



Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.)

Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria* sp.) crop

 Manuel Alvarez^{1,2,*}; Franz Tucta³; Evelyn Quispe³; Victor Meza⁴
¹ Carrera de Ingeniería Ambiental, Universidad Católica de Cuenca (UCACUE), Cuenca, Ecuador.

² Doctorado en Ingeniería y Ciencias Ambientales, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Peru.

³ Carrera de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Peru.

⁴ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Peru.

Received December 13, 2017. Accepted January 29, 2018.

Resumen

Se evaluó el efecto de microorganismos benéficos (MOBs) en el desarrollo del cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). La investigación se realizó en tres fases. (i) Primera: en la provincia de Azuay – Ecuador, se recolectaron muestras de distintas plantas ubicadas en tres pisos altitudinales con características climatológicas diferentes. (ii) Segunda: en el laboratorio de la Universidad Nacional Agraria La Molina, en Lima – Perú, con cada muestra vegetal, se preparó la solución madre, así como medios de cultivo para MOBs, después se identificó la flora microbiana benéfica. (iii) Tercera: en la etapa de campo, se inoculó en el suelo un consorcio microbiano, con cuatro repeticiones por cada piso altitudinal; posteriormente se plantó fresa. En los medios de cultivo se constató la presencia de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y actinomicetos. Se comprobó que, según la procedencia, los microorganismos presentan efectos heterogéneos en el desarrollo de las plantas. Se concluye que en cada piso altitudinal existen microorganismos benéficos de acuerdo a la especie vegetal, que su inoculación en el suelo incrementa el número de hojas, así como también favorece el desarrollo longitudinal, diametral y de raíces, de las plantas de fresa.

Palabras clave: Microorganismos; suelo; plantas; Azuay; beneficiosos.

Abstract

The effect of beneficial microorganisms (MOBs) on the development of the strawberry crop (*Fragaria* sp.) was evaluated. The investigation was carried out in three phases. (i) First: in the province of Azuay - Ecuador, samples were taken from different plants located on three altitudinal floors with different climatological characteristics. (ii) Second: in the laboratory of the National Agrarian University La Molina, in Lima - Peru, with each plant sample, the mother solution was prepared, as well as culture media for MOBs, after which the beneficial microbial flora was identified. (iii) Third: in the field stage, a microbial consortium was inoculated on the ground, with four repetitions for each altitudinal floor; subsequently strawberry was planted. In the culture medium the presence of yeasts, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., and actinomycetes were found. It was verified that, according to the provenance, the microorganisms have heterogeneous effects in the development of the plants. It is concluded that in each altitudinal floor exist beneficial microorganisms according to the plant species, that their inoculation in the soil increases the number of leaves, as well as it favors the longitudinal, diametral and roots development of the strawberry plants.

Keywords: Microorganisms; soil; plants; Azuay; beneficial.

* Corresponding author
E-mail: alvemas73@hotmail.com (M. Alvarez).

1. Introducción

Cada día somos más habitantes en el planeta Tierra, el incremento poblacional demanda una producción superior de alimentos y a su vez ejerce mayor presión sobre el recurso suelo. La agricultura se enfrenta a graves problemas de degradación de la tierra (Mishra et al., 2016), el sistema de cultivo intensivo, así como el desequilibrio en el uso de fertilizantes son los factores principales que provocan desbalance de nutrientes, disminuyen la fertilidad del suelo, bajan la productividad y reducen la calidad de los alimentos (Singh et al., 2017).

En la fruticultura mundial la fresa ocupa un lugar significativo (Thakur et al., 2015), conocida por su color atractivo, alto valor nutritivo, aroma único, precocidad y excelente rentabilidad (Yadav et al., 2017); es un cultivo altamente susceptible al ataque de patógenos, razón por la que se usan pesticidas para contrarrestar la afección. Estudios sugieren que los plaguicidas pueden estar relacionados con asma, leucemia y diversos cánceres (Kim et al., 2017).

La sostenibilidad en sistemas agrícolas sin comprometer la calidad ambiental y la conservación de recursos, es una de las principales preocupaciones de hoy en día (Kumar et al., 2016), los microorganismos son actores importantes en un sistema de producción, pueden ayudar en el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles (Nihorimbere et al., 2011).

Los microorganismos de importancia agrícola representan una estrategia ecológica clave hacia el desarrollo integrado de prácticas tales como manejo de nutrientes, enfermedades y plagas, con miras a reducir el uso de productos químicos en la agricultura, así como para mejorar el rendimiento de los cultivos (Bhattacharyya et al., 2016); juegan un papel importante en los sistemas agrícolas, particularmente los microorganismos promotores del crecimiento (Trabelsi et al., 2013), que aumentan el desarrollo de las plantas y suprimen las enfermedades (Paramanandham et al., 2017).

Las influencias beneficiosas incluyen la fijación de nitrógeno, la absorción de los nutrientes principales, la promoción del crecimiento de ramas y raíces, el control o la supresión de enfermedades y la mejora de la estructura del suelo (Vadakattu, 2012). Durante algunos años se estudió el efecto de tres cepas de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) solas o en combinación, sobre el cultivo de fresa, los

datos mostraron que PGPB aumentan significativamente el rendimiento de la fruta, crecimiento de la planta y contenido de P y Zn de las hojas (Esitken et al., 2010). La interacción entre plantas y microbios puede contribuir a la salud y productividad de los cultivos (Laili et al., 2017), a nivel mundial existe un interés permanente por conocer las bondades de los microorganismos sobre diferentes cultivos.

