



Metodología *in vitro* para estimar los efectos en promoción de crecimiento en suelos bajo manejo integrado de la nutrición

In vitro methodology to estimate the effects on growth promotion in soils under integrated nutrition management

María Carolina Orellana C.^{1,*}; Rodrigo Ortega B.²; María Mercedes Martínez S.³

¹ Agriservice SPA. Rinconada 9139, Vitacura, Santiago, Chile.

² Universidad Técnica Federico Santa María. Departamento de Ingeniería comercial, Campus Santiago, Vitacura, Santiago, Chile.

³ TROPEN-INRES Universität Bonn, Germany.

Received June 22, 2019. Accepted September 25, 2019.

Resumen

Se desarrolló y validó una metodología *in vitro* para estimar los efectos de la promoción del crecimiento radicular de los suelos tratados con materia orgánica e inoculantes microbianos, en cultivos, bajo manejo integrado de la nutrición (MIN), contra datos de experimentos previos. Se preparó un suelo con dos tratamientos: a) Control con aplicación de agua desionizada, y b) MIN, que comprende la aplicación de sustancias húmicas e inoculantes microbianos. Los suelos tratados se incubaron durante 72 horas y se extrajeron usando cinco proporciones de extracción de suelo a agua: 0; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5. Los extractos se analizaron para determinar el pH y la conductividad eléctrica (CE). Las semillas de rábano y trigo se germinaron e irrigaron con cada solución. Se realizaron análisis de varianza, regresión y correlación. La relación de tratamiento y extracción afectó significativamente el pH y la CE de los extractos de suelo. La aplicación de extractos de suelos bajo MIN afectó significativamente el crecimiento de radículas de rábano. El crecimiento de la radícula y el coleóptilo de las semillas de trigo aumentó al aumentar la proporción del suelo en el extracto. El crecimiento máximo se obtuvo con relaciones entre 1: 5 y 2: 5. En los experimentos de validación, el crecimiento de la semilla de trigo se correlacionó significativamente con el contenido de materia orgánica del suelo y la actividad enzimática, lo que confirma que este método es sensible para estimar los efectos promotores del crecimiento.

Palabras clave: metodología *in vitro*; sustancias húmicas; crecimiento radicular; suelo; manejo integrado.

Abstract

An *in vitro* methodology to estimate the effects of root-growth promotion of soils treated with organic matter and microbial inoculants, in crops, under integrated nutrient management (INM), was developed and validated against data from previous experiments. A soil was prepared with two treatments: a) Control with application of deionized water, and b) INM, comprising the application of humic substances and microbial inoculant. Treated soils were incubated for 72 hours and extracted using five soil to water extraction ratios: 0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5. Extracts were analyzed for pH and electrical conductivity (EC). Radish and wheat seeds were germinated and irrigated with each solution. Analysis of Variance, Regression and Correlation analyses were performed. Treatment and extraction ratio significantly affected pH and EC of the soil extracts. The application of extracts from soils under INM significantly affected the growth of radish radicles. The growth of radicle and coleoptile of wheat seeds increased when increasing soil proportion in the extract. Maximum growth was obtained with ratios between 1:5 and 2:5. In validation experiments wheat seed growth significantly correlated with soil organic matter content and enzymatic activity, confirming that this method is sensitive to estimate growth-promoting effects.

Keywords: *In vitro* methodology; humic substances; root growth; soil; integrated management.

How to cite this article:

Orellana, M.C.; Ortega, R.; Martínez, M.M. 2019. Metodología *in vitro* para estimar los efectos en promoción de crecimiento en suelos bajo manejo integrado de la nutrición. Scientia Agropecuaria 10(3): 413 – 422.

* Corresponding author
E-mail: carolina.orellana@agriservice.cl (M. Orellana).

1. Introducción

La aplicación de materia orgánica al suelo produce efectos favorables, tales como incremento en la actividad y diversidad biológica, mayor descomposición, mineralización y humificación, incremento en la agregación de partículas (produciendo mayor porosidad, aireación y estructura); formación de humus y sustancias promotoras de crecimiento vegetal; mayor disponibilidad de nutrientes; incremento de procesos de detoxificación del suelo (a través de la eliminación de sustancias peligrosas); todo lo cual, aumenta la capacidad de retención de agua y la disminución de enfermedades radiculares y nemátodos (Ortega, 2015).

Por otra parte, al agregar materia orgánica al suelo, se producen cambios en las propiedades químicas, como mejoramiento de la capacidad de intercambio catiónico (CIC), regulación del pH, aumento de la capacidad de almacenamiento de nutrientes y capacidad tampón del suelo, o sobre otras propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, estimulando la rizogénesis y capacidad de absorción de nutrientes, que a su vez actúan promoviendo la actividad metabólica en la rizósfera (Martínez et al., 2018; Scotti et al., 2015; Habai et al., 2016) y aumentando la productividad (Öktem et al., 2018; Khan et al., 2018).

La materia orgánica almacena y secuestra el carbono (C) del suelo, fuente única y fundamental de energía para los microorganismos, contribuyendo al mantenimiento o aumento de la actividad biológica, promoviendo los procesos de degradación, mineralización (transformación de compuestos orgánicos en inorgánicos) y humificación, (Martínez, 2013). Los microorganismos, que actúan en la degradación de la materia orgánica del suelo, liberan diversas enzimas, cuya actividad es un valioso indicador para evaluar la calidad del suelo, debido a que están estrechamente relacionadas con la materia orgánica presente, las características físicas, la actividad y biomasa microbiana (Martínez et al., 2010). Las enzimas de suelo proveen de información temprana acerca de cambios en la calidad del suelo y su actividad puede ser cuantificada mediante el uso de técnicas relativamente sencillas (Novo, 2011; Ortega y Gutiérrez, 2013). Por otro lado, los microorganismos del suelo pueden producir hormonas, que estimulan el crecimiento de raíces debido al aumento de la absorción de nutrientes (Jindo et al., 2012; Reardon y Wuest, 2016), además, protegen las raíces y estimulan sus mecanismos de defensa frente a organismos patógenos. La aplica-

ción de rizobacterias, incrementa el vigor, la biomasa, el desarrollo radicular y hasta en un 30% la producción de algunos cultivos de interés comercial (González et al., 2018). Son muchos los géneros microbianos citados en la literatura como promotores de crecimiento vegetal o PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), reconociéndose, por ejemplo, *Pseudomonas sp.*, *Brevundimonas sp.*, en la solubilización de algunos nutrientes poco móviles del suelo, como el fósforo, mejorando su absorción por la planta y otras especies como *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*, y *Ochrobactrum anthropi*, que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, dejándolo disponible para las plantas, lo que contribuye al crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas (Martínez et al., 2010).

