

DESARROLLO DE UN FERTILIZANTE NATURAL PARA ESTIMULAR LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATE CHERRY)

DEVELOPMENT OF A NATURAL FERTILIZER TO STIMULATE THE GERMINATION OF SEEDS OF *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATO CHERRY)

Helena Zambrano • Iván Belmar
 Profesora Guía: Cecilia Amigo
 Colegio Concepción Chiguayante, Chiguayante, Región del Biobío
 Asesora Científica: Katherine Sossa
 Evaluadora: Luisauris Jaimes

Resumen

La siguiente investigación plantea la aislación de bacterias que promueven la germinación del tomate cherry, para ello se aislaron bacterias endófitas y epífitas aisladas de la raíz de la planta, de las que se preparó caldo de cultivo y se sembró en placas. Las semillas anteriormente seleccionadas fueron sumergidas y dispuestas en cámaras oscuras para el estudio de la germinación. Las semillas germinaron al cabo de 3 días de estudio, pudiendo deducir un posible efecto positivo en la germinación de las plántulas con los inóculos, así como del estado nutricional de las semillas, con un rendimiento alto respecto a las semillas que se encontraban sin inóculo.

Palabras claves: Germinación; Tomate cherry; Bacterias epífitas; Bacterias endófitas.

Abstract

This investigation aimed to isolate bacteria that promote the germination of the cherry tomato. For this purpose, endophytic and epiphytic bacteria isolated from the root of the plant were isolated, from which culture broth was prepared and planted. The previously selected seeds were submerged and arranged in dark chambers for germination study. The seeds germinated after 3 days of study, being able to deduce a possible positive effect in the germination of the seedlings with the inocula, and the nutritional status of the seeds, with a high yield regarding seeds without inoculum.

Keywords: Germination; Cherry tomato; Epiphyte bacteria; Endophytic bacteria.

El Proyecto participó en:

* Congreso Nacional Escolar de la Ciencia y Tecnología 2018, PAR Explora Conicyt Biobío.



Introducción

El tomate es la principal hortaliza cultivada en todo el mundo, tanto a cielo abierto como en invernadero (Flores *et al.*, 2007). El tomate es originario de América del Sur, aunque se considera a México como el centro de su domesticación; con la llegada de los españoles se expandió al viejo continente y de ahí a todo el mundo; con su comercialización y la difusión lograda, actualmente forma parte de la dieta alimenticia de varias culturas. Se considera que a nivel internacional, las hortalizas junto con las frutas ocupan en nuestros días el segundo lugar de los productos agropecuarios, después de los cereales. Se estima que tan solo dos hortalizas contribuyen con el 50% de la producción en el mundo: la papa y el tomate, lo cual nos indica el enorme valor que este último cultivo representa no solo en el comercio, sino también en el sistema alimentario mundial.

De acuerdo a las estimaciones de la FAO, que no hacen distinción entre tomate para consumo fresco e industrial, el tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo, alcanzando 4,8 millones de hectáreas en el año 2017, con una producción de 179 millones de toneladas. A nivel mundial, el tomate se considera la hortaliza más importante, ocupando el primer lugar tanto en superficie como en volumen de producción.

En Chile ocupa el lugar 40° en superficie, con 15.833 hectáreas, y el lugar 24° en producción, con 993.076 toneladas, lo que permite visualizar que los rendimientos promedio alcanzados a nivel nacional superan a los de varios países (63 ton/ha; posición 34) (FAO, 2017).

A nivel nacional y desde el punto de vista de la alimentación de la familia chilena, el tomate también es considerado la hortaliza más importante. Ocupa el primer lugar dentro de las hortalizas de la canasta (ponderación de 0,32%), lo que significa que es la hortaliza a la que los hogares destinan más recursos, de acuerdo a los datos entregados por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) (ODEPA, 2014).

Una nueva forma de hacer agricultura, vinculada con la producción de alimentos sanos y orientados al mercado de exportación ha venido ganando importancia en la agricultura mundial desde los años 80; esta es la agricultura orgánica, ecológica o biológica, la cual se define como un sistema de producción que utiliza insumos naturales a través de prácticas especiales, como composta, abonos verdes, control biológico, repelentes naturales a base de plantas, asociación y rotación de cultivos, entre otros más, este tipo de agricultura excluye insumos de síntesis química (Gómez *et al.*, 2003). La producción orgánica, es un método agrícola en el cual no se utilizan fertilizantes ni plaguicidas sintéticos; esto coincide, en forma general, con la normatividad de algunos países como México, Europa, Estados Unidos y Japón (FAO, 2001).