La provincia del Azuay está ubicada al sur del Ecuador, cuenta una variedad climatológica, desde cálido en la parte costanera, hasta el clima frío en los páramos más elevados; por la diversidad climática, se destaca la riqueza en flora y fauna que posee esta localidad. No se conoce estudios relacionados con la identificación de microorganismos benéficos en la filósfera de especies vegetales de esta región, así como de su aplicación en cultivos de fresa (*Fragaria* sp.), que es una fruta muy apetecida en los mercados y puede representar una alternativa de producción y sustento para mejorar la economía familiar. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la incidencia de microorganismos benéficos aislados de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay - Ecuador, en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.).

2. Materiales y métodos

La investigación se cumplió en tres fases: (i) Primera: recolección de muestras vegetales en tres pisos altitudinales en la provincia de Azuay, Ecuador. (ii) Segunda: Preparación de la solución madre, aislamiento e identificación de MOB's en el laboratorio de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. (iii) Tercera: Inoculación de consorcios microbianos en el suelo y cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) en el campo experimental de la UNALM.

2.1 Primera fase: recolección de muestras vegetales

En Azuay – Ecuador fueron recolectadas muestras vegetales en tres pisos altitudinales con características climáticas diferentes. La primera localidad se ubicó a 1950 ms.n.m. en la localidad “El Pongo” en el cantón Girón al sur de la provincia del Azuay; la segunda a 2250 ms.n.m. correspondió a la parroquia central del cantón nor oriental de Gualaceo y la tercera zona se encontró a 2550 ms.n.m. en la parroquia Daniel Córdova Toral. En cada zona se identificaron y seleccionaron las principales especies prevalentes. Los habitantes del lugar proporcionaron el nombre común de cada especie vegetal y los principales usos.

Tabla 1

Descripción de las muestras recolectadas

Piso altitudinal	Muestra	Código	Nombre común	Nombre científico
P1 (1950 ms.n.m.)	M1	P1M1	Café	<i>Coffea arabica</i> L.
	M2	P1M2	Plátano	<i>Musa paradisiaca</i> L.
	M3	P1M3	Falso girasol	<i>Tithonia diversifolia</i>
P2 (2250 ms.n.m.)	M1	P2M1	Ruda	<i>Ruta graveolens</i> L.
	M2	P2M2	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>
	M3	P2M3	Cedrón	<i>Aloysia triphylla</i>
	M4	P2M4	Menta	<i>Mentha piperita</i>
P3 (2550 ms.n.m.)	M1	P3M1	Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>
	M2	P3M2	Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
	M3	P3M3	Geranio	<i>Pelargonium graveolens</i>
	M4	P3M4	Altamisa	<i>Artemisia vulgaris</i>
	M5	P3M5	Canayuyo	<i>Sonchus oleraceus</i>

En el primer piso altitudinal se seleccionaron tres especies vegetales, en el segundo piso cuatro y en el tercer piso cinco. La descripción de las plantas colectadas se presenta en la [Tabla 1](#). Con tijeras de podar correctamente desinfectadas se recolectaron indistintamente fragmentos de diferentes partes de las plantas, las muestras recogidas se cubrieron con papel periódico y se guardaron en bolsas plásticas herméticas, debidamente identificadas, que posteriormente fueron colocadas en el interior de cajas plásticas y luego trasladadas hasta los laboratorios de Biología de la Universidad Nacional Agraria la Molina en Lima – Perú para la preparación de solución madre y producción de microorganismos, así como también para el aislamiento e identificación de las principales especies benéficas.

2.2 Segunda fase: trabajo de laboratorio

Preparación de la solución madre

En condiciones de laboratorio cada muestra fue cuidadosamente seccionada en fragmentos pequeños, además se registró su peso (50 g), luego se depositó en una bolsa plástica identificada con código acorde al tipo de planta y piso altitudinal correspondiente. De acuerdo a la metodología citada por [Meza \(2009\)](#), se adicionó agua pura (libre de cloro) en la misma cantidad que el peso de la muestra vegetal (50 ml) los que constituyeron el peso total (100 g), sobre el cual se agregó 10% de hígado de res (10 g), 1% de sal de mesa (1 g) y 20% de melaza de caña de azúcar, aproximadamente (20 ml). Cuidadosamente se homogenizó la mezcla; este procedimiento se repitió para las 12 muestras, las que se dejaron reposar durante diez días a temperatura ambiente en un lugar sin la incidencia directa del sol. A cinco días de iniciado el proceso, en el líquido de cada una de las bolsas plásticas se evidenció cambio de color, además de emanación de olor agrídulce. En el décimo día se observaron la presencia de capas

blanquecinas sobre las muestras vegetales, lo que demostró que el proceso avanzaba de forma correcta.

Producción de microorganismos benéficos

En botellas plásticas con capacidad para medio litro se añadió 400 ml de agua pura libre de cloro, volumen sobre el que se adicionó 10% de hígado de res (40 g), 1% de sal de mesa (4 g) y 10% de melaza, aproximadamente (40 ml). El mismo procedimiento se aplicó para las 12 muestras. Se uniformizó la mezcla de cada frasco y se autoclavaron durante 15 minutos a 121 °C, luego se dejaron enfriar.