La aplicación de inoculantes microbianos, junto a la materia orgánica, potencia muchos de los efectos anteriormente mencionados, y es así como nace el concepto de “Manejo Integrado de la Nutrición” (MIN), en que se involucra la adición de materia orgánica estabilizada, en conjunto con la aplicación de fertilizantes nitrogenados de alta eficiencia, en dosis adecuadas, en conjunto con otros nutrientes de manera balanceada (Ortega, 2015; Habai et al., 2016). El manejo integrado de la nutrición provoca importantes aumentos en rendimiento y calidad de fruta, normalmente explicados por una mayor masa radicular (Ortega y Fernández, 2007; Ortega, 2015; Martínez et al., 2018). El MIN se traduce además en la protección del medio ambiente y la preservación o mejoramiento de la calidad del suelo (Wu y Ma, 2015).

Los efectos de inoculantes, sustancias húmicas, o materia orgánica, son observables solo cuando se emplea la mejor combinación de microorganismos en conjunto con las mejores prácticas de manejo en los sistemas de producción. Dichos efectos se asocian normalmente a compuestos biológicamente activos, como enzimas y hormonas, además de nutrientes liberados a la solución del suelo como producto de la actividad microbiana. No existen metodologías disponibles que sean simples y rápidas de utilizar, a nivel de productor, para evaluar el funcionamiento del suelo en sistemas productivos bajo manejo integrado, en relación con la capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

Este estudio tuvo como objetivo diseñar y evaluar, una metodología simple para estimar los efectos de promoción de crecimiento en suelos bajo manejo integrado de la nutrición (MIN).

2. Materiales y métodos

El método se desarrolló a partir de una muestra de suelo de un huerto de palto (*Persea americana* Mill.), localizado en la comuna de Peumo, en la VI región de Chile, que mostraba una elevada actividad microbiana a nivel de rizósfera, reflejada en una gran cantidad de raíces finas en superficie. Se colectó una muestra compuesta de suelo desde la hilera del cuartel seleccionado. La muestra fue refrigerada y mantenida con humedad de campo. Previo a su utilización el suelo fue tamizado a 5 mm, y homogenizado.

Para aumentar la base de variabilidad, en términos de actividad biológica del suelo, la muestra colectada fue sometida a dos tratamientos:

1. Manejo tradicional, en el cual el suelo fue llevado a capacidad de campo (CDC) a través de la adición de agua desionizada.

2. Manejo integrado, en el cual se aplicaron sustancias húmicas e inoculante microbiano, y luego el suelo fue llevado a capacidad de campo. Los materiales orgánicos correspondieron a una solución al 10% de sustancias húmicas, extraídas desde compost maduro, producido a partir de residuos de uva vinífera, que contenía 0,54% de C, pH de 12,7 y CE de 7,74 dS/m. El inoculante microbiano, correspondió al producto AS071827, de la empresa Agriservice, el cual se obtuvo a partir de microorganismos provenientes de suelos chilenos, compuesto principalmente por grupos funcionales solubilizadores de P y PGPRs (Martínez, 2013).

Los 2 tratamientos fueron aplicados, por triplicado, en frascos que contenían 900 g de suelo con humedad de campo. En ambos casos, los suelos fueron llevados a CDC. Para el tratamiento 2, se consideró una concentración mínima de inoculante en el suelo de 10^6 (UFC)/g (Tabla 1).

Tabla 1

Tratamientos aplicados al suelo para inducir variabilidad en la actividad biológica

Tratamiento	Suelo (g)	Agua (ml)	Sustancias húmicas (ml)	Inoculante (ml)
1	900	60	0	0
2	900	30	20	10

Los suelos tratados se incubaron por 72 h a temperatura ambiente (22 °C), para aumentar la concentración de microorganismos e inducir la producción de principios biológicamente activos y la mineralización de nutrientes, que podrían promover el crecimiento radicular en los tratamientos. Luego del período de incubación, los suelos tratados fueron homogeneizados en recipientes limpios y en forma independiente, para obtener las muestras necesarias para la obtención de

los extractos. Para cada uno de los suelos se utilizaron las siguientes relaciones de extracción agua:suelo: 2:1, 5:1, 10:1, 20:1. Además se adicionó un tratamiento con agua desionizada (Tabla 2).

Tabla 2

Relaciones de extracción utilizadas para los dos tratamientos evaluados

Relación de extracción (agua:suelo)	Suelo (g)	Agua (ml)
2 : 1	50	100
5 : 1	20	100
10 : 1	10	100
20 : 1	5	100
Control (Agua desionizada)	0	100

