

CAPÍTULO

11



Evaluación del crecimiento y producción de plantas de papa (*Solanum tuberosum*)

inoculadas
con bacterias
solubilizadoras
de fósforo

POR

Diego LEÓN TAPIA

María Rosa MOSQUERA LOSADA

Luis ROCA PÉREZ

Introducción

El cultivo de papa es de gran importancia en muchos países, siendo uno de los más importantes tras los cultivos de cereales. En Ecuador se encuentra entre los 10 cultivos con mayor producción y la región de Carchi es una de las principales productoras nacionales. Desde el punto de vista agronómico, este cultivo requiere una elevada fertilización por fósforo para que su producción sea satisfactoria (Hanif et al., 2015).

El fósforo (en adelante, P) es uno de los principales macronutrientes y se encuentra poco disponible para las plantas, ya que puede fijarse con el calcio o magnesio en los suelos calizos o al hierro o aluminio en los suelos ácidos. De forma natural, las bacterias solubilizadoras de este macronutriente pueden solubilizar las formas insolubles de P liberándolo a la solución del suelo y así ser absorbido por las plantas (Liu et al., 2015). Estos microorganismos pueden ser usados como inoculantes para incrementar el fósforo disponible para las plantas (Olivera et al., 2009).

La inoculación de microorganismos es una práctica que ha aumentado en la agricultura durante los últimos años debido a los problemas que genera el manejo de fertilizantes de la agricultura tradicional, y estos se consideran biofertilizantes o bioestimulantes. Los biofertilizantes contienen organismos vivos que aplicados a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, favorecen el aporte de nutrientes incrementando la absorción por las plantas. En el caso concreto de bacterias existen algunas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y otras son capaces de solubilizar el fósforo orgánico e inorgánico y el potasio de los suelos (Calvo et al., 2014).

Diferentes estudios de inoculación con bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) han puesto de manifiesto los efectos positivos sobre el crecimiento de manzano (Kureka, et al., 2013) y el de *Sorghum bicolor* (Srinivasan et al., 2012), el incremento en la elongación de la raíz y del tallo, así como el peso y el contenido de P en plantas de tomate (Hariprasad and Niranjana, 2009), el peso de la raíz y tallo en plantas de arroz (Da costa et al., 2015), en plantas de maíz, el aumento de la concentración de P en raíz y tallos y la biomasa seca frente al control no inoculado (Pereira et al., 2014).

En el caso del cultivo de papa, las plantas que fueron inoculadas con solubilizadores de fósforo reportaron efectos positivos tales como los siguientes: cepas de *Bacillus subtilis* incrementaron la longitud y peso del cociente raíz/tallo con respecto al control no inoculado (Hanif et al., 2015), cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* podrían ser utilizadas como biofertilizantes en suelos alcalinos con altas concentraciones de sales y temperatura (Behbahani, 2010), cepas del género *Azospirillum* aumentaron el rendimiento del cultivo y disminuyó en ellas la incidencia de enfermedades fúngicas cuando se aplicaba como biofertilizante (Castillo, 2016). Pese a que se han citado experiencias positivas de inoculación, se debe hacer mención a que la eficacia de los microorganismos solubilizadores de P depende del nivel de adaptación al medio ambiente del suelo donde se aplican y a su capacidad para competir, colonizar, sobrevivir y proliferar en la rizosfera (Adhya, et al., 2015).

El abuso en la aplicación de fertilizantes inorgánicos por parte de los agricultores es un problema mundial por los problemas generados de degradación de los suelos debido al incremento de los metales pesados y a la salinización. La provincia de Carchi (Ecuador) no es una excepción a estas prácticas, de modo que una posible alternativa a los fertilizantes convencionales es la aplicación de biofertilizantes empleando especies de microorganismos aisladas en el área donde posteriormente se establecerá el cultivo a biofertilizar.

En función de lo comentado anteriormente, los ensayos de inoculación de BSP que se presentan en el presente estudio son de gran importancia, ya que pueden dar origen al desarrollo de una industria biotecnológica en la región para producir biofertilizante, además de disminuir el grado de contaminación que presentan las zonas de cultivos de papa en Carchi por el exceso fertilizantes convencionales usados por el agricultor. El objeto principal de este trabajo consiste en estudiar el efecto de la inoculación de bacterias solubilizadoras de P sobre el crecimiento de las plantas de papa y su rendimiento productivo.

Materiales y métodos

Material biológico, sustrato utilizado y tratamientos aplicados

Las cepas bacterianas proceden de suelos con distintos usos en la provincia de Carchi y se aislaron en medio cultivo agar Pikovskaya. El aislamiento de bacterias que presentaban un claro halo de solubilización se cultivó en medio de cultivo líquido King B. Los medios de cultivos se centrifugaron en tubos falcón de 50 ml estériles a 5000 × rpm durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en medio de cultivo líquido King B hasta obtener una concentración final de $5,02 \times 10^8$ UFC ml⁻¹. Finalmente, las bacterias sedimentadas se volvieron a suspender en agua estéril para obtener una concentración final de 10^8 UFC ml⁻¹, con la cual se procedió a la inoculación de la semilla de papa.

Las cepas fueron identificadas por técnicas de biología molecular por la empresa D. Bioprospecting Excellence, S.L (Valencia, España). Todas las cepas pertenecen al género *Pseudomonas* y fueron aisladas en suelo forestal en el cantón Espejo (SN112) y en suelo de rotación de cultivos (papa y haba) cantón Huaca (SR321, SR322 y SR324). Las variedades de semilla de papa inoculadas fueron Superchola (Experimento 1) e INIAP-Libertad (Experimento 2).

Los suelos utilizados proceden de cultivos de papa en los cantones de Espejo, Huaca y Montufar, presentando todos ellos valores de pH (en agua) inferiores a 6, conductividad eléctrica entre 0.25-0.30 dSm⁻¹ y materia orgánica entre 5 y 19%.

La semilla de papa inoculada se sembró en macetas de 30 cm de diámetro x 40 cm de altura, y la cantidad de suelo añadida era de aproximadamente 30 kg. Las plantas se desarrollaron en los invernaderos de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, sede

Ibarra, las condiciones ambientales fueron de una temperatura promedio de 19.4 °C, con 12 horas de luz y 68% de humedad media, datos que fueron obtenidos a través de un sensor marca HOBO Pro v2. El riego se efectuó por capilaridad dos veces por semana.

Los experimentos llevados a cabo, que se detallan a continuación, consistían en 6 tratamientos: 4 inoculaciones de cepas bacterianas aisladas e identificadas (SN112, SR321, SR322 y SR324), 1 control o absoluto (se adiciona únicamente agua) y 1 control con fertilización. En el control con fertilización, la dosis fue de 16g por planta de la mezcla de fertilizante 8-20-20 y 10-30-10. En ambos experimentos, una vez cosechado se determinó la longitud, diámetro, peso de tallo y raíces en fresco y seco, además del rendimiento, para lo cual las plantas se retiraron cuidadosamente de las macetas procediendo posteriormente a lavarlas para eliminar las partículas del suelo y restos orgánicos de las raíces.

Experimento 1

Para cada tratamiento se utilizaron suelos de cultivo de papa de los tres cantones anteriormente mencionados, con 3 repeticiones cada uno, en total 9 repeticiones por tratamiento, tanto para