería, universidad tecnologica equinoccial* Consultado 12 jul 2014. Disponible en línea: Http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/10971/1/27927_1.pdf.
66. RUBIO, E. 2003. Caracterización molecular y funcional de bacterias del género *Azotobacter* aisladas de suelos de la República Argentina. El rol de las auxinas en la respuesta a la inoculación de trigo. Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires Consultado 16 jun 2015. Disponible en línea: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2011rubioestebanjulian.pdf>
67. SANTANA, M.; VASQUEZ, C.; MARTINEZ, M. Y FRANCO, M. 2002. Evaluación de cepas de *Azotobacter* spp. y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Regal Suerte). Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp 24
68. SANTILLANA, N.; ARELLANO, C.; ZÚÑIGA, D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). Ecol. Aplic. 4:47-51.
69. SARIBAY, G. 2003. Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter chroococcum* nitrogen-free and own containing medium. Tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas.

- Departamento de ingeniería de alimentos. The Middle East Technical University. Turkia. Pp 1-45.
70. SEGURA, D.; SPÍN, G. 1998. Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli* ptsP Affects Poly-(R)-Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 180(18):4790-4798.
 71. SILVA, C.; VINUEZA, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: *El caso de los Rhizobios*. Consultado 28 ene 2013. Disponible en línea: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap11.pdf>
 72. STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846–849 p.
 73. SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. 2005. “Principles and Applications of Soil Microbiology”. Segunda Edición, Editorial Pearson Prentice Hall, USA, pp 373-389.
 74. TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil.*, 270: 223-232.
 75. TORRES-GUTIÉRREZ R. 2008. Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. *Dissertationes de Agricultura*. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven. 21, 155 p.
 76. TORRES, M.; VALENCIA, S.; BERNAL, J.; MARTINEZ, P. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3- Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol 42. Pp 171-176.
 77. ZAMBRE, M.; KONDE, B.; SONAR, K. 1984. Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. *Plant Soil* 79:61-67.
 78. ZÚÑIGA, O. 2009. Crecimiento de *Bacillus pumilus* Productor de la Auxina Ácido Indolacético, Como Base para Formular un Biofertilizante en Polvo. Valdivia – Chile 2009 Consultado 19 abr 2015. Disponible en línea: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/faz.95c/doc/faz.95c.pdf>

9. Anexos.

Anexo 1. Prueba de Tukey para AIA a las 24 y 48 horas.

Cepas aisladas	AIA	
	24 h	48 h
Col3	2,34 ^a	2,72333 ^{abc}
Col6	1,35767 ^c	2,60933 ^{bc}
Col8	2,353 ^a	2,79933 ^{abc}
Col11	2,415 ^a	2,72233 ^{abc}
Col16	2,25533 ^{ab}	2,67833 ^{abc}
Col18	2,515 ^a	3 ^a
Cruz3	1,86833 ^b	2,4286 ^c
Cruz4	2,34967 ^a	2,83967 ^{ab}
Cruz7	2,37533 ^a	2,97167 ^{ab}
Cruz11	0,272333 ^d	0,714667 ^d
Cruz12	2,405 ^a	2,76567 ^{abc}
TN1	2,12233 ^{ab}	2,754 ^{abc}
TN2	2,29233 ^a	2,896 ^{ab}
TN11	2,365 ^a	2,99233 ^a
Error estándar	0,078746	0,072867

Anexo 2. Parámetros morfológicos, altura y número de hojas en diferentes etapas de crecimiento del cultivo.