Las suspensiones de suelo fueron agitadas por 30 min en un agitador recíproco. Posteriormente, se centrifugaron por 5 minutos para obtener los extractos de suelo, a los cuales se les determinó su pH y conductividad eléctrica. Los extractos obtenidos podrían considerarse cercanos a una solución verdadera, en la cual los solutos (nutrientes, sustancias biológicamente activas, etc.) se encuentran disueltos en agua. Para realizar las evaluaciones de promoción de crecimiento, se utilizaron los cultivos de rabanito (*Raphanus sativus* L.), dicotiledónea, y trigo (*Triticum aestivum* L.), monocotiledónea, los cuales, a pesar de ser muy diferentes, se caracterizan por poseer una rápida germinación y desarrollo radicular (Rodríguez, 2012; Shrotri et al., 2012), los tratamientos se evaluaron en duplicado en placas petri. Se sembraron 7 semillas de rabanito o 10 semillas de trigo sobre papel absorbente, las cuales fueron regadas con 10 ml de los extractos de los tratamientos indicados en la Tabla 2. Las variables evaluadas después de 72 a 120 horas de germinación, de acuerdo a cada especie, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Variables evaluadas luego de la germinación en las especies en estudio

Rabanito (120 h)	Trigo (72 h)
Longitud del crecimiento de radícula, en cm	Peso fresco de radículas
% de germinación	Peso fresco de coleoptilo
Peso fresco de radícula	Peso seco de radícula*
Peso seco de radícula*	Peso seco de coleoptilo*
	% de germinación

* Muestras secadas al horno a 65 °C hasta peso constante (Sadzawka et al., 2007).

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones (en duplicado) en un arreglo factorial de dos manejos de suelo (Tradicional e Integrado) y 5 relaciones suelo: agua (0, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,5). Los datos fueron analizados a través de análisis de regresión y ANOVA utilizando GLM en SAS (SAS Institute, 2008).

Los promedios fueron separados utilizando diferencia mínima significativa (LSD) protegida. Los efectos de la relación de extracción fueron modelados a través de análisis de regresión, debido a que se trata de datos continuos.

Se consideró una relación de extracción óptima aquella que maximizara el crecimiento ya sea de radícula y/o coleoptilo. La relación seleccionada (5:1), fue utilizada posteriormente para el proceso de validación.

Los datos para validación provinieron de dos experimentos previos que involucraban el uso de materia orgánica:

a) Experimento de manejo integrado del suelo para la recuperación de perales ubicados en la localidad de Peumo, VI Región (Poblete, 2015). Los datos disponibles eran: crecimiento de brotes, densidad radicular, actividad de la β -glucosidasa, lectura Spad, (medidor de clorofila), NDVI, nutrientes disponibles, pH, materia orgánica, y conductividad eléctrica.

b) Experimento de macetas con maíz como planta indicadora, en donde se aplicaron diferentes fuentes y dosis de materia orgánica para mitigar toxicidad de cobre (Torres, 2013). En este caso, se disponía de los siguientes datos: Producción de materia seca de maíz, contenido de materia orgánica y contenido de cobre extractable. Los suelos con humedad de campo fueron extraídos utilizando una relación agua: suelo 5:1. Junto con ello, se utilizó un control con agua desionizada.

Se utilizaron 10 semillas de trigo por placa, en duplicado, para evaluar los efectos de los extractos obtenidos desde los suelos de los experimentos.

Luego de 3 días, desde la siembra de la semilla, se evaluaron los pesos fresco y seco

de los coleoptilos y las raíces, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento GLM en SAS (SAS Institute, 2008).

Los promedios fueron separados utilizando diferencia mínima significativa (LSD) protegida.

Se utilizó análisis de correlación y regresión entre las variables de crecimiento obtenidas *in vitro* y aquellos datos provenientes de los experimentos de campo. Para ello, se utilizaron los procedimientos PROC CORR y PROC REG en SAS (SAS Institute, 2008).

3. Resultados y discusión

Los resultados se presentan en dos etapas correspondientes al desarrollo del método y a la optimización de éste.

Evaluación y optimización del método

El pH y conductividad eléctrica (CE) de los extractos evaluados fueron significativamente afectados ($p < 0,05$) por el tratamiento aplicado al suelo de palto y la relación de extracción (RE) utilizada, observándose una interacción significativa ($p < 0,05$) tratamiento x RE, solo en el caso de CE (Figura 1). Así, el suelo tratado con manejo integrado (sustancias húmicas + inoculante) presentó un pH más elevado y una CE más alta que el tratamiento tradicional, sin embargo, la diferencia en CE entre ambos tratamientos aumentó al incrementarse la cantidad de suelo en el extracto, lo que explica la interacción.

Por otra parte, el aumento de la proporción de suelo en el extracto incrementó significativamente el pH y la CE de la solución. El máximo de pH se alcanzó con una relación suelo: agua de 0,2 (relación de extracción de 5:1).

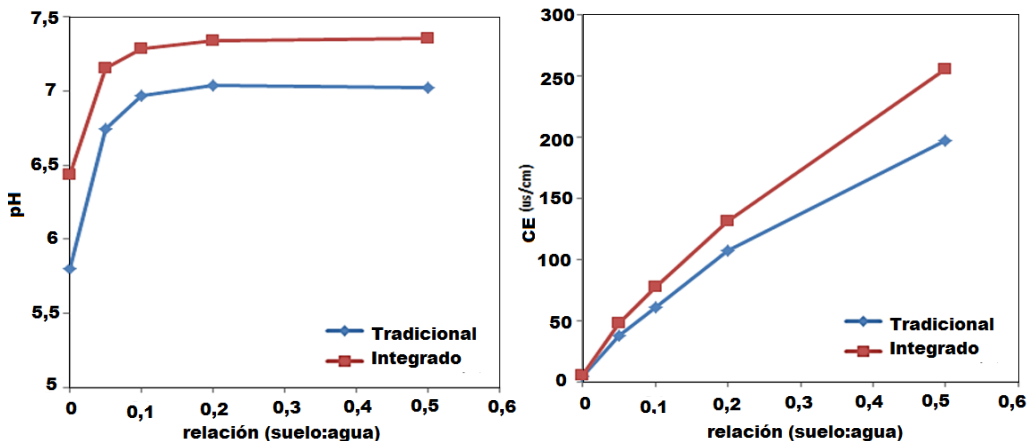


Figura 1. Efecto de la relación de extracción (suelo: agua) y el tratamiento previo del suelo sobre el pH y la CE de la solución.