De cada bolsa plástica se extrajo 40 ml de solución y se adicionó en los diferentes frascos, se homogenizó la mezcla y se dejó reposar a temperatura ambiente por un periodo de diez días, sin incidencia directa del sol. En el décimo día se observaron la presencia de capas blanquecinas en la parte superior de los 12 frascos, en los cuales se evidenció olor agrídulce, que reflejó la presencia de microorganismos benéficos.

Aislamiento de microorganismos benéficos

En condiciones de laboratorio se aislaron microorganismos benéficos de los 12 biopreparados. En placas Petri con medios de cultivo adecuado para cada microorganismo, se aplicó 1ml de solución; con movimientos en sentido horario y anti horario, se uniformizó la mezcla.

Los medios de cultivo para levaduras se dispusieron a temperatura ambiente por un periodo de 48 horas, los cultivos de *Bacillus* spp., permanecieron 24 horas en una incubadora a 32 °C, las placas Petri con medios de desarrollo para *Lactobacillus* spp., se colocaron en una incubadora a 36 °C por un lapso de 48 horas, para actinomicetos el cultivo se dejó en condiciones ambientales por un espacio de 12 días; durante estos periodos se evidenció la presencia de microorganismos, por lo tanto, con la técnica de estrías se realizó la purificación de todas las muestras.

En condiciones controladas, con un asa bacteriológica se realizó la siembra de microorganismos en tubos de ensayo con medio de cultivo inclinado, los cuales se conservaron en refrigeración hasta la identificación microbiana.

Identificación de microorganismos benéficos

Para levaduras se utilizó los sistemas miniaturizados API 20 C AUX con 20 microtubos diferentes en su cámara interior. De acuerdo a la turbidez del cultivo en cada microtubo, se estableció un código con siete dígitos.

Para *Bacillus* spp., se utilizó los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1 y para *Lactobacillus* spp., se utilizó los sistemas miniaturizados API 50 CHL V5.2, cada uno con 5 galerías por cámara de incubación y 10 microtubos en cada galería. De acuerdo a la tonalidad que presentó cada microtubo, se confirmó un código.

La identificación de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., se realizó con software específico de análisis de los códigos obtenidos.

La identificación de actinomicetos se cumplió mediante amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio.

2.3 Tercera fase: cultivo en campo

Selección de microorganismos benéficos

De acuerdo a las características relevantes de los consorcios microbianos, se seleccionó una muestra de biopreparado por cada piso altitudinal (Muestra 1 = P1M1; Muestra 2 = P2M4 y Muestra 3 = P3M4); de cada una de estas soluciones se aplicó al suelo dos dosis: (D1) al 2,5% y (D2) al 5%.

Diseño experimental

Se utilizó el Diseño de Bloques Completos Aleatorizados DBCA; consorcios microbianos de tres pisos altitudinales con dos dosis de aplicación, un producto comercial (EM1) y un tratamiento testigo; en total ocho tratamientos, cuatro repeticiones y 32 unidades experimentales, el detalle se presentan en la [Tabla 2](#).

Tabla 2

Tratamientos para evaluación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.)

N°	Muestra	Dosis	Interacciones	Tratamiento
1	M1	D1	M1D1	T1
2		D2	M1D2	T2
3	M2	D1	M2D1	T3
4		D2	M2D2	T4
5	M3	D1	M3D1	T5
6		D2	M3D2	T6
7	-	-	EM1	T7
8	-	-	Testigo	T8

Inoculación de microorganismos benéficos

Se realizó análisis físico, químico y biológico del suelo destinado para la investigación. La solución con microorganismos benéficos se aplicó al suelo desde 21 días antes del trasplante, además previo a la plantación las raíces de las plantas fueron sumergidas durante 15 minutos en cada solución líquida. Para preparar la solución al 2,5% se depositaron en un recipiente ocho litros de agua al cual se adicionó 200 ml del consorcio microbiano y se homogenizó la mezcla; este procedimiento se repitió para cada una de las muestras de los tres pisos altitudinales. Para acondicionar la solución al 5% se depositaron en un recipiente ocho litros de agua al cual se adicionó 400 ml del consorcio microbiano y se homogenizó la mezcla, este procedimiento se repitió para cada una de las muestras de los tres pisos altitudinales. Para preparar la solución comercial de microorganismos al 5%, se depositaron en un recipiente ocho litros de agua al cual se adicionó 400 ml de Microorganismos Eficientes (EM1) y se homogenizó la mezcla.

De cada solución preparada, con una regadera plástica, se aplicaron una vez por semana 150 ml, en los sitios donde serían ubicadas las plantas de fresa de cada tratamiento.

Plantación y desarrollo del cultivo de fresa (*Fragaria* sp.)

A 0,40 m sobre el nivel del suelo se elaboraron 32 parcelas de 0,90 m de largo por 0,60 m de ancho, la separación entre unidades experimentales fue 0,70 m y entre repeticiones 0,50 m. Se instalaron dos laterales de goteo por cada parcela con una separación entre goteros de 0,30 m y capacidad de 2,5 litros por hora. Sobre las parcelas se colocó mulch color blanco en la parte superior y color negro en el reverso. En el sitio destinado para las plantas con un dispositivo metálico se realizaron orificios, la perforación coincidió con la ubicación de cada gotero que suministró el riego a la planta. A una distancia de 0,30 metros entre plantas y 0,30 metros entre filas se plantaron en cada parcela seis plantas de fresa de la variedad "San Andreas", en total en todo el experimento se cultivaron 192 plantas.