Los biofertilizantes en base a microorganismos se revelan como una estrategia importante para lograr una agricultura sustentable, el uso de biofertilizantes, vía microorganismos que habitan la rizósfera del suelo en estrecha relación con la planta, su utilización permite disminuir insumos químicos, reduciendo el impacto



ambiental desfavorable que se vive en los últimos años, permitiendo obtener ahorros económicos, incrementar rendimientos, mejorar la salud general de las plantas y regenerar paulatinamente las características físicas, químicas y biológicas de los suelos (Gómez *et al.*, 2003). Entre los organismos microbianos más estudiados y empleados como biofertilizantes y antagonistas de enfermedades se encuentran las bacterias *Rhizobium*, *Azospirillum* y los hongos micorrícicos arbusculares como *Glomus*, entre otros.

Con base en lo antes señalado, consideramos que este trabajo modestamente pudiese favorecer el uso de biofertilizantes para aquellos productores interesados en una agricultura orgánica amigable con el medio ambiente y de bajo impacto ambiental.

Hipótesis

Las bacterias endófitas y epífitas aisladas de la raíz de *Solanum lycopersicum* (tomate cherry) promueven la germinación de las semillas de tomate cherry.

Objetivo general

Evaluar los efectos de las bacterias endófitas y epífitas aisladas de *Solanum lycopersicum* (tomate cherry) como promotores en la germinación de sus semillas.

Objetivos específicos

- Aislar bacterias endófitas y epífitas de la raíz de *Solanum lycopersicum* (tomate cherry).
- Evaluar el efecto de las bacterias en la germinación de la semilla de *Solanum lycopersicum* (tomate cherry).

Metodología

Aislamiento de Bacterias

A partir de la raíz de una planta de tomate cherry se dividió la muestra en dos, 1,769 gramos para el aislamiento de bacterias epífitas y 1,675 gramos para las bacterias endófitas, ambas muestras fueron lavadas en agua para retirar la tierra que tenían. Una de las muestras fue desinfectada para quitar las bacterias que quedan fuera y así asegurarse sólo de aislar las de dentro, la desinfección se realizó lavando la muestra en etanol y luego en agua estéril, para proceder a molerla, luego ambas muestras (molida y entera) fueron

puestas en tampón PBS (tampón fosfato salino) pH 7,2 y llevadas al sonicador por 5 minutos. Luego de esto se realizaron diluciones seriadas de 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 con tampón PBS y se dispuso a sembrar en placas con medio de cultivo TSA (Agar tripticasa Soja). La siembra fue con rastrillo poniendo 100 µL de cada dilución por duplicado en las placas y se dejó incubando por aproximadamente 48 horas a 25°C.

Posterior a ello se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las placas en donde era más fácil hacerlo, aquellas que tenían mayor factor de dilución, además se realizó el recuento de colonias diferentes y se aislaron. La aislación se realizó también en placas Petri con medio de cultivo TSA al 50%, pero esta vez con el método de siembra por estrías y al igual que las anteriores se dejaron incubar de 24 a 48 horas a 25°C.

Tinción Gram

La muestra se dispuso en un portaobjeto previamente marcado con el nombre de la cepa en lápiz grafito y fue fijada mediante calor. Posterior a ello, se agregó cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frotis y se dejó actuar por 1 minuto, después se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante cuidando que el chorro no cayera directamente en la muestra, se le agregó lugol en cantidad suficiente para cubrir el frotis y se dejó actuar por 1 minuto. Se lavó con agua nuevamente y se decoloró con alcohol hasta que el efluente saliera incoloro y se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente, después se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis y se dejó actuar 1 minuto, se lavó con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste y se puso a secar la preparación a temperatura ambiente, posterior a ello se observó al microscopio.

Ensayo de Germinación de Semilla

Las 8 cepas seleccionadas anteriormente fueron sembradas en el medio TSA de forma estriada y fueron incubadas de 24 a 48 horas. Posteriormente se preparó el inóculo en caldo TSB (triptona de soja) al 50%, para las 8 diferentes cepas, en agitación por 16 a 18 horas.