El aumento de ambas propiedades se debería principalmente a la liberación de nutrientes, particularmente nitratos y otras sales, y algunas bases del suelo. En el caso del manejo integrado, el aumento de pH y la CE también podría deberse a la adición de sustancias húmicas que tienen un pH alcalino y una elevada conductividad eléctrica (Ortega y Fernández, 2007).

Estas soluciones obtenidas no presentarían limitaciones para el crecimiento vegetal, tanto en términos de pH como de conductividad eléctrica (Islam et al., 1980).

Como se esperaba, los tratamientos aplicados al suelo proveniente del cultivo de palto provocaron variabilidad en la respuesta en términos de crecimiento de radícula de rabanito. Así, se observó un efecto significativo ($P < 0,05$) del tratamiento sobre el largo y peso seco de radícula. Al respecto, el tratamiento con MIN (sustancias húmicas e inoculante) provocó un incremento en el largo promedio de radícula, sin embargo, su producción de materia seca fue inferior (Figura 2).

Las raicillas finas poseen una alta proporción de agua, por lo que un mayor largo de raicillas no necesariamente se traduce en una mayor producción de materia seca. Además, pudieron existir diferencias en la cantidad de raicillas secundarias que se desarrollaron. (Canellas et al., 2008).

La relación de extracción no afectó significativamente la respuesta en términos de crecimiento de radícula en ninguna de las variables evaluadas, lo que significa que no habría efectos de promoción de crecimiento en los tratamientos con suelo en comparación al del agua desionizada.

Por otra parte, puede ser que el rabanito no sea una especie lo suficientemente sensi-

ble para responder a diferencias en concentración de nutrientes y otras posibles sustancias estimulantes de crecimiento, sin embargo, esta explicación se contradice con el hecho de que el rabanito se utiliza para pruebas de toxicidad de materiales orgánicos (Prieto et al., 2009).

Así mismo, es posible que las diferencias en composición química entre las soluciones obtenidas y las diferentes relaciones de extracción, no fueran significativas como para provocar efectos sobre el crecimiento inicial. Esta hipótesis se rechaza al existir diferencias significativas entre los manejos de suelo en términos de pH y CE (Canellas et al., 2008).

Producto de estos resultados, se decidió utilizar una segunda especie (*Triticum aestivum* L.) para determinar las relaciones de extracción óptimas.

Esta evaluación se realizó a las 72 y 120 horas de germinación, respectivamente, de manera de determinar si el tiempo de evaluación influenciaba la respuesta a los distintos tratamientos.

El análisis de regresión permitió determinar efectos significativos de la relación de extracción sobre el peso fresco y seco de raíces y coleoptilo (Figura 3). La relación de extracción óptima (aquella que maximiza crecimiento) varió entre 0.21 y 0.36, es decir, relaciones agua:suelo de 5:1 a 5:2.

Los efectos observados en términos de crecimiento concuerdan con aquellos determinados por otros autores (Martínez et al., 2010) y podrían ser atribuidos a nutrientes y otras sustancias promotoras de crecimiento, que aumentan su concentración en solución con el incremento de la proporción de suelo en la extracción.

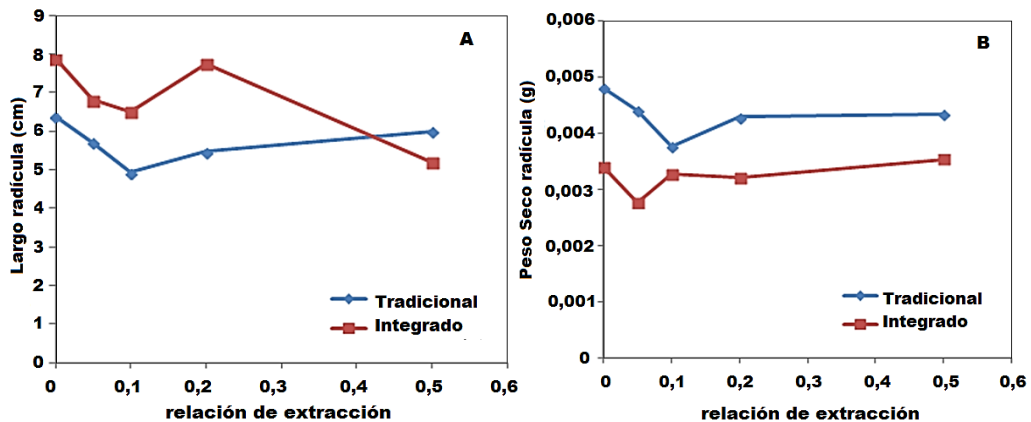


Figura 2. Efecto de las diferentes relaciones de extracción sobre el crecimiento de radícula. (A) Largo de radícula. (B) Peso seco de radículas.