Los riegos se aplicaron en las primeras y en las últimas horas del día de acuerdo a las necesidades hídricas determinadas con medidores de humedad, se realizó el análisis físico, químico y biológico del agua utilizada. Previo al cultivo todos los tratamientos recibieron por metro cuadrado 1 kg de humus de lombriz, se realizó la

caracterización de este para conocer sus propiedades microbiológicas relevantes. La fertilización se aplicó en el agua de riego de acuerdo a cada fase fenológica del cultivo, las formulas nutritivas fueron específicos para plantaciones de fresas.

Las principales labores culturales fueron eliminación de estolones, hojas viejas y aplicación de fertilizantes foliares. Hasta 210 días después del trasplante, en ninguno de los tratamientos se registró presencia de flores, consecuentemente de frutos, probablemente por las condiciones climáticas imperantes en el lugar con periodos prolongados de sol y altas temperaturas.

Análisis estadístico

Se efectuó el análisis de la varianza ANOVA para comparar las medias entre tratamientos, se revisó que se cumpla la linealidad de los residuales y la homogeneidad de varianzas, la información se procesó en el *software* para análisis estadístico InfoStat. De existir diferencia significativa entre los tratamientos se realizó el análisis de la diferencia mínima significativa LSD por sus siglas en inglés (Least significant difference) de Fisher r ($p \leq 0,05$) que es un test de comparaciones múltiples que permite determinar los niveles de significancia entre tratamientos de las variables en estudio.

3. Resultados y discusión

Se identificaron microorganismos benéficos presentes en los biopreparados de las muestras vegetales de los tres pisos altitudinales. Después de 120 días de iniciado el cultivo de fresa, se evaluó altura, diámetro, así como también el número de hojas por planta y la longitud de raíces.

3.1 Identificación de microorganismos

Con relación a las levaduras de interés, a 2250 ms.n.m. se identificó *Saccharomyces cerevisiae* y *Kloeckera* spp.; a 2550 ms.n.m. se identificó *Rhodotorula minuta*. En cuanto a *Bacillus* spp., se destaca que *Bacillus subtilis* *amyloliquefaciens* está presente en los tres pisos altitudinales; *Bacillus licheniformis* se identificó a 2250 ms.n.m y a 2550 ms.n.m. Con referencia a *Lactobacillus* spp., se destaca que *Lactobacillus delbrueckii* ssp se identificó en los tres pisos altitudinales; *Lactobacillus plantarum* se determinó a 2250 ms.n.m. y también a 2550 ms.n.m.; *Pediococcus damnosus* únicamente se registró en el piso altitudinal tres. En referencia a actinomicetos, *Streptomyces sanglieri* y *Streptomyces lushanensis*, se identificaron a 1950 ms.n.m., mientras que *Streptomyces*

griseorubens, *Streptomyces thermo-carboxydus*, así como también *Streptomyces bungoensis*, se constataron a 2550 ms.n.m.

En cada localidad los consorcios microbianos están constituidos por grupos taxonómicos diferentes, algunos microorganismos viven en las plantas de los tres pisos altitudinales, mientras que otros no. La composición química cualitativa, así como el contenido cuantitativo de los componentes individuales de las plantas y los aceites esenciales, pueden diferir mucho y dependen de varios factores (morfológicos, agrícolas, suelo, partes vegetativas, además condiciones climáticas, etc.) (Melnyk et al., 2015).

Los microorganismos benéficos varían su presencia de acuerdo a la especie vegetal de la cual provienen, están influenciados por las condiciones ambientales de la zona, que es uno de los condicionantes para el éxito de desarrollo microbiano, ya que los hábitats naturales de los microorganismos son extremadamente diversos (Madigan et al., 2004).

Los microorganismos pudieran estar presentes en la superficie externa de las plantas o en su interior, merecen especial atención los endófitos benéficos que son considerados como un componente de la biodiversidad (Qin et al., 2012), casi todos los grupos de microorganismos, ya sean hongos, bacterias o actinomicetos, se encuentran en asociación endofítica con plantas (Ahmed et al., 2012), estas comunidades microbianas se encuentran muy afectadas por las condiciones climáticas y la ubicación donde crece la planta huésped (Nair et al., 2014).

Los hallazgos concuerdan con la gran mayoría de criterios con respecto a los microorganismos que forman parte de los consorcios microbianos beneficiosos. Pineda et al. (2013) afirma que los microbios benéficos son compartidos por grupos taxonómicamente diferentes, al respecto Wilkinson (2009) manifiesta que entre los principales se encuentran hongos, bacterias y otros microbios que desempeñan una función importante en la sanidad vegetal y la productividad; por lo tanto, es amplia la conformación de los consorcios microbianos.

Algunos de los microorganismos beneficiosos utilizados en la agricultura en todo el mundo incluyen *Rizobium*, *Pseudomonas*, Micorrizas, *Trichoderma*, *Azospirillum*, *Bacillus*, especies de *Streptomyces* y muchos más (Vadakattu, 2012). Los microorganismos utilizados como fertilizantes microbianos son *Bacillus*, *Pseudomonas*,

Lactobacillus, bacterias fotosintéticas, bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos de *Trichoderma* y levaduras (Bhattacharjee et al., 2014). Microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Penicillium* tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico en el suelo beneficiando la absorción de nutrientes por las plantas (Tan et al., 2009).

