

Nit: 900.207.843-7

PROTOCOLO: Prueba de eficacia con fines de registro ICA como bioinoculante al suelo del producto PROMOBAC (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*) aplicado en etapa de plantulación para promover el crecimiento en tomate tipo chonto híbrido Gem 16 en las empresas Vitalplan (Corregimiento de San Antonio de Prado- Medellín, vereda San José, finca Los Lagos) y Bioquirama SAS, Rionegro (Antioquia)

1. INTRODUCCIÓN

El sistema radical de las plantas exuda diversos nutrientes orgánicos (ácidos orgánicos, fitosideróforos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos, mucílago) y señales que atraen poblaciones microbiales, especialmente aquellas que metabolizan los compuestos exudados por las plantas y proliferan en su hábitat microbioal. (Drogue *et al.*, 2013). Los exudados radicales son la mayor fuente de carbón en el suelo y por lo tanto las comunidades microbiales alcanzan hasta 10^{10} bacterias por gramo de suelo (Roesch *et al.*, 2007) y comprende una amplia diversidad de taxas; estas comunidades son diferentes a las que se encuentran en el suelo adyacente a las plantas. Debido a que los exudados radicales cambian a lo largo del sistema radical, de acuerdo a los estados de desarrollo y los genotipos, la composición del rizomicrobioma también cambia (Chaparro *et al.*, 2013).

En el rizo - microbioma algunos microorganismos pueden promover el desarrollo de las plantas y mejorar su estado fitosanitario a través de mecanismos directos e indirectos. Se presentan interacciones simbióticas donde los costos y beneficios son compartidos entre plantas y microorganismos (Bulgarelli *et al.*, 2013) y se puede categorizar en dos tipos de interacciones.

La primera, interacciones mutualistas obligadas, que tienen un rango restringido de plantas hospedantes compatibles. Ellas generalmente permiten la formación de estructuras específicas dedicadas a la interacción (p.e nódulos durante la simbiosis entre rizobios nodulantes y Fabaceae, arbuscúlos en las simbiosis endomicorrizal).

La segunda, cooperaciones (también llamadas simbiosis asociativa) que corresponden a interacciones menos específicas y obligadas (Drogue *et al.* 2012). Estas involucran bacterias del suelo que colonizan la superficie del sistema radical (en algunas ocasiones los tejidos internos de las raíces) y estimulan el crecimiento y sanidad de las plantas, y

Nit: 900.207.843-7

son referidas como Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR; Barea et al., 2005).

La colonización es heterogénea en la raíz y su rol es promover el crecimiento vegetal. Los PGPR interactúan con un gran número de especies vegetales, pueden mejorar la nutrición mediante vías asociativas como la fijación de nitrógeno, solubilización fosfatos o producción de fitosideroforos (Richardson et al., 2009). Mejoran el desarrollo radical a través de la producción de fitohormonas o actividades enzimáticas y favorece el establecimiento de simbiosis rizobial o micorrizal. Otros pueden proteger las plantas a través de la inhibición de fitoparásitos basados en antagonismo o competencia y por elicitación de defensas vegetales como la inducción de resistencia sistémica inducida (ISR; Kamilova, 2006). Algunos PGRP pueden ayudar a las plantas superar estrés abiótico causado por contaminación por metales pesados y otros contaminantes.

En la fase de plantulación en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) uno de los problemas más limitantes es el pobre desarrollo de las plantas. El objetivo del presente trabajo de estudio de eficacia del producto biológico PROMOBAC (Compuesto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumillus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*) es evaluar su efecto en el desarrollo y crecimiento de plántulas de tomate.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del inoculante biológico del suelo PROMOBAC sobre crecimiento en plántulas de tomate bajo condiciones de invernadero.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la dosis de producto y su efecto en la toxicidad en plantas
- Demostrar los efectos del producto sobre la estimulación del crecimiento

3. INFORMACIÓN GENERAL DEL PRODUCTO:

PROMOBAC: Es un producto de uso agrícola elaborado con un grupo de cepas de *Bacillus subtilis* (cepa CBQ-40), *Bacillus pumilus* (CBQ-20), *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* que tienen la capacidad de colonizar la zona de crecimiento de las raíces (rizosfera), estimular su crecimiento. Su formulación corresponde a una suspensión compuesta por adherentes y surfactantes



Nit: 900.207.843-7

naturales con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (Bioquirama, 2015).