Tratamiento	Repetición	7 DDS		15 DDS		21 DDS		30 DDS		60 DDS				75 DDS			
		Altura	N Hoja	Altura	N Hoja	Altura	N Hoja	Altura	N Hoja	Altura	N Hoja	N Flor	N Fruto	Altura	N Hoja	N Flor	N Fruto
1	1.1	0,16	4	0,3	7	0,43	8	0,56	9	0,93	10	5	3	1,25	14	4	4
1	1.2	0,17	4	0,35	6	0,46	8	0,56	8	0,98	12	7	1	1,19	15	11	2
1	1.3	0,17	4	0,3	6	0,38	6	0,45	7	0,88	11	2	0	1,11	14	1	1
1	1.4	0,17	4	0,27	5	0,35	7	0,42	7	0,87	9	4	0	1,15	12	4	0
1	1.5	0,14	3	0,25	6	0,34	7	0,43	8	0,86	9	0	0	1,1	11	3	0
1	1.6	0,13	4	0,2	6	0,29	6	0,3	7	0,85	10	1	0	1,05	12	0	1
1	1.7	0,15	4	0,28	6	0,34	6	0,4	8	0,82	10	2	2	0,92	15	2	2
1	1.8	0,15	3	0,22	6	0,33	5	0,35	6	0,88	8	3	0	1,16	16	1	2
1	1.9	0,17	4	0,33	6	0,36	6	0,44	7	0,82	8	2	1	1,2	15	0	3
1	1.10	0,16	5	0,34	7	0,4	7	0,46	9	0,8	9	2	1	1,06	18	1	1
2	2.1	0,16	4	0,34	7	0,47	8	0,58	10	0,92	13	3	2	1,34	17	5	4
2	2.2	0,17	4	0,31	6	0,42	7	0,53	8	0,9	10	4	2	1,3	13	6	6
2	2.3	0,16	4	0,34	7	0,45	8	0,57	9	0,85	12	6	3	1,15	19	8	6
2	2.4	0,19	4	0,32	7	0,4	7	0,45	9	0,86	10	2	0	1,12	12	0	2
2	2.5	0,14	4	0,26	6	0,31	7	0,39	8	0,88	10	0	0	1,1	12	0	0
2	2.6	0,14	4	0,26	6	0,32	7	0,37	9	0,86	12	3	1	1,15	14	0	3
2	2.7	0,15	4	0,26	6	0,32	6	0,39	7	0,87	11	3	1	1,16	13	4	3
2	2.8	0,14	4	0,26	6	0,33	7	0,38	8	0,85	10	0	2	1,14	22	0	2
2	2.9	0,15	4	0,29	6	0,34	7	0,39	9	0,95	11	0	2	1,25	17	0	2
2	2.10	0,18	4	0,33	7	0,35	7	0,44	9	0,89	11	1	0	1,04	18	1	0
3	3.1	0,15	3	0,27	6	0,35	6	0,41	8	0,92	12	0	0	1,25	15	0	0
3	3.2	0,19	4	0,33	7	0,39	7	0,45	8	1	13	5	1	1,3	16	5	1
3	3.3	0,15	4	0,29	6	0,35	8	0,47	9	1,05	14	0	1	1,35	19	14	3
3	3.4	0,18	4	0,3	7	0,4	7	0,45	9	1,07	12	7	1	1,31	16	16	4
3	3.5	0,16	4	0,25	6	0,34	7	0,41	9	0,95	12	2	1	1,26	17	3	2
3	3.6	0,19	4	0,3	7	0,37	6	0,43	8	0,92	12	2	1	1,35	16	4	3

Continuación del anexo 2.

3	3.7	0,17	4	0,28	6	0,33	5	0,4	7	0,94	11	2	0	1,28	15	0	2
3	3.8	0,15	4	0,26	6	0,35	6	0,42	8	0,94	14	1	0	1,25	18	0	0
3	3.9	0,13	4	0,29	6	0,36	7	0,42	9	0,9	11	2	1	1,18	15	1	1
3	3.10	0,15	4	0,27	6	0,36	6	0,44	8	0,9	10	2	0	1,22	14	3	0
4	4.1	0,15	4	0,33	6	0,42	6	0,48	9	0,85	8	4	0	1,2	12	7	1
4	4.2	0,18	4	0,32	6	0,44	7	0,54	8	0,83	9	9	2	1,3	13	7	4
4	4.3	0,18	4	0,31	6	0,38	7	0,47	9	0,81	9	3	1	1,2	11	4	4
4	4.4	0,14	3	0,26	6	0,3	5	0,34	7	0,81	7	2	0	1	12	3	0
4	4.5	0,2	4	0,31	4	0,37	6	0,42	9	0,8	8	1	1	1,12	15	1	1
4	4.6	0,19	4	0,3	6	0,36	6	0,42	8	0,79	9	0	3	1,1	13	4	3
4	4.7	0,16	4	0,3	6	0,37	6	0,42	9	0,78	8	1	0	1,01	12	1	0
4	4.8	0,17	4	0,27	6	0,36	6	0,31	8	0,83	8	1	2	1,05	16	1	1
4	4.9	0,2	5	0,3	7	0,36	6	0,42	9	0,81	12	5	1	1,04	13	3	4
4	4.10	0,16	4	0,29	6	0,33	6	0,39	8	0,78	12	1	1	1,04	14	1	1
5	5.1	0,16	3	0,31	6	0,42	7	0,55	8	0,85	9	0	0	0,98	17	1	0
5	5.2	0,14	3	0,25	6	0,34	7	0,4	9	0,88	11	4	0	1,2	14	6	0
5	5.3	0,17	3	0,23	4	0,3	6	0,44	7	0,92	12	5	0	1,25	13	7	4
5	5.4	0,16	4	0,31	6	0,38	6	0,33	8	0,95	11	3	2	1,3	15	6	2
5	5.5	0,16	4	0,34	6	0,37	5	0,4	8	0,83	10	0	0	1,06	13	3	0
5	5.6	0,14	4	0,36	6	0,36	5	0,47	6	0,89	9	0	0	1,07	12	3	0
5	5.7	0,18	4	0,32	6	0,42	7	0,42	8	0,85	9	0	3	1,11	14	0	3
5	5.8	0,16	4	0,32	6	0,39	6	0,32	8	0,85	10	2	0	1,13	18	1	1
5	5.9	0,15	4	0,26	5	0,28	6	0,39	9	0,86	11	0	2	1,15	17	1	2
5	5.10	0,15	3	0,26	5	0,32	6	0,4	8	0,87	12	4	0	1,05	17	3	0