A lo largo de los años han sido objeto de una extensa investigación las bacterias benéficas de los géneros *Acetobacter*, *Derxia*, *Arthrobacter*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea* que promueven el crecimiento de las plantas (Babalola, 2010). Es evidente que los microorganismos benéficos están presentes en diferentes áreas de las especies vegetales. Las plantas de acuerdo a su ubicación geográfica son hospederos importantes de diversidad de microorganismos beneficiosos, que pueden ser aislados y aprovechados de forma simple. Las investigaciones previas demuestran que el número de microorganismos beneficiosos es amplio y no es exclusivo de determinados grupos. Resultaría importante extender el estudio a más especies vegetales con la finalidad de conocer la riqueza en flora microbiana de una localidad e identificar y multiplicar microorganismos con potencial benéfico para la agricultura, la industria y el medio ambiente.

3.2 Altura de plantas

El efecto de los consorcios microbianos en el crecimiento de las plantas no fue homogéneo, existe diferencias significativas entre tratamientos (Figura 1).

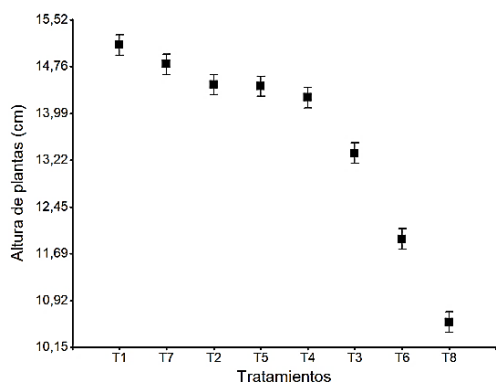


Figura 1. Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa = 0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante.

Las plantas del tratamiento T1 con microorganismos benéficos del piso altitudinal uno, presentaron mayor altura con una media de crecimiento de 15,11 cm, seguida del tratamiento T7 con producto comercial (EM1) con una media de desarrollo de 14,80 cm; las plantas del tratamiento testigo T8 exhibieron una media de 10,56 cm y fueron las más pequeñas.

3.3 Diámetro de plantas

Entre los diferentes tratamientos se presentaron diferencias significativas en diámetro de plantas (Figura 2). Las plantas del tratamiento T1 que recibieron microorganismos benéficos del piso altitudinal uno, presentaron el mayor diámetro con una media de 28,38 cm mientras que las plantas del tratamiento testigo T8 fueron las que evidenciaron el menor desarrollo diametral con una media de 20,73 cm.

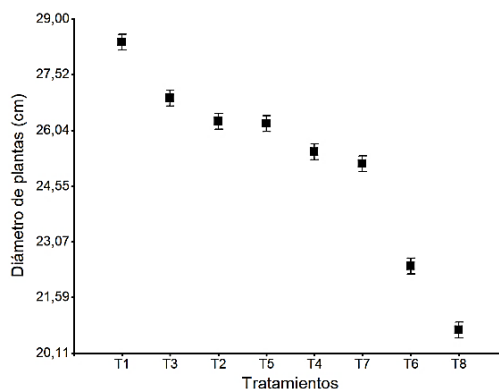


Figura 2. Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa = 0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante.

3.4 Número de hojas por planta

Se presentaron diferencias estadísticas para número de hojas por planta (Figura 3).

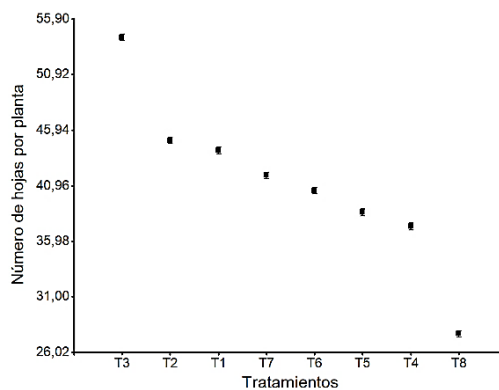


Figura 3. Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa = 0,05) para número de hojas por planta 120 días después del trasplante.

Se destacan ampliamente las plantas del tratamiento T3 con microorganismos benéficos del piso altitudinal dos, que presentaron el mayor número de hojas por planta con una media de 54,25; mientras que las plantas del tratamiento testigo T8 presentaron menor número de hojas con una media de 27,67 hojas por planta.

3.5 Longitud de raíces

Se evidencia que todos los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos desarrollaron sus raíces más que el tratamiento testigo (Figura 4). Las plantas del tratamiento T1 con microorganismos benéficos del piso altitudinal uno, presentaron mayor desarrollo radicular con una media de 33,00 cm, seguido del tratamiento T7 con producto comercial (EM1) con una media de crecimiento de 29,00 cm. El tratamiento testigo T8 con una media de longitud de 18,50 cm fue el que mostró menor desarrollo radicular, estadísticamente muy diferente a todos los demás tratamientos.

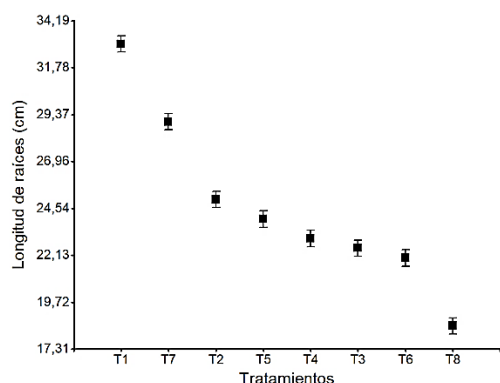


Figura 4. Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa = 0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante.