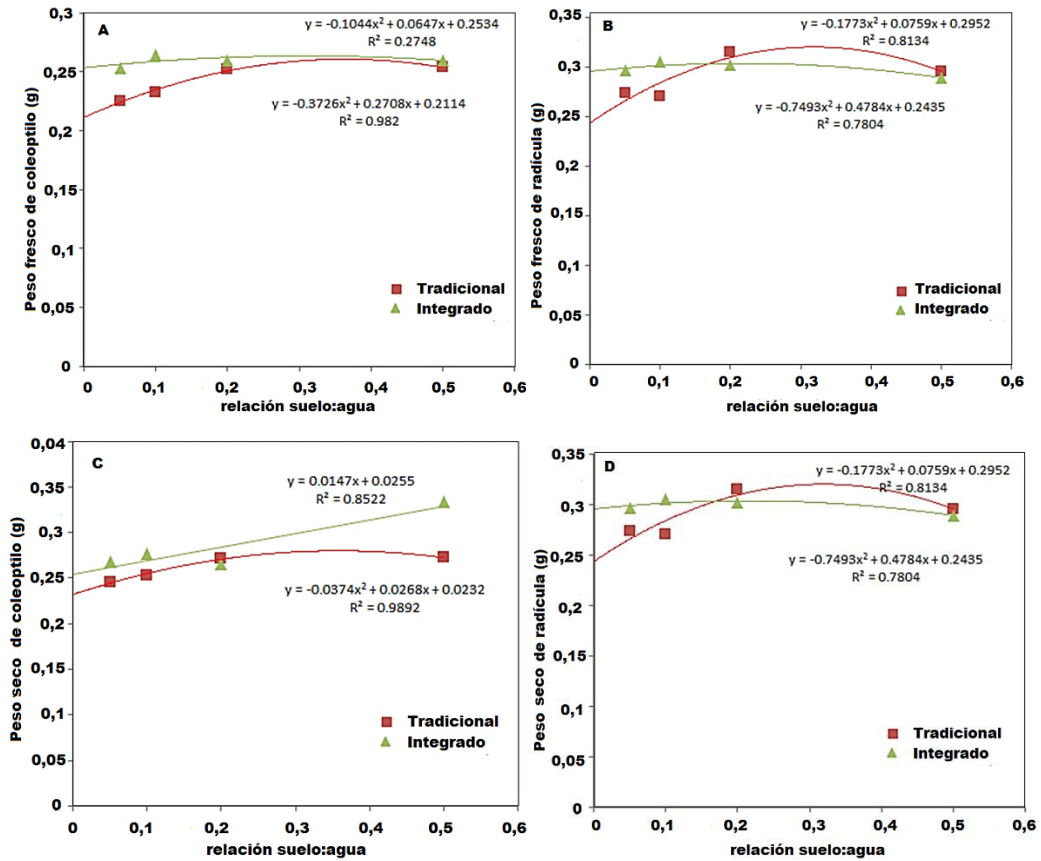


Figura 3. Efecto de la relación de extracción y el manejo del suelo en el crecimiento de trigo durante el proceso de germinación, medido a los 3 días después de establecimiento (DDE). A) peso fresco coleoptilo; B) peso fresco radícula; C) peso seco coleoptilo; D) peso seco radícula.

La tendencia a mayores crecimientos con la adición de sustancias húmicas (SH) e inoculante, podría deberse a efectos de las SH per se (*hormone like*), como también al efecto de inoculante, que podría aumentar el ciclaje de materia orgánica liberando nutrientes y otras sustancias promotoras de crecimiento (Martínez, 2013; Ortega, 2015; Canellas et al., 2019).

Por otra parte, todas las cepas microbianas presentes en el inoculante AS071827 han sido descritas como PGPR, rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. Además, es reconocido por su alta capacidad de solubilizar fósforo (Martínez, 2013). Este efecto promotor de crecimiento de las rizobacterias también fue observado por Alori (2019) en maíz y Gutiérrez-Mañero et al. (2008), con aislamientos de *B. pumillus* y *B. licheniformis* obtenidos a partir de rizosfera de *Alnus glutinosa* [L.] Gaertn., en que indicaron la producción de giberelinas. Igualmente, Prashanth y Mathivanan (2009), aislaron una cepa de *B. licheniformis* a partir de rizósfera de carozos que mostró un incremento en la colonización de ésta por poblaciones microbianas y un aumento significativo de los parámetros de germina-

ción y crecimiento de radícula en la misma planta. Si bien no mostro importante efecto sobre la solubilización de P, se demostró que produce ácido indol acético (AIA), con un máximo de 23 µg/ml en condiciones de cultivo ideales.

En relación con *Pseudomonas sp.*, existe numerosa literatura respecto a la acción de este género bacteriano como PGPR, debido a la producción de sideroforos (moléculas activas en la solubilización de compuestos de Fe), pero también por la producción directa de fitohormonas. Mohamed y Goma (2012), trabajando con cepas de *Pseudomonas sp.*, en semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.), demostraron no solo la producción de AIA y GA₃, sino el incremento en el peso fresco y seco de raíces y hojas, pigmentos fotosintéticos, contenido de prolina y contenido total de aminoácidos y proteína cruda, comparado con plantas no inoculadas, bajo condiciones de stress salino. La inoculación, también incrementó los contenidos de N, P, K, Ca, and Mg y disminuyó los de Na y Cl, contribuyendo en parte a la activación de procesos involucrados con la reducción del efecto por sales.