Anexo 3. Parámetros de biomasa del cultivo: peso fresco de raíz (PFR), peso fresco del follaje (PFF), peso del fruto (PFFr), peso seco de raíz (PSR) y peso seco del follaje (PSF).

Tratamiento	Repetición	Peso fresco			Peso seco	
		PFR	PFF	PFFr	PSR	PSF
1	1.1	10,17	58,32	88,06	0,79	7,16
1	1.2	19,6	93,6	71	1,81	19,83
1	1.3	12,38	86,12	5,83	1,24	9,57
1	1.4	15	57,26	0	0,44	2,24
1	1.5	11,5	55,73	0	0,38	6,59
1	1.6	14,6	56,97	5,6	0,66	6,16
1	1.7	14,8	54,1	7,49	0,38	7,09
1	1.8	10,54	59,52	4,68	0,3	7,25
1	1.9	14,26	87,89	5,18	2,05	14,27
1	1.10	15,31	65,2	11,98	0,49	7,07
2	2.1	17,44	98,17	68,29	1,15	10,85
2	2.2	19,6	94,23	104,14	1,34	11,43
2	2.3	19,5	138,23	137,65	1,57	18,26
2	2.4	24,45	134,47	7,8	1,19	22,3
2	2.5	18,93	91,47	0	1,18	17,92
2	2.6	16,34	97,3	7,26	1,36	10,86
2	2.7	18,73	100,23	45,95	1,05	10,83
2	2.8	17,88	96,39	23,55	1	10,2
2	2.9	19,85	90,24	4,92	1	10,36
2	2.10	18,59	104,53	0	1,57	11,81
3	3.1	21,63	100,37	0	1,51	11,33
3	3.2	17,57	102,9	43,94	1,37	17,51
3	3.3	23,44	133,28	70,5	1,89	30,5
3	3.4	21,4	113,73	52,9	1,25	17,86
3	3.5	17,4	141,44	6,88	1,46	11,91
3	3.6	19,49	110,58	36,49	1,34	12,23
3	3.7	17,37	120,18	10,43	1,33	14,47
3	3.8	18,2	101,18	10,97	1,42	8,97
3	3.9	16,77	109	0	1,32	12,32
3	3.10	24,26	98,8	0	1,75	9,94
4	4.1	11,79	67,5	0,59	1,13	10,97
4	4.2	15,93	96,3	38,06	1,04	11,87
4	4.3	13,77	59,28	40,85	0,77	6,88
4	4.4	10,57	67,2	7,7	0,85	6,51
4	4.5	10,62	59,58	8,38	0,83	5,83
4	4.6	9,99	57,5	23,99	0,79	5,58
4	4.7	9,82	62,59	0	0,75	7,85
4	4.8	9,45	70,72	8,12	0,8	7,19
4	4.9	25,2	45,1	67,78	0,69	6,84
4	4.10	11	48,16	0	0,46	6,59
5	5.1	12,25	98,32	0	1,18	12,93
5	5.2	24,64	99,24	0	1,46	12,14
5	5.3	21,86	153,65	11,99	1,35	16,2
5	5.4	15,4	144	75,05	1,38	8,48
5	5.5	13,68	75,85	0	1,1	9,31
5	5.6	12,15	53,66	0	1,05	8,31
5	5.7	13,93	76,11	11,61	1	9,56
5	5.8	12,39	80,51	2,85	1,12	8,16
5	5.9	14,92	55,9	0	1,25	8,07
5	5.10	12,99	75,46	1,53	1,11	8,32

Anexo 4. Prueba de Tukey para altura del cultivo.