3.6 Correlación entre altura de plantas y longitud de raíces

El tratamiento T1 que presentó la mayor altura de plantas (15,33 cm) fue también el que presentó el mayor crecimiento de raíces (33,00 cm), mientras que el tratamiento T8 que registró el menor crecimiento de plantas (10,56 cm) es el que también presentó el menor desarrollo radicular (18,50 cm). Existe correlación entre altura de plantas y longitud de raíces, el coeficiente de correlación de Pearson es de 0,82.

El efecto beneficioso de los microorganismos de los tres pisos altitudinales en el desarrollo de las plantas de fresa, varía de acuerdo a la especie vegetal, probablemente por tratarse de microorganismos benéficos diferentes.

En altura de plantas de fresa durante las fases de estudio, se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, las que mostraron mayor altura corresponden al tratamiento T1, con microorganismos benéficos que provienen del piso altitudinal uno, en una concentración de 2,5%. Similares resultados se presentaron en el análisis del diámetro de plantas, las que recibieron aplicación de microorganismos benéficos registraron mayor diámetro que aquellas que no recibieron inoculación de microorganismos, el mayor diámetro se verificó en el tratamiento T1 con microorganismos benéficos del piso altitudinal uno al 2,5% de concentración.

El número de hojas por planta estadísticamente fue diferente entre todos los tratamientos, mayor número de hojas por planta se constató en las plantas del tratamiento T3, cuyos suelos recibieron inoculación de microorganismos benéficos provenientes del piso altitudinal dos al 2,5% de concentración, las plantas del tratamiento testigo presentaron únicamente el 51% de hojas que las plantas del tratamiento de mayor rendimiento.

En relación al crecimiento de raíces se determinó diferencias significativas entre tratamientos, las plantas que recibieron inoculación de microorganismos benéficos presentaron mayor desarrollo radicular que las plantas del tratamiento testigo, la mayor longitud de raíces se verificó en el tratamiento T1, con consorcios microbianos del piso altitudinal uno al 2,5% de concentración. Existe alta relación significativa entre la altura de las plantas y la longitud de las raíces.

Las plantas de fresa de todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, presentaron mejores características morfológicas que las plantas testigo, los aciertos concuerdan con otras investigaciones.

Estudios realizados por [Esitken et al. \(2010\)](#) sugieren que la inoculación de raíces con *Bacillus* M3 solo o en combinación con *Bacillus* OSU-142 o *Pseudomonas* BA-8 tiene el potencial de aumentar el rendimiento, el crecimiento y el contenido nutricional de la planta de fresa, al respecto [Singh et al. \(2011\)](#) indica que la inoculación de consorcios microbianos mejora la condición y salud del suelo, además incrementa el crecimiento de las plantas, así como el rendimiento y calidad de los cultivos.

En las plantas de fresa las rizobacterias promotoras del crecimiento, tienen un potencial para mejorar los factores de rendimiento manteniendo la calidad de los

frutos, pero el efecto es dependiente del cultivar (Kurokura et al., 2017). En la inoculación de plantas de fresa con *Rhizobium* sp. cepa PEPV16, los resultados demuestran que promueve el crecimiento de las plantas con aumentos significativos en el número de estolones, flores y frutos (Flores et al., 2015).

Corroboramos el estudio de Derkowska et al. (2015) que indica que la fertilización con biopreparaciones intensifica el crecimiento del sistema radicular de las plantas de fresa, concordando con la investigación de Sas et al. (2011) que constata un efecto positivo de los biofertilizantes en el crecimiento de la raíz de la fresa y parámetros morfológicos en comparación con las plantas fertilizadas únicamente con NPK. Se destaca el efecto positivo de la inoculación de consorcios microbianos beneficiosos en los suelos.

El uso de microorganismos promotores del crecimiento (PGPM) ayuda a aumentar los rendimientos de los cultivos además de la protección convencional de las plantas (Meena et al., 2016). Las influencias beneficiosas de los microorganismos sobre el desarrollo de las plantas incluyen la fijación de nitrógeno, la adquisición de los principales nutrientes, la promoción del crecimiento de las ramas y las raíces, el control o la supresión de enfermedades y la mejora de la estructura del suelo (Vadakattu, 2012). Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en una serie de transformaciones químicas de los suelos, por lo tanto, influyen en la disponibilidad de macro y micronutrientes para las plantas (Meena et al., 2016).

El efecto benéfico de los microorganismos en el suelo, no se limita a una sola acción, tampoco a un microorganismo en particular, la actividad microbiana en la zona radicular es motivo de investigación permanente para conocer con certeza las diversas interacciones microbianas y el mecanismo mediante el cual cada microorganismo incide el desarrollo de las plantas.

Las rizobacterias tienen la capacidad de promover el desarrollo vegetativo a través de una amplia variedad de mecanismos (García-Fraile et al., 2015), pueden sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios (Bhattacharyya et al., 2016), producen fitohormonas tales como auxinas, citoquininas, giberelinas, el etileno, que logran afectar la proliferación celular en la arquitectura de la raíz por sobreproducción de raíces laterales y pelos radiculares, con un aumento de la absorción de nutrientes y agua (Gupta et al., 2015).