Se preparó el patrón (McFarland) como referencia para ajustar la concentración de cada solución a 0,5 McFarland, es decir, a la primera turbidez visible, lo que equivale a 108 células/mL. Para disolver se utilizó agitación con Vortex, por 1 minuto.



Tratamiento de las Semillas

Las semillas fueron desinfectadas en alcohol al 70% por 3 minutos. Después fueron enjuagadas 5 veces con agua destilada estéril. Finalizado el enjuague, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos y por último se enjuaga 5 veces con agua destilada estéril, se disponen en una placa Petri con toalla nova estéril para acelerar el secado de las semillas.

Se sumergieron las semillas estériles dentro del caldo de bacterias en medio PBS, se agitó por 5 minutos aproximadamente y se pusieron en una cámara oscura -placa Petri con papel absorbente y una malla donde se dispusieron las semillas-, se incubó en oscuridad entre 20-25°C y se controló diariamente la germinación por aproximadamente 15 días.

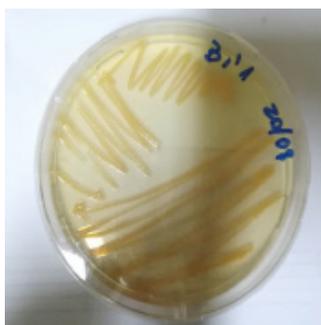
Resultados

Las colonias bacterianas obtenidas tanto epífitas como endófitas se mantuvieron en cultivo sobre medio TSA 50% y se les llevó a cabo una caracterización morfológica

basándose en los criterios de forma colonial, el tipo de superficie, elevación del crecimiento y tipo de borde, dándoles nombre a cada cepa distinta según lo observado. Algunas se mostraron blancas, amarillas, naranjas y rosadas, con aspecto lechoso la mayoría pero una en particular con una especie de filamentos, las que presumiblemente sean bacterias propias de la rizosfera de la planta.

Al realizar la tinción gram a ocho cepas seleccionadas, cinco de estas demostraron ser gram positivo (+) y tres, gram negativo (-). En cuanto a sus características morfológicas seis cepas demostraron ser cocos y tres bacilos.

También se evaluó el efecto de las bacterias endófitas y epífitas en la germinación de las semillas, para ello se eligieron 8 cepas anteriormente seleccionadas en el proceso de aislamiento y se dejaron en promedio 6 a 7 días germinar, de los 8 aislados 3 presentaron una estimulación en la germinación. Los aislados que presentaron esta característica fueron B'1.2, A3.3 y A'3.1. El aislado B'1.2 (endófito) presentó una velocidad de germinación de 9,14 semillas germinadas por día y el



tiempo en que comenzaron a germinar fue de 2,5 días, mientras que para A3.3 (epífita) la velocidad fue de 10,5 semillas germinadas por día y el tiempo en que comenzaron a germinar fue de 4 días, mientras que para la cepa A'3.1 (epífita) la velocidad fue de 10,25 semillas germinadas por día y el tiempo en que se demoró en germinar fue de 4 días (Tabla N° 1, Gráfico N° 1 y N° 2).

Todos los aislados generan una mayor velocidad de germinación de semillas, pero no alcanzan a ser diferencias significativas, debido a que las desviaciones estándar son altas y no se presentan diferencias significativas en los porcentajes de germinación de semillas a los 7 días.