Tratamiento	Altura(cm)				
	7 DDS	15 DDS	30 DDS	60 DDS	75 DDS
T1	0,157 ^a	0,284 ^a	0,437 ^a	0,869 ^a	1,119 ^{ab}
T2	0,158 ^a	0,297 ^a	0,449 ^a	0,883 ^b	1,175 ^{ab}
T3	0,162 ^a	0,284 ^a	0,43 ^a	0,959 ^a	1,275 ^a
T4	0,173 ^a	0,299 ^a	0,421 ^a	0,809 ^c	1,106 ^b
T5	0,157 ^a	0,296 ^a	0,412 ^a	0,875 ^b	1,13 ^{ab}
Error estándar	0,00544671	0,0114717	0,0212158	0,0138026	0,0282304

Anexo 5. Prueba de Tukey para número de hojas del cultivo.

Tratamiento	Número de Hojas				
	7 DDS	15 DDS	30 DDS	60 DDS	75 DDS
T1	3,9 ^a	6,1 ^{ab}	7,6 ^a	9,6 ^{bc}	14,2 ^{ab}
T2	4 ^a	6,4 ^a	8,6 ^a	11 ^{ab}	15,7 ^{ab}
T3	3,9 ^a	6,3 ^{ab}	8,3 ^a	12,1 ^a	16,1 ^a
T4	4 ^a	5,9 ^{ab}	8,4 ^a	9 ^c	13,1 ^b
T5	3,6 ^a	5,6 ^b	7,9 ^a	10,4 ^{bc}	15 ^{ab}
Error estándar	0,13499	0,192642	0,259058	0,415532	0,707892

Anexo 6. Prueba de Tukey para número de flores y frutos del cultivo

Tratamiento	Número de	Número de	Número de	Número de
	Flor	Fruto	Flor	Fruto
	60 DDS	60 DDS	75 DDS	75 DDS
T1	2,8 ^a	0,8 ^a	2,7 ^a	1,6 ^a
T2	2,2 ^a	1,3 ^a	2,4 ^a	2,8 ^a
T3	2,3 ^a	0,6 ^a	4,6 ^a	1,6 ^a
T4	2,7 ^a	1,1 ^a	3,2 ^a	1,9 ^a
T5	1,8 ^a	0,7 ^a	3,1 ^a	1,2 ^a
Error estándar	0,697615	0,30948	1,14057	0,509684

Anexo 7. Prueba de Tukey para peso fresco del cultivo.

Tratamiento	Peso fresco		
	PFR	PFF	P Fruto
T1	13,816 ^b	67,471 ^{bc}	19,982 ^a
T2	19,131 ^a	104,526 ^a	39,956 ^a
T3	19,753 ^a	113,146 ^a	23,211 ^a
T4	12,814 ^b	63,393 ^c	19,547 ^a
T5	15,421 ^{ab}	91,27 ^{ab}	10,303 ^a
Error estándar	1,10954	6,46411	10,0944

Anexo 8. Prueba de Tukey para peso seco del cultivo.

Tratamiento	Peso seco	
	PSR	PSF
T1	0,854 ^{bc}	8,723 ^{bc}
T2	1,24 ^{ab}	13,482 ^{ab}
T3	1,464 ^a	14,704 ^a
T4	0,811 ^c	7,611 ^c
T5	1,2 ^{abc}	10,148 ^{abc}
Error estándar	0,104257	1,37285

Anexo 9. Tríptico de día de campo.