Más del 80% de las bacterias en la rizósfera del suelo son capaces de producir auxinas,

sus efectos sobre el crecimiento de las plantas son notables, afectan principalmente a las raíces, aumentando su tamaño y peso, número de ramificación y la superficie en contacto con el suelo mejorando así la nutrición de las plantas y la capacidad de crecimiento (Jha et al., 2015). Entre los reguladores del crecimiento de las plantas, el ácido indol acético (IAA) es la auxina natural más común que se encuentra en las plantas y su efecto es positivo sobre el crecimiento de las raíces, la biosíntesis implica formación de indol - 3 - ácido pirúvico e indol -3- aldehído acético (Gupta et al., 2015).

La biosíntesis microbiana y el mecanismo fundamental de la acción de las auxinas en la planta han sido objeto de intensa indagación, diversas PGPRs poseen rutas diferentes para la síntesis de IAA, se conocen tres vías dependientes de L-triptófano que se secreta en exudados de raíz como un precursor para la producción de IAA (Goswami et al., 2016). La biosíntesis del ácido indol acético es el mecanismo más común en bacterias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Citoquininas y giberelinas pueden producir las rizobacterias *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodospirillum rubrum*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa* (Gupta et al., 2015).

Varios microorganismos tienen la capacidad de generar reguladores de crecimiento que aprovechan las plantas, el efecto primario de las fitohormonas se refleja en el mayor desarrollo de raíces y parte aérea de los vegetales, el ácido indol acético que es sintetizado por una diversidad de microorganismos es el principal responsable de estas acciones. La inoculación del suelo con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden ser una herramienta prometedora en los sistemas integrados de manejo (Benedetto et al., 2017).

Los consorcios microbianos de especies vegetales de Azuay - Ecuador benefician el crecimiento de las plantas de fresa. Los resultados obtenidos son promisorios para incrementar la producción de alimentos demandados por la población, a la par generar ingresos económicos que contribuyan al bienestar y sustento familiar. Es una práctica sencilla al alcance de todos, sostenible, viable y amigable con el ambiente. Resulta interesante evaluar la incidencia de inoculación de microorganismos benéficos en otros cultivos de interés agrícola.

4. Conclusión

Los consorcios microbianos aislados de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador benefician el desarrollo de plantas de fresa; los efectos son diferentes, acordes a la procedencia de cada grupo microbiano; inciden positivamente en el crecimiento longitudinal, diametral y de raíces, así como también incrementan el número de hojas. Constituyen una alternativa viable para la agricultura orgánica, que conlleve a producir más alimentos y de mejor calidad, protegiendo el ambiente y precautelando la salud de las personas.

Transcurridos 120 días después de iniciado el cultivo, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$), las plantas del tratamiento T1 (con inoculación de consorcio microbiano del piso altitudinal uno, al 2,5% de concentración) presentan mayor altura, diámetro y longitud de raíces, con medias de 15,11 cm; 28,38 cm y 33,00 cm, respectivamente. El número superior de hojas se verifica en las plantas del tratamiento T3 (inoculación con consorcio microbiano del piso altitudinal dos, al 2,5% de concentración) con una media de 54,25 hojas. Las plantas del tratamiento testigo (T8) demuestran el menor valor en todos los atributos medidos.

Es indudable que los microorganismos aislados de especies vegetales e inoculados en el suelo, favorecen el crecimiento de las plantas de fresa, todos los consorcios microbianos no muestran el mismo efecto. Los microorganismos presentan múltiples beneficios para las plantas, la interacción microbiana en el suelo es bastante amplia y los beneficios son evidentes. En un futuro inmediato es relevante estudiar el efecto de estos pequeños organismos en el rendimiento y calidad de la fruta de fresa y en otros cultivos de interés comercial; en otras especies vegetales ubicadas en diferentes pisos altitudinales, amerita estudiar microorganismos con potencial benéfico para la industria, la agricultura y el ambiente. Es de interés comparar las especies de microorganismos de los consorcios microbianos procedentes de la parte aérea de especies vegetales y los obtenidos a nivel del suelo.

Agradecimiento

El primer autor agradece a la Universidad Católica de Cuenca por la beca otorgada para realizar los estudios de PhD en Ingeniería y Ciencias Ambientales en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), en Lima –Perú; al Programa Doctoral en Ingeniería y Ciencias Ambien-

tales adscrita a la Escuela de Post-grado de la UNALM, por la contribución económica para el secuenciamiento molecular de actinomicetos.