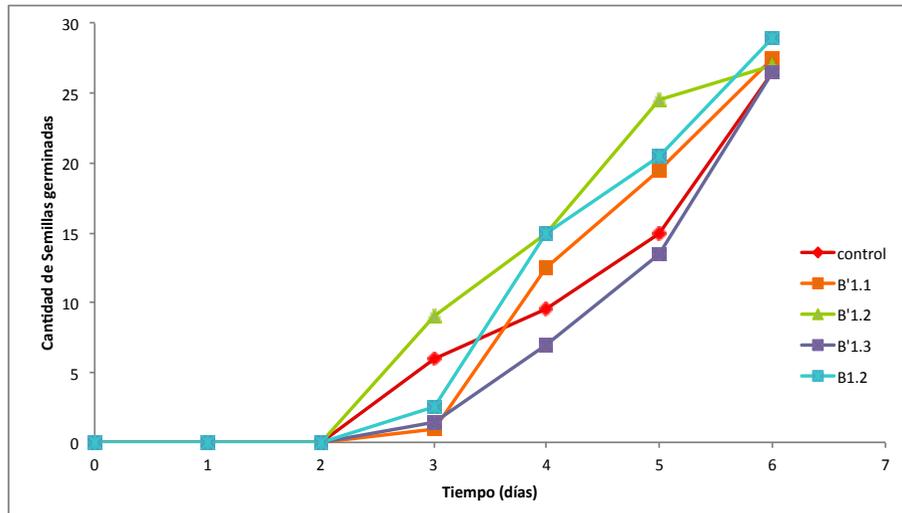


Gráfico N° 1. Semillas germinadas de tomate Cherry por día inoculadas con bacterias endófitas.

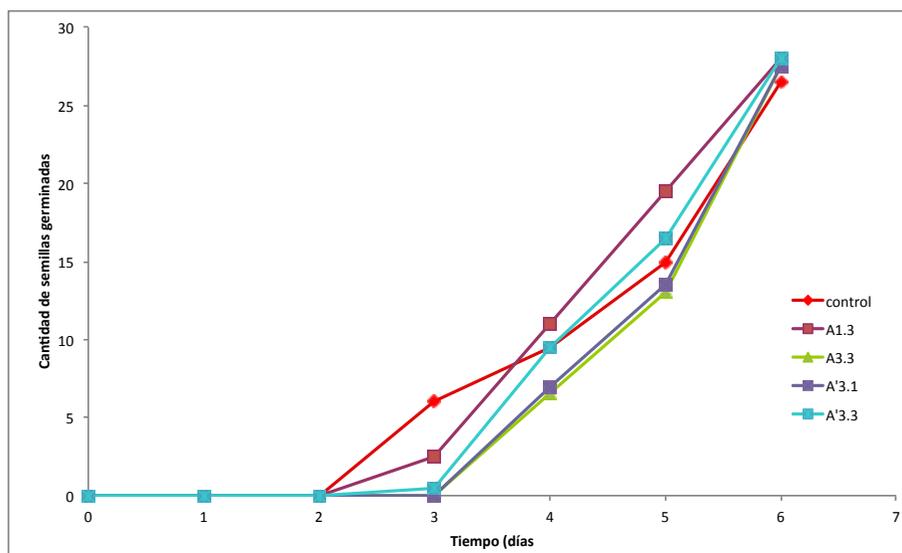


Gráfico N° 2. Semillas germinadas de tomate Cherry por día inoculadas con bacterias epífitas.



Tabla N° 1. Velocidad de germinación, porcentaje de germinación a las 7 días y tiempo de inicio de la germinación de semillas de Tomate cherry inoculadas con bacterias Epífitas y Endófitas de Tomate Cherry.

Aislado	Origen	Velocidad (semillas germinadas/día)	Germinación	
			Tiempo inicio (días)	Porcentaje (%)
Control	sin bacterias	6,70	3	93,3
B'1.1	Endófito	8,65	3	100
B'1.2	Endófito	9,14*	2,5	91,7
B'1.3	Endófito	8,15	3	91,7
B1.2	Endófito	8,50	3	100
A1.3	Epífita	8,50	3	98,4
A3.3	Epífita	10,5*	4	96,7
A'3.1	Epífita	10,25*	4	100
A'3.3	Epífita	8,95	3	95

* Valores con diferencias significativas con respecto al control.

Discusión

Las diferencias en la cantidad de los aislados tanto epífitos como endófitos obtenidos de la raíz de una planta de tomate cherry, pueden evidenciar la influencia de factores ambientales locales sobre las microfioras presentes en la raíz. El método de cultivo en placa y el período de incubación por 15 días resultaron efectivos para la observación de las características de las bacterias y elegir 8 cepas para el ensayo de germinación.