Resultados para el segundo objetivo:

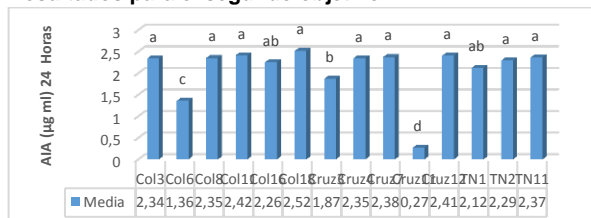


Figura 1. Producción de auxinas (AIA), a las 24 horas

Con un valor significativo al resto de aislados, la cepa (Col 18-*Azotobacter vinelandii* CA6) con (2,515 µg ml⁻¹ de AIA producido) presenta los mejores resultados, a pesar que no difiere estadísticamente con los aislados (Col 3-*Stenotrophomonas* sp. CV67Nov), (Col 6- *Sphingomonas melonis*), (Col 8-*Sphingomonas melonis*), (Col 11- *Sphingomonas hankookensis*), (Cruz 4-*Sphingomonas sanxanigenens*), (Cruz 7- *Comamonas testosteroni* TK102), (Cruz 12- *Azotobacter vinelandii* CA6), (TN2- *Rhizobium* sp. IRBG74) Y (TN11- *Ralstonia insidiosa* st. JN190) es la mejor. Por su parte los aislados (Col 6- *Sphingomonas melonis*), (Cruz 3- *Azotobacter vinelandii* CA6) y (Cruz 11- *Sphingomonas hankookensis*) presentan los resultados más bajos.

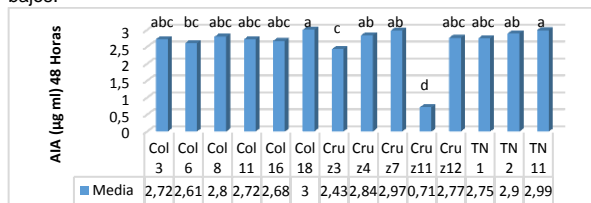


Figura 2. Producción de auxinas (AIA), a las 48 horas.

A las 48 horas vuelve a relucir la cepa (Col 18-*Azotobacter vinelandii* CA6), seguida de (TN11- *Ralstonia insidiosa* st. JN190) y (TN2 - *Rhizobium* sp. IRBG74) con los mejores resultados.

Tabla 3. Análisis de solubilización de fosforo por cada uno de los aislados.

Código	Organismo	Solubilización (P)
Col 3	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CV67Nov	-
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	-
Col 8	<i>Sphingomonas melonis</i>	-
Col 11	<i>Sphingomonas hankookensis</i>	-
Col 16	<i>Sphingomonas panni</i> st. C52	-
Col 18	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 3	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 4	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	-
La cruz 7	<i>Comamonas testosteroni</i> TK102	-
La cruz 11	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
La cruz 12	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	-
TN 1	<i>Ralstonia</i> sp. 1F2	-
TN 2	<i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	-
TN 11	<i>Ralstonia insidiosa</i> st. JN190	-

De los resultados obtenidos (Tabla 3), se evidencia que ninguno de los aislados bacterianos solubilizaron fosforo inorgánico en medio de cultivo Pikovskaya.

Resultados para el tercer objetivo

Tabla 4. Altura y número de hojas a los 7, 15, 30, 60 y 75 DDS

Trat	7 DDS		15 DDS		30 DDS		60 DDS		75 DDS	
	Alt (cm)	Nº H	Alt (cm)	Nº H	Alt (cm)	Nº H	Alt (cm)	Nº H	Alt (cm)	Nº H
T1	0,157 ^a	3,9 ^a	0,284 ^a	6,1 ^{ab}	0,437 ^a	7,6 ^a	0,869 ^a	9,6 ^{bc}	1,119 ^b	14,2 ^{ab}
T2	0,158 ^a	4,0 ^a	0,297 ^a	6,4 ^a	0,449 ^a	8,6 ^a	0,883 ^b	11,0 ^a	1,175 ^{ab}	15,7 ^{ab}
T3	0,162 ^a	3,9 ^a	0,284 ^a	6,3 ^{ab}	0,43 ^a	8,3 ^a	0,959 ^a	12,1 ^a	1,275 ^a	16,1 ^a
T4	0,173 ^a	4,0 ^a	0,299 ^a	5,9 ^{ab}	0,421 ^a	8,4 ^a	0,809 ^c	9,0 ^c	1,106 ^b	13,1 ^b
T5	0,157 ^a	3,6 ^a	0,296 ^a	5,6 ^b	0,412 ^a	7,9 ^a	0,875 ^b	10,4 ^b	1,13 ^b	15,0 ^{ab}
E. Est.	0,005	0,134	0,011	0,192	0,021	0,259	0,013	0,415	0,028	0,707

Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp), T4 (Control) y T5 (Fertilización).