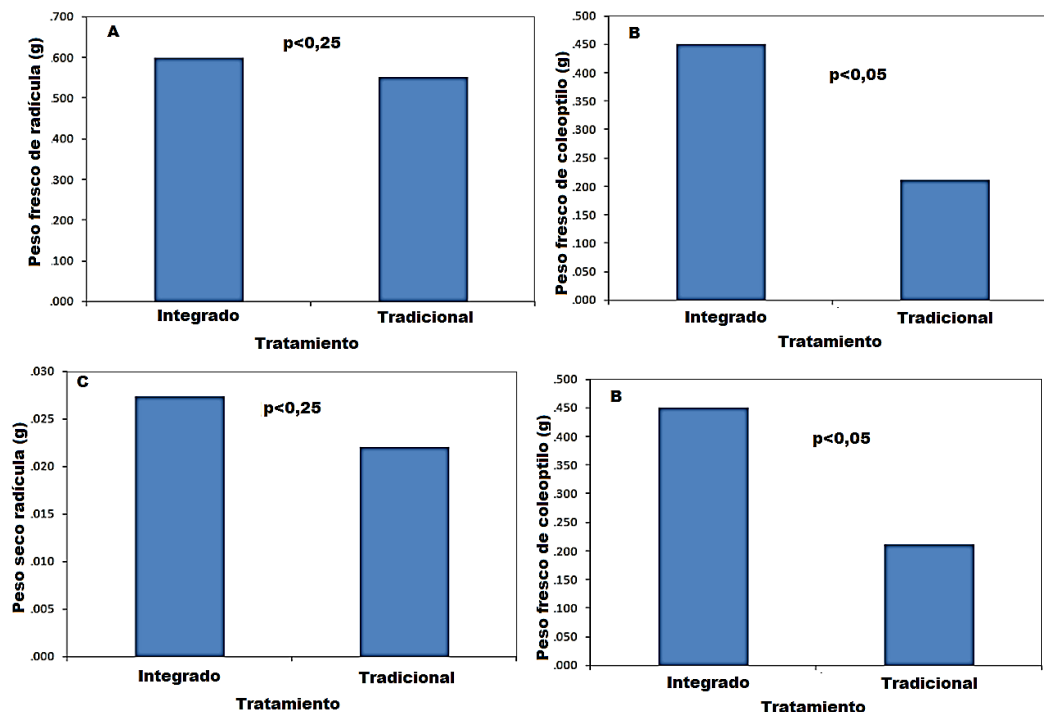


Figura 4. Efecto del manejo de suelo sobre crecimiento de radícula y coleoptilo de trigo evaluados con una relación suelo:agua de 0.2. A) peso fresco radícula, B) peso fresco coleóptilo, C) peso seco radícula, D) peso seco coleóptilo.

El análisis de varianza reveló efectos significativos ($P < 0,05$) solo del manejo del suelo sobre el peso fresco de radícula, no observándose efectos de la relación de extracción (RE) ni de la interacción manejo x RE, en ninguna otra variable medida. Sin embargo, al realizar un análisis visual de los datos se observaron claras tendencias: Por ejemplo, en los casos de peso fresco de radículas y coleoptilos, los mayores crecimientos se obtuvieron con relaciones suelo:agua, de entre 0,05 y 0,1. Por otra parte, en el caso de peso seco de coleoptilos, los mayores valores se obtuvieron con una relación suelo:agua de 0,2.

Dados los resultados obtenidos a las 72 y 120 h de evaluación y el hecho de que normalmente para medir pH y CE en materiales orgánicos se utiliza una relación suelo:agua de 0,2 (relación 5:1), se determinó utilizar dicha relación para la validación del método desarrollado.

La relación suelo:agua de 0,2 (relación 5:1) seleccionada mostró una apropiada sensibilidad para detectar diferencias entre los manejos aplicados a nivel de campo. Así, por ejemplo, el peso fresco de coleoptilos y radículas tendió a ser superior en el tratamiento con MIN, en comparación al tradicional. Similares resultados se obtuvieron para el peso seco de ambos tejidos, aunque en este caso el manejo integrado mostró crecimientos estadísticamente superiores

al tratamiento con agua desionizada (Figura 4).

Validación del método con datos de experimentos de campo

Experimento de MIN en Perales (Poblete, 2015)

Al realizar un análisis de correlación entre las variables medidas en campo (Poblete, 2015) y el crecimiento de radículas y coleptilos obtenidas con los extractos de suelo de dichos tratamientos, se encontraron relaciones altamente significativas (Tabla 4). El crecimiento temprano de semillas de trigo regadas con extractos de suelo correlacionó positivamente con la actividad de β -glucosidasa, con la densidad radicular de los perales en terreno y el verdor de los tejidos medidos con clorófilómetro, entre otros, demostrando que el método desarrollado posee una buena sensibilidad para predecir diferencias entre tratamientos de suelo a nivel de campo (Figura 5).

La actividad de la enzima β -glucosidasa, a nivel de campo, determinada en el estudio de Poblete (2015) se utiliza como indicador para evaluar la calidad del suelo, ya que relaciona directamente con el contenido de la fracción orgánica de carbono del suelo, y el contenido de C lábil que será utilizado como fuente de energía y C activando la biomasa microbiana presente en el suelo (Scotti *et al.*, 2015).

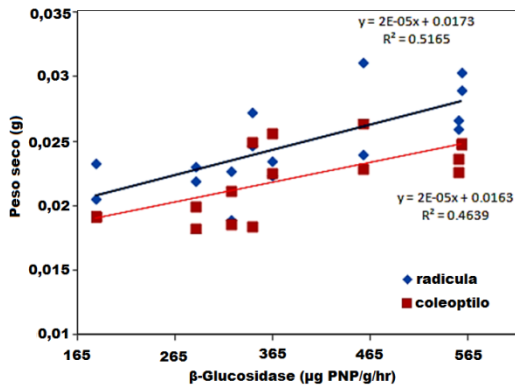


Figura 5. Relación entre actividad de β- glucosidasa en el experimento de campo de Poblete (2015), y peso seco de radícula y coleoptilo en la evaluación *in vitro*.

La actividad se ve inhibida por la presencia de metales pesados como Cu y Cd y se emplea como un indicador temprano en los cambios de las propiedades del suelo debido a las diferentes prácticas de manejo (Martínez et al., 2018).

Tabla 4

Correlación entre mediciones en campo y crecimiento de radículas y coleoptilos *in vitro*, empleando extracto de suelo de peral (Poblete, 2015)

	Coleoptilo		Radícula	
	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Peso fresco coleoptilo	1,00	-	-	-
Peso fresco radícula	0,43	-	1,00	-
Peso seco coleoptilo	0,33	1,00	0,52	-
Peso seco radícula	0,49	0,77	0,25	1,00
Crecimiento de brote 1*	0,22	0,69	0,19	0,67
Crecimiento de brote 2*	0,30	0,68	0,24	0,74
Peso de poda*	-0,10	0,65	0,14	0,57
Densidad radicular 1*	0,71	0,46	0,40	0,58
Spad*	0,56	0,35	0,20	0,72
NDVI 1*	0,55	0,50	0,16	0,71
N foliar*	-0,71	0,08	-0,18	-0,06
P foliar*	-0,08	-0,30	0,10	-0,71
β-glucosidasa 1*	0,13	0,68	0,21	0,72
Densidad aparente*	-0,74	-0,44	-0,42	-0,59
Conductividad eléctrica*	0,70	0,54	0,43	0,74
Materia orgánica*	0,81	0,43	0,37	0,69
β-glucosidasa *	0,80	0,43	0,34	0,70
Recuento de levaduras*	-0,03	0,58	0,09	0,74
Nitrógeno disponible*	0,69	0,62	0,39	0,80
P-Olsen*	0,70	0,43	0,33	0,62

*variables medidas en condiciones de campo 1NDVI: normalized difference vegetation index.