Referencias Bibliográficas

- Ahmed, M.; Hussain, M.; Dhar, M.K.; Kaul, S. 2012. Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir. *Journal of Natural Product and Plant Resource* 2(2): 215-220.
- Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters* 32: 1559-1570.
- Benedetto, N.A. Di; Corbo, M.R.; Campaniello, D.; Cataldi, M.P.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M.; Flagella, Z. 2017. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology* 3(3): 413-434.
- Bhattacharyya, P.N.; Goswami, M.P.; Bhattacharyya, L.H. 2016. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. *Journal of Phytology* 8: 26-41.
- Bhattacharjee, R.; Dey, U. 2014. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research* 8(24): 2332-2342.
- Derkowska, E.; Paszt, L.S.; Harbuzov, A.; Sumorok, B. 2015. Root Growth, Mycorrhizal Frequency and Soil Microorganisms in Strawberry as Affected by Biopreparations. *Advances in Microbiology* 5: 65-73.
- Esitken, A.; Yildiz, H.E.; Ercisli, S.; Donmez, M.F.; Turan, M.; Gunes, A. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* 124: 62-66.
- Flores, D.; Marcos, M.; Silva, L.R.; Menéndez, E.; Martínez, E.; Mateos, P.F.; Velázquez, E.; García, P.; Andrade, P.; Rivas, R. 2015. Rhizobium as plant probiotic for strawberry production under microcosm conditions. *Symbiosis* 67(1-3): 25-32.
- García-Fraile, P.; Menéndez, E.; Rivas, R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Bioengineering* 2(3): 183-205.
- Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2: 1-19.
- Gupta, G.; Parihar, S.S.; Ahirwar, N.K.; Snehi, S.K.; Singh, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology* 7(2): 96-102.
- Jha, C.K.; Saraf, M. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development* 5(2): 108-119.
- Kim, K.-H.; Kabir, E.; Ara, S. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* 575: 525-535.
- Kumar, G.; Sarma, B.K. 2016. Eco-friendly Management of Soil-borne Plant Pathogens through Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *SATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue* 20: 167-171.
- Kurokura, T.; Hiraide, S.; Shimamura, Y.; Yamane, K. 2017. PGPR Improves Yield of Strawberry Species under Less-Fertilized Conditions. *Environmental Control in Biology* 55(3): 121-128.
- Laili, N.; Radziah, O.; Zaharah, S. 2017. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Bangladesh Journal of Botany* 46(1): 277-282.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 2004. *Brock Biología de los microorganismos*. Décima Ed. Madrid, Pearson Educación, 1089.
- Meena, V.S.; Meena, R.S.; Verma, J.P.; Maurya, B.R. 2016. Potassium Solubilizing Microorganisms for

- Sustainable Agriculture. 1era Edición, Editorial Springer India. 331 pp.
- Melnyk, M.V.; Grytsyk, AR; Stalyus, L.V. 2015. Research of component composition of *Ruta graveolens* L. herb essential oil. *The Pharma Innovation Journal* 4(2): 36-38.
- Meza, V. 2009. *Curso de Biotecnología Ambiental Avanzada. Doctorado en Ingeniería y Ciencias Ambientales. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú.* 42 pp.
- Mishra, J.; Prakash, J.; Kumar-Arora, N. 2016. Role of Beneficial Soil Microbes in Sustainable Agriculture and Environmental Management. *Climate Change and Environmental Sustainability* 4(2): 137-149.
- Nair, D.N.; Padmavathy, S. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal Article ID 250693*: 1-11.
- Nihorimbere, V.; Ongena, M.; Smargiassi, M.; Thonart, P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2): 327-337.
- Paramanandham, P.; Rajkumari, J.; Pattnaik, S.; Busi, S. 2017. Biocontrol Potential Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* and Tomato Plant Growth Due to Plant Growth-promoting Rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science* 23: 294-303.
- Pineda, A.; Dicke, M.; Pieterse, C.M.; Pozo, M.J. 2013. Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? *Functional Ecology* 27: 574-586.
- Qin, S.; Chen, H.-H.; Zhao, G.-Z.; Li, J.; Zhu, W.-Y.; Xu, L.-H.; Jiang, J.-H.; Li, W.-J. 2012. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Environmental Microbiology Reports* 4(5):522-531.
- Sas, L.; Sumorok, B.; Malusá, E.; Gluszek, S.; Derkowska, E. 2011. The Influence of Bio products on Root Growth and Mycorrhizal occurrence in the Rhizosphere of Strawberry plants 'Elsanta'. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 19(1): 13-34.
- Singh, J.S.; Pandey, V.C.; Singh, D.P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 140: 339-353.
- Singh, D.; Geat, N.; Rajawat, M.V.S.; Prasanna, R.; Saxena, A.K.; Rajeev, K. 2017. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Diazotrophic Bacteria from Wheat Genotypes and their Influence on Plant Growth Promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(4): 1533-1540.
- Tan, G.H.; Nordin, M.S.; Kert, T.L.; Napsiah, A. 2009. Isolation of beneficial microbes from biofertilizer products. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 37(1): 103-109.
- Thakur, S.; Mehta, K.; Sekhar, R.S. 2015. Effect of GA3 and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, yield and fruit quality of strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch cv Chandler. *International Journal of Advanced Research* 3(11): 312-317.
- Trabelsi, D.; Mhamdi, R. 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Research International Article ID 863240*: 1-11.
- Vadakattu, G. 2012. Beneficial microorganisms for sustainable agriculture. *Official Journal of the Australian Society for Microbiology INC* 33(3): 113-115.
- Wilkinson, K.M. 2009. *Nursery Manual for Native Plants: A guide for Tribal Nurseries. Nursery management. Agriculture Handbook 730. Washington, D.C., Forest Service, v.1. p. 247-261.*
- Yadav, I.; Singh, J.; Meena, B.; Singh, P.; Meena, S.; Neware, S.; Patidar, D.K. 2017. Strawberry Yield and Yield Attributes after Application of Plant Growth Regulators and Micronutrients on Cv. Winter Dawn. *Chemical Science Review and Letters* 6(21): 589-594.