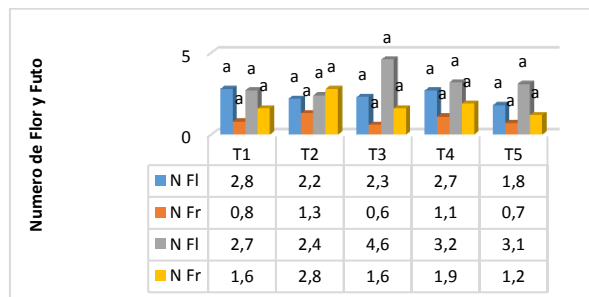


Figura 3. Número de flores y frutos del cultivo a los 60 y 75 DDS.

Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp) T4- Control y T5-Fertilización.

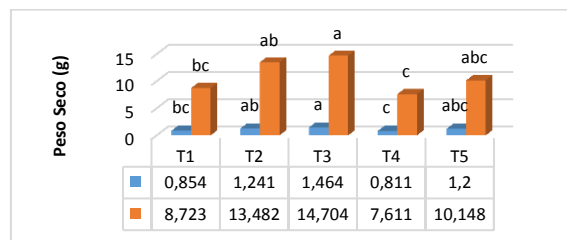


Figura 4. Peso seco de raíz (PSR), y peso seco de follaje (PSF).

Tratamientos: T1 (*Azotobacter vinelandii* + *Rhizobium* sp), T2 (*Azotobacter vinelandii*), T3 (*Rhizobium* sp) T4- Control y T5-Fertilización.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS:

“CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azotobacter* Y SU EFECTO EN CO-INOCULACIÓN CON *Rhizobium* EN TOMATE DE MESA”



AUTORA:

Shirley Tatiana Jara Carreño.

DIRECTOR:

Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

Loja-Ecuador



Continuación de anexo 9.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de gran importancia debido a las propiedades alimenticias y antioxidantes que presenta. El aumento de la productividad es importante para la rentabilidad de este cultivo; siendo necesario la aplicación de nitrógeno para asegurar el rendimiento adecuado (Loredo *et al.*, 2004). Ante esta situación, es necesario contar con tecnologías adecuadas a la realidad de los agricultores, que permitan obtener productos de buena calidad y de esa manera reducir al mínimo el uso de fertilizantes químicos

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), que es llevada a cabo por rizobacterias de vida libre como *Azotobacter* sp., y específica por bacterias del género *Rhizobium* sp., pueden contribuir a mejorar el crecimiento vegetal y la disponibilidad de nitrógeno para este cultivo (Santillana *et al.*, 2005). Es por ello que este trabajo contribuye con información valiosa de identificación de cepas de *Azotobacter* y su influencia positiva con cepas nativas del género *Rhizobium* en la promoción del crecimiento vegetal y fijación de nitrógeno atmosférico para este cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar aislados bacterianos del género *Azotobacter* y su efecto en el incremento de la biomasa y fijación de N en co-inoculación con cepas nativas de *Rhizobium* en el cultivo de tomate de mesa.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica y genéticamente las cepas de bacterias del género *Azotobacter*, de los cantones Sosoranga y Cariamanga.
- Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos.
- Evaluar el efecto de la co-inoculación *Azotobacter- Rhizobium* en el rendimiento de la biomasa y fijación de N en el cultivo de tomate de mesa bajo invernadero.

METODOLOGÍA

Metodología para el primer objetivo

- Caracterización morfológica de los aislados
- Identificación genética de los aislados



La caracterización morfológica de los aislados se llevaron a cabo mediante análisis de los parámetros morfológicos de las colonias aisladas, tales como: crecimiento, color, bordes y elevación (Torres-Gutiérrez, 2008) y respuesta a la tinción al Gram, en medio de cultivo Ashby.

Para la identificación genética, se realizó el aislamiento de los genes de la región 16S ARNr, la cual es una región muy conservada del genoma de los microorganismos.

Metodología para el segundo objetivo

- Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos



Esta determinación se realizó por método colorimétrico usándose el reactivo Salkowski (12 g L de FeCl3 en 7,9 M de H2 SO4) (Glickman y Dessaux, 1995).

Metodología para el tercer objetivo

- Evaluar el efecto de co-inoculación *Azotobacter- Rhizobium* en el cultivo de tomate bajo invernadero



El experimento se realizó utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 5 tratamientos y 10 réplicas bajo invernadero, teniendo en cuenta las mejores cepas de la evaluación de la producción de AIA solamente ya que no solubilizó fosforo.