En el caso de los microorganismos epífitos aislados a partir de 1,769 gramos de la raíz de la planta, se obtuvieron 795000 UFC (unidades formadoras de colonia) mientras que para los aislamientos bacterianos endófitos 4100 UFC de aislamientos bacterianos, esta diferencia puede deberse principalmente porque la penetración de las bacterias endófitas es más difícil en la raíz que las epífitas, ya que las endófitas pueden residir en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares (Macculley, 2002) y pasan al tejido a través de los estomas, heridas y áreas de emergencia de raíces laterales. La cantidad de organismos endófitos es altamente variable, ya que depende de la especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales (Pillay y Norwalk, 1997).

El comportamiento de mayor abundancia de las bacterias como epífitos observado, podría ser explicado debido a que se apunta que las bacterias podrían tener una ventaja competitiva con respecto a la colonización de la rizosfera frente a los demás microorganismos y además investigaciones realizadas en Estados Unidos y en Europa en los últimos años han determinado la

presencia de bacterias epífitas en plantas sensibles a heladas reportándose como catalizadores activos para la formación de núcleos de hielo, aumentando la posibilidad de que sean estas bacterias, las que limiten el enfriamiento de esas plantas (Lindow, 1983a; Lindow, 1983b).

En el ensayo de tinción gram de los ocho aislados, 5 fueron gram positivo y 3 negativos, dentro de este tipo de caracterización pueden existir bacterias del tipo *Azospirillum* (gram negativo), *Azotobacter* (gram negativo), *Rhizobium* (gram negativo), *Pseudomonas* (gram negativo) y *Bacillus* (gram positivo), todas ellas bacterias promotoras de la germinación y crecimiento de plantas y la mayoría gram negativo. Probablemente nuestra cantidad de bacterias gram positivos (cinco) frente a las gram negativo (tres) se deba principalmente a bacterias del tipo *Bacillus*, pero esto debería ser corroborado por una caracterización con ADN.

Para el ensayo de germinación de los ocho aislados, tres presentaron características promotoras de la germinación, dos de ellas epífitas y una endófito. Si las bacterias epífitas promueven más la germinación de las semillas que las endófitas no lo sabemos, debido a que esta información no está registrada, ya que no existen investigaciones de este tipo en esta planta, por lo tanto, nuestra investigación podría ser un precedente para investigaciones futuras.

De acuerdo a la información experimental obtenida, nuestra hipótesis de investigación pudo ser contrastada y los aislados de la raíz del tomate cherry pueden ser propuestos como un biofertilizante, lo que podría ser de gran ayuda a la industria agrícola.



Conclusión

Se aislaron las bacterias endófitas y epífitas de la raíz de *Solanum lycopersicum* (tomate cherry).

Se obtuvo una mayor cantidad de aislados epífitos con respecto a los endófitos para la raíz aislada de tomate cherry.

La mayor parte de los aislados fueron gram positivo (+) y cocos.

Los aislados B'1.2, A3.3 y A'3.1 estimulan la germinación de semillas de tomate Cherry aumentando su velocidad de germinación, teniendo el potencial uso como fertilizante natural.

Los aislados de bacterias endófitas y epífitas no tienen efecto en el porcentaje de germinación de semillas de tomate Cherry a los 6 días.

Bibliografía

- Briz J. 2004. Agricultura ecológica y alimentación. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Flores J, Ojeda-Bustamante W, López I, Rojano A, Salazar I. 2007. Requerimientos de riego para tomate de invernadero. Terra Latinoamericana 25: 127-134.
- Gómez T, Gómez C, Schwentesius R. 1999. Desafíos de la agricultura orgánica comercialización y certificación. Editorial Mundi-prensa, México.
- Lindow S. 1983a. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Ann Rev Phytopathol 21: 363-384.
- Lindow S. 1983b. Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation-active bacteria. Plant Dis 67: 327-333.
- Macculley M. 2002. Niches for bacterium endophytes in crop plants: A plant Biologists view. Aust J Plant Physiol 28: 983-990.
- Organización de las Naciones Unidas. 2001. El estado mundial de la agricultura y alimentación, Roma, Italia.
- Pérez A, Rojas J, Fuentes J. 2010. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del Departamento de Sucre, Colombia. Acta Biol Colomb 15: 219-228.
- Pillay V, Norwark J. 1997. Inoculam, density, temperature, and genotype effect on in vitro growth promotion and epiphytec and endophytec colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), seeding inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. Can J Microbiol 43: 354-361.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interaction with host. Mol Plant Microbe Interact 19: 827-837.