4. Efecto de las Rizobacterias en el suelo

Generalmente las estrategias de promoción de crecimiento en plantas se emplean un solo agente microbiano, lo cual explica en muchos casos los resultados inconsistentes, pues un solo organismo no tiene el mismo comportamiento en todos los ambientes del suelo en los cuales se aplica. En la actualidad algunas investigaciones han demostrado que cuando se realiza mezcla de microorganismos con diferentes formas de colonización radical, formas de antagonismo, diferentes tipos de supresión de infecciones y actividad en el suelo tienen mayor éxito (Janisiewicz, 1988).

Es probable que en la mayoría de los casos el control biológico natural sea el resultado de mezclas de antagonistas, más que de poblaciones altas de un solo microorganismo. Por ejemplo, las mezclas de antagonistas se consideran responsables para la protección de enfermedades en suelo supresivos (Lemanceau and Alabouvette, 1991). Por lo tanto, la aplicación de una mezcla de los agentes imitaría más de cerca la situación natural y amplía el espectro de la actividad metabólica en las plantas (Duffi and Weller, 1995), y permitirá la combinación de varios mecanismos sin necesidad de ingeniería genética

5. MATERIALES

- Material vegetal: Tomate de mesa híbrido torrano.
- Insumos: Fertilizantes, Promobac, *Bacillus subtilis* casa Comercial, Sustrato para germinación.
- Herramientas: Bomba de espalda, Bandejas de germinación, Planillas de datos

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Siembra y Germinación de Tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Se sembrarán semillas de tomate de mesa variedad GEM16, híbrido, F1, en canastas de 162 alveolos de la casa comercial Saenz Fety S.A.S, el sustrato que se utilizará para la germinación estará compuesto por turba 15Kg y micorriza de Bioquirama 120gr/Kg además se realizará un drench al momento de la siembra con PROMOBAC y se dejarán las bandejas en cámara humedad durante 5 días para su óptima germinación, después de pasado los 5 días se evaluará la germinación; si esta ha alcanzado entre el 65 a 70% se procederá a retirar el plástico que las cubre y se realizará una hidratación con



Nit: 900.207.843-7

PROMOBAC , y el *B. subtilis* de una casa comercial registrada ante el ICA , y se iniciarán los tratamientos de las plantas. Estos tratamientos se aleatorizarán con sus respectivas dosis, las aplicaciones radicales se realizan después de obtener entre el 65 y 70% de germinación y se aplicará al sustrato cada semana a dosis correspondientes a los tratamientos durante 30 días, tiempo el cual dura la plantulación.

Aplicación de Tratamientos

Se establecerán cinco tratamientos bajo un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones (plantas de tomate de mesa GEM 16) cada uno. Los tratamientos que se evaluarán serán: 1) PROMOBAC aplicado al sustrato en dosis alta de 10mL/L. 2) PROMOBAC aplicado al sustrato en dosis media de 5cc/L. 3). PROMOBAC aplicado al sustrato en dosis baja de 2.5cc/L, 4). *B. subtilis*, de la casa comercial registrada ante el ICA, aplicado al suelo en dosis recomendada de 3cc/L, y 5). Testigo absoluto, sin ningún tipo de aplicación de *Bacillus*. Se aclara que el tratamiento 1 en dosis alta se utilizará para determinar si existe toxicidad en las plantas.

Las aplicaciones que se realizarán durante las pruebas llevarán siempre un itinerario de aplicación junto con sus respectivas dosis sorteadas, el producto a evaluar corresponderá a PROMOBAC de la casa comercial Bioquirama S.A.S, enfrentado con un producto de la casa comercial aprobado por el ICA. Las aplicaciones se realizaron durante todo el proceso de germinación durante 30 días; las aplicaciones se realizarán en drench con una bomba de aspersion y una boquilla de baja descarga y chorro compacto. Las aplicaciones como se ha indicado anteriormente se realizarán a las dosis descritas y se aplicarán semanalmente, después de los tratamientos pre germinativos.

Adicionalmente a los tratamientos de *Bacillus* se fertilizará con 15-30-15 y micronutrientes día por medio hasta finalizar la germinación.