RESULTADOS

Resultados para el primer objetivo:

Tabla 1. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas

Localidad	PARÁMETROS MORFOLÓGICOS							Cápsula ^h
	Crece ^a	Color ^b	Mucos ^c	Bordes ^d	Elevac ^e	Gram ^f	Morfología ^g	
Col 3	+	2	+	1	+	-	CB	+
Col 6	+	2	+	1	+	-	BC	+
Col 8	+	2	+	1	+	-	BC	+
Col 11	++	2	+	1	+	-	CB	+
Col 16	+	1	+	1	+	+	BL	+
Col 18	+	2	+	1	+	-	BL	+
Cruz 3	++	4	++	1	++	-	BC	+
Cruz 4	+	2	+	1	+	-	BC	+
Cruz 7	+	2	+	1	+	+	CB	+
Cruz 11	+	4	+	1	+	-	BC	-
Cruz 12	+	2	+	1	+	-	BC	+

TN 1	+	2	+	1	+	-	BC	+
TN 2	++	2	+	1	+	-	BC	+
TN 11	+	2	+	1	+	-	CB	+

a: Crecimiento: (+) ligero, (++) moderado; (+++) abundante; b: Color: (1) transparente, (2) traslucido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema; c: Mucosidad: (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; d: Bordes: (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado; e: Elevación: (+) plana, (++) elevado f: Gram: (-) negativo, positivo (+); g: Morfología: BC (bacilo corto), BL (bacilo largo), CB (coco-bacilo); h: Capsula: positiva (+), negativa (-); Abreviaturas de las localidades de aislamientos: Colaisaca (Col 3, Col 6, Col 8, Col 11, Col 16, Col 18); La Cruz (Cruz 3, Cruz 4, Cruz 7, Cruz 11, Cruz 12) Tambo Negro (TN 1, TN 2, TN 11).

Tabla 2. Identificación genética de los aislados.

Código	Sitio	Cantón	Organismo	secuencia (%)	Accesión
Col3	Colaisaca	Calvas	<i>Stenotrophomonas</i> sp. CV67Nov	98	KJ482858.1
Col6	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas melonis</i>	98	AB334774.1
Col8	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas melonis</i>	98	AB334774.1
Col11	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas hankookensis</i>	99	NR_116570.1
Col16	Colaisaca	Calvas	<i>Sphingomonas panni</i> st. C52	97	NR_042193.1
Col18	Colaisaca	Calvas	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz3	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz4	La Cruz	Sosoranga	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	99	NR_121736.1
Cruz7	La Cruz	Sosoranga	<i>Comamonas testosteroni</i> TK102	98	CP006704.1
Cruz11	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
Cruz12	La Cruz	Sosoranga	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6	100	CP005095
TN1	Tambo Negro	Macará	<i>Ralstonia</i> sp. 1F2	99	AY509958.1
TN2	Tambo Negro	Macará	<i>Rhizobium</i> sp. IRBG74	98	HG518323.1
TN11	Tambo Negro	Macará	<i>Ralstonia insidiosa</i> st. JN190	99	KF150429.1

Anexo 10. Evidencias fotográficas

Caracterización morfológica y genética de bacterias del género *Azotobacter*.

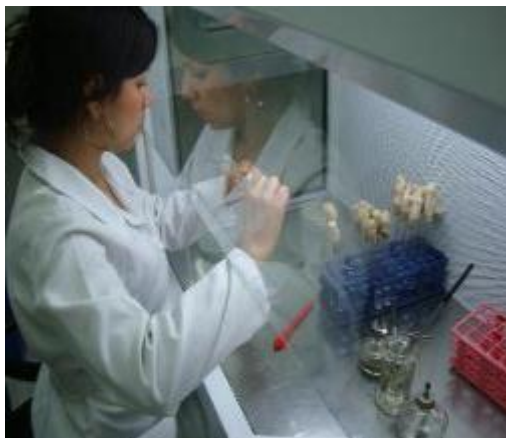


Fig. 1. Siembra en cajas de Petri con agar nutriente de los aislados obtenidos a partir de suelos y raíces. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 3 de noviembre del 2014.



Fig. 2. Caracterización morfológica de los aislados: crecimiento, color, bordes y elevación. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 6 de noviembre del 2014.



Fig. 3. Respuesta a la tinción al Gram, en medio de cultivo Ashby, laboratorio de Biotecnología-Loja, 14 de noviembre del 2014.