La actividad de la enzima β-glucosidasa, a nivel de campo, determinada en el estudio de Poblete (2015) se utiliza como indicador

para evaluar la calidad del suelo, ya que relaciona directamente con el contenido de la fracción orgánica de carbono del suelo, y el contenido de C lábil que será utilizado como fuente de energía y C activando la biomasa microbiana presente en el suelo (Scotti et al., 2015). La actividad se ve inhibida por la presencia de metales pesados como Cu y Cd y se emplea como un indicador temprano en los cambios de las propiedades del suelo debido a las diferentes prácticas de manejo (Martínez et al., 2018).

Experimento de secuestro de Cu con adiciones de materia orgánica en maceteros (Torres, 2013)

Se observaron diferencias significativas (p < 0,05), en crecimiento de coleoptilo y radícula entre los extractos de suelo producidos por la adición de distintas fuentes de materia orgánica evaluadas por Torres (2013) en su estudio de enmiendas orgánicas (Figura 6). Estos resultados indican que el crecimiento inicial de radícula y coleoptilo son suficientemente sensibles como variables respuesta para detectar diferencias entre tratamientos que han recibido enmiendas orgánicas. Esto coincide con lo señalado por Martínez et al. (2010) en el sentido que las enmiendas orgánicas producen un incremento del desarrollo radicular.

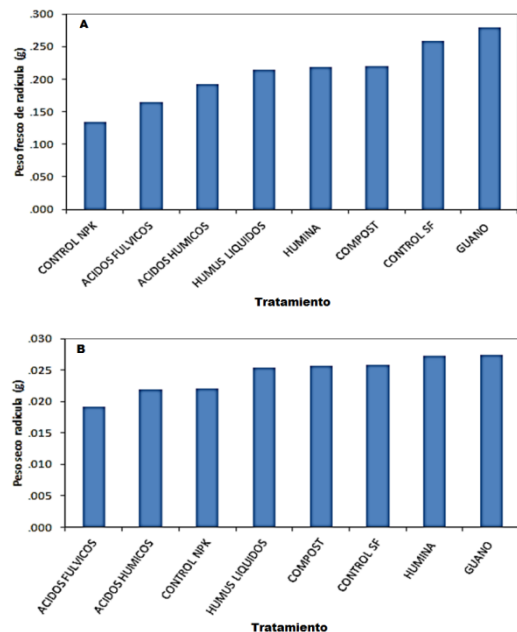


Figura 6. Efecto de extractos de suelo de los tratamientos en maíz (Torres, 2013), sobre el crecimiento de radícula de trigo (A) Peso fresco de radícula. (B) Peso seco de radícula.

El análisis de correlación realizado entre las variables medidas por Torres (2013) y el

crecimiento de radícula y coleoptilo a las 120 h de germinación de semillas regadas con extractos de suelo obtenidos en relación suelo:agua de 1:5, reveló que el peso fresco y seco de radícula correlacionaron positiva y significativamente ($p < 0,05$) con el contenido de materia orgánica y la actividad de la enzima deshidrogenasa. Por otra parte, el peso seco de radícula correlacionó inversamente con la conductividad eléctrica del suelo, lo que es esperable, aunque los niveles de CE de los extractos, a la relación de extracción utilizada (5:1), fueron en general bajos.

La actividad de la enzima deshidrogenasa, es un excelente indicador biológico, ya que se encuentra estrechamente relacionado con la actividad microorganismos viables. Es considerada un indicador de la calidad del suelo ya que forma parte del sistema de transporte de electrones del metabolismo aerobio y se expresa en ambientes intracelulares activos (Martínez et al., 2010).

4. Conclusiones

En el estudio inicial para desarrollar el método propuesto, las propiedades químicas de los extractos de suelo fueron afectadas significativamente por la aplicación de sustancias húmicas e inoculantes y la relación de extracción.

La aplicación de sustancias húmicas e inoculante afectó significativamente el crecimiento de radículas de rabanito, independiente de la relación de extracción utilizada.

Los máximos crecimientos se obtuvieron con relaciones de extracción entre 5:1 y 5:2, dependiendo de la variable utilizada.

En los experimentos de validación, el crecimiento temprano de semillas de trigo, regadas con extractos de suelo en relación 5:1, fue afectado significativamente por los tratamientos de materia orgánica aplicados, lo que indica una buena sensibilidad del método para detectar cambios derivados del manejo del suelo.

El crecimiento de radícula y coleoptilo correlacionaron significativamente con los contenidos de materia orgánica del suelo y la actividad enzimática del mismo, confirmando que el método desarrollado permite estimar efectos de promoción de crecimiento de manera simple y con bajo costo.

La metodología *in vitro* desarrollada es una herramienta útil para estimar los efectos de promoción de crecimiento vegetal, en suelos bajo manejo integrado, a nivel de campo. Se recomienda continuar evaluando la metodología a nivel de campo, como también aplicarla en otras especies como

cultivos de prueba (maíz, alfalfa, lechuga, etc.).

La metodología desarrollada se resume de la siguiente manera:

- Tomar una muestra de suelo compuesta, representativa de los tratamientos que se desean evaluar
- Preparar un extracto en una relación suelo:agua de 1:5 v/v o p/p. Utilizar 20 gramos de suelo por 100 ml de agua desionizada
- Germinar 10 semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) o rabanitos (*Raphanus sativus* L.) en papel absorbente, por cada tratamiento evaluado más un control con agua desionizada.
- Regar con 10 ml de extracto de suelo
- Incubar en oscuridad por 72 horas a temperaturas entre 18 y 22 °C
- Medir el largo de radícula y coleóptilo de cada semilla.