VARIABLES A EVALUAR

Las variables biométricas de las plantas se medirán a los 30 después de la germinación. La medición de altura de planta se realizará con una regla (graduada en centímetros) desde la base de la planta hasta el meristemo apical de la planta. El grosor de tallo se medirá en la base de la planta con la utilización de un calibrador graduado en centímetros. Para medir la longitud de la raíz se procederá a realizar un lavado



Nit: 900.207.843-7

minucioso de las raíces para eliminar el sustrato; posteriormente se medirá el largo de la raíz desde el inicio de la misma hasta la ramificación más larga.

La determinación de la masa fresca de la planta efectuará mediante la utilización de una balanza, luego muestras se introducirán a un horno a 60 °C por 72 horas para el proceso de secado y determinación de la masa seca.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos se comprobarán en el paquete estadístico Rwizard 1.3. Se realizará análisis de varianza y la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas entre medias. Para las variables de marchitez parcial o total en la escala propuesta por Rodríguez y Miranda (2013) y Navarro (2015). Para hallar las diferencias significativas se realizará una prueba de *Chi-squared test* (Prueba de chi cuadrado) el cual servirá para cumplir con los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia.

8. DESARROLLO.

El ensayo se realizará en la empresa Vitalplan en el Corregimiento de San Antonio de Prado - Medellín, vereda San José, finca Los Lagos. Se emplearán bandejas de 128 a 200 pozos, donde serán sembradas las semillas de la variedad chonto, híbrido torrano. Al mismo tiempo se realizara esta prueba en la empresa Bioquirama, ubicada en el kilómetro 3 vía Rionegro la Ceja en la vereda Vilachuaga.

9. PROFESIONAL RESPONSABLE DE LOS ENSAYOS

I.A. Adolfo Posada Duque

I.A. MSc, Rafael Navarro A.

10. CONDICIONES DEL EXPERIMENTO Y LOCALIZACIÓN

El ensayo se realizará en la empresa Vitalplan, quien presta los servicios de vivero y germinación, está empresa se encuentra ubicada en el Corregimiento de San Antonio de Prado, Medellín, vereda San José, finca Los Lagos y en la empresa Bioquirama ubicada en el kilómetro 3 vía la Ceja-Rionegro, vereda Vilachuaga (Oriente Antioqueño). Para

Vereda Vilachuaga Km 3 Vía Rionegro La Ceja. Teléfono: 034 - 562 84 39

Nit: 900.207.843-7

este trabajo se emplearán bandejas de 128 a 200 pozos, donde serán sembradas las semillas de tomate, variedad chonto, híbrido torrano.

12. MAPAS DE ACCESO A LAS EMPRESAS.

Ubicación de la empresa Vitalplan, en el Corregimiento de San Antonio de Prado-Medellín, vereda San José, finca Los Lagos (Mapa de acceso).



Fotografía 1. Mapa de acceso a la empresa Vitalplan. Tomado de: Archivos Vitalplan

Ubicación de la empresa Bioquirama, en el Municipio de Rionegro, vereda Vilachuaga kilómetro 3 vía la Ceja-Rionegro (Mapa de Acceso).



Fotografía 2. Mapa de acceso a la empresa Bioquirama, Tomado de: Archivos Bioquirama S.A.S

BIBLIOGRAFÍA

Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1761–1778. doi: 10.1093/jxb/eri197

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. doi: 10.1146/annurevarplant-050312-120106

Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., and Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* 8:e55731. doi: 10.1371/journal.pone.0055731

Drogue, B., Combes-Meynet, E., Moëgne-Loccoz, Y., Wisniewski-Dyé, F., and Prigent-Combaret, C. (2013). “Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signals,” in Vol. 1 and 2, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, ed. F. J. de Bruijn (NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 281–294. doi: 10.1002/9781118297674.ch27.

Drogue, B., Dore, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., and PrigentCombaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* 163, 500–510. doi: 10.1016/j.resmic.2012.08.006

Duffy, B. K., and Weller, D. M. 1995. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. to suppress take-all of wheat. *Plant Dis.* 79:907-911.

Janisiewicz, W. J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology* 78:194-198.

Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., and Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 250–256. doi: 10.1094/MPMI-19- 0250



Nit: 900.207.843-7

Lemanceau, P., and Alabouvette, C. 1991. Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. *Crop Prot.* 10:279-286.

Richardson, A. E., Baréa, J. M., McNeill, A. M., and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. doi: 10.1007/s11104-009-9895-2

Roesch, L. F. W., Camargo, F. A. O., Bento, F. M., and Triplett, E. W. (2007). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant Soil* 302, 91–104. doi: 10.1007/s11104-007-9458-3.