Fig. 4. Identificación genética de los aislados. Laboratorio de Biología Molecular-Loja, 20 de noviembre del 2014.

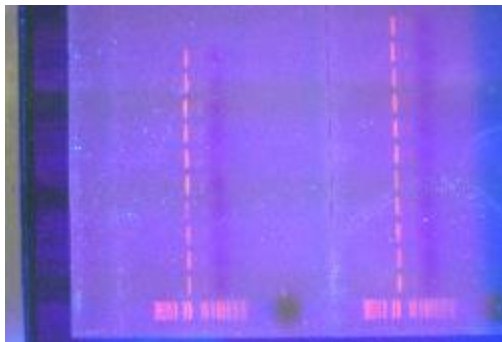


Fig. 5. Secuencias de ciclos térmicos para la amplificación de la región 16S ARNr. Laboratorio de Biología Molecular-Loja, 20 de noviembre del 2014.

Cuantificación de la producción de auxinas y solubilización de fosforo de los aislados obtenidos



Fig. 6. Inoculación de cada una de las cepas aisladas en medio Ashby líquido suplementado con $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de triptófano. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 5 de diciembre del 2014.



Fig. 7. Traslado del medio de cultivo crecido a tubos eppendorf y centrifugación a 10000 rpm. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 11 de diciembre del 2014.



Fig. 8. Traslado del sobrenadante a un nuevo tubo añadido con reactivo Salkowski. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 11 de diciembre del 2014.

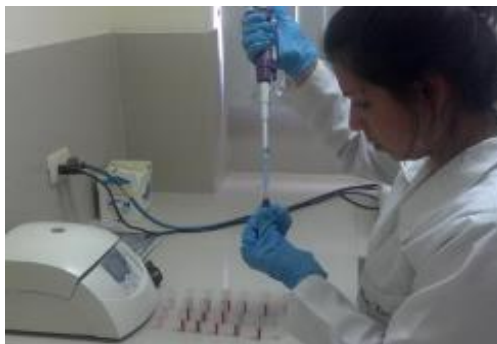


Fig. 9. Traslado de la solución mezclada con reactivo Salkowski a micro cubetas. Laboratorio de Biología Molecular-Loja, 11 de diciembre del 2014.



Fig. 10. Medición de la absorbancia a 530 nm. Laboratorio de Biología Molecular-Loja, 11 de diciembre del 2014.



Fig. 11. Inoculación por estrías en medio de cultivo Pikovskaya modificado para verificar la capacidad de las cepas de solubilizar fosfatos inorgánicos. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 18 de diciembre del 2014.

Evaluación del efecto de co-inoculación *Azotobacter* - *Rhizobium* en el cultivo de tomate bajo invernadero.



Fig. 12. Obtención del inoculo fina realizado con las mejores cepas evaluadas. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 22 de enero del 2015.



Fig. 13. Esterilización de sustrato previo al llenado de macetas. Sector Moraspamba -Loja, 5 de febrero del 2015.



Fig. 14. Siembra de las plántulas de tomate. Sector Moraspamba-Loja 10 de febrero del 2015.



Fig. 15. Inoculación T2 (*Azotobacter vinelandii*) directamente en la raíz de las plántulas de tomate. Sector Moraspamba, Loja 10 de febrero del 2015.



Fig. 16. Fertilización química con urea a los 15 DDS. Sector Moraspamba-Loja 27 de febrero del 2015.



Fig. 17. Evaluación de la altura y conteo del número de hojas de los tratamientos. Sector Moraspamba-Loja 27 de febrero del 2015.



Fig. 18. Tutoraje y toma de datos sobre número de flores y frutos de los tratamientos. Sector Moraspamba, Loja 25 de marzo del 2015.



Fig. 19. Retiro del experimento y colocación de las plantas en fundas de papel respectivamente codificadas. Sector Moraspamba-Loja, 30 de marzo del 2015.



Fig. 20. Evaluación del peso fresco de raíz, follaje y frutos de los tratamientos. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 30 de marzo del 2015.



Fig. 21. Análisis del contenido de materia seca, mediante el secado en estufa del follaje y raíz de los tratamientos. Laboratorio de Biotecnología-Loja, 30 de marzo del 2015.



Fig. 22. Socialización de resultados de Tesis. Carrera de Ingeniería Agronómica. Loja, 29 de junio del 2015.