Comparar estadísticamente los tratamientos.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), con el Número de Proyecto 1130975.

Referencias bibliográficas

- Alori, E.; Babalola, O.; Prigent-Combaret, C. 2019. Impacts of Microbial Inoculants on the Growth and Yield of Maize Plant. *The Open Agriculture Journal* 13: 1-8.
- Canellas, L.P.; Teixeira Junior, L.R.L; Dobbss, L.B.; Silva, C.A; Medici, L.O.; Zandonadi, D.B.; Façanha, A.R. 2008. Humic acids cross-interactions with root and organic acids. *Ann Appl Biol.* 153(2): 157-166.
- Canellas, L., Olivares, F., Canellas, N., Mazzei, P.; Piccolo, A. 2019. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2019. 6:3.
- González, G., Espinoza, B., Cano, P., Moreno, A., Leos, L., Sánchez, H. y Sáenz, J. 2018. Influencia de rizobacterias en la producción y calidad nutracéutica de tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(2): 367-369.
- Gutiérrez-Mañero, F.; Ramos-Solano, B.; Probanza, A.; Mehrouachi, J.; Tadeo, F.; Talon, M. 2011. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins *Physiologia Plantarum* 111(2): 206-211.
- Habai, R.; Nwakaego, V.; Deusdedit, P.; Odeh, I.; Singh, A.; Buchan, D.; De Neve, S. 2016. Nitrogen mineralization dynamics of different valuable organic amendments commonly used in agriculture. *Applied Soil Ecology* 101: 185-193.

- Islam, S.; Edwards, D.; Asher, C. 1980. pH optima for crop growth. *Plant and soil* 54(3): 339–357.
- Jindo, K.; Aparecida, S.; Cantero, E.; Pérez-Alfocea, F.; Hernández, M.T.; García Izquierdo, C.; Oliveira, N.; Pasqualoto, L. 2012. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*. 353 (1–2): 209–220
- Khan, R.; Khan, M., Khan, A.; Hussain F.; Jan, I. 2018. Effect of humic acid on growth and crop nutrient status of wheat on two different soils. *Journal of Plant Nutrition*. 41 (4): 453–460.
- Martínez, M.M., Gutiérrez, V.; Novo, R. 2010. *Microbiología Aplicada al Manejo Sostenible de Suelos y Cultivos*. Universidad Técnica Federico Santa María, Santiago, Chile. 235 pp.
- Martínez, M.M. 2013. Ficha técnica inoculante AS071827. 2p.
- Martínez, M.; Ortega, R.; Fincheira, P. 2018. Use of organic amendments in table grape: effect on plant root system and soil quality indicators. *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 18(1): 100–112.
- Mohamed, H.; Goma, E. 2012. Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica* 50(2): 263–272.
- Novo, R. 2011. Microorganismos beneficios de suelo. *Proceedings II Simposio Internacional materia Organica y Sustentabilidad de suelos*. Universidad Federico Santa María. Santiago de Chile.
- Öktem, A.; Celik, A.; Gülgün, A. 2018. Effect of humic acid seed treatment on yield and some yield characteristic of corn plant (*Zea mays* L. indentata). 3rd International Symposium for Agriculture and Food – ISAF 2017. *Journal of agricultural, foods and environmental sciences* 72(2): 142–147.
- Ortega, R. 2015. Integrated nutrient management in conventional intensive horticulture production systems. *Acta Hort. (ISHS)* 1076: 159–164.
- Ortega, R.; Gutiérrez, V. 2013. ¿Cuáles son y cómo elegir las herramientas de diagnóstico para el desarrollo de programas de manejo integrado de la nutrición? *Revista Mundoagro*, Chile 47: 50–53.
- Ortega, R.; Fernández, M. 2007. Agronomic evaluation of liquid humus derived from earthworm humic substances. *Journal of Plant Nutrition* 30: 2091–2104.
- Poblete, H.; Martínez, M.; Ortega, R. 2015. Integrated plant nutrition on the recovery of a pear (*pyrus communis* 'packam's triumph') orchard. *Acta Hort.* 1076: 179–186.
- Prashanth, S.; Mathivanan, N. 2009. Growth promotion of groundnut by IAA producing rhizobacteria *Bacillus licheniformis* MML-2501. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43(2): 191–208.
- Prieto, J.; González, C.; Román, A.; Prieto, F. 2009. Contaminación y Fitotoxicidad en plantas en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. 10(1): 29–44.
- Reardon, C.; Wuest, S. 2016. Soil amendments yield persisting effects on the microbial communities- a 7-year study. *Applied Soil Ecology* 101: 197–116.
- Rodríguez, C. 2012. *Producción de Biogás a partir del Bagazo Cervecerero*. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 40 pp.
- Sadzawka, A.; Carrasco, M.A.; Demanet, R.; Flores, H.; Grez, R.; Mora, M.; Neaman, A. 2007. *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. Segunda Edición. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Santiago, Chile.
- SAS Institute. 2008. *SAS/STAT®9.2. User's Guide The GLM Procedure (Book Excerpt)*. SAS.
- Scotti, R.; Bonanomi, G.; Scelza, R.; Zoina, A.; Rao, M. 2015. Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of soil science and plant nutrition* 15: 333–352.
- Shrotri, C.K.; Shrotri, K.; Jain, R. 2012. Biostimulatory effect of shilajeet on wheat (*Triticum aestivum*) seed germination. *Jour. Biol. Agric. and Healthcare* 2(5): 34–40.
- Torres, A.B.; Molina, M.; Ortega, R. 2015. Growth and dry matter yield of maize (*Zea mays* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants as affected by the application of liquid and solid organic amendments in a cu contaminated soil. *Acta Hort.* 1076: 233–239.
- Wu, W.; Ma, B. 2015. Integrated nutrient management (INM) for sustaining crop productivity and reducing environmental impact: A review. *Science of the Total Environment* 512: 415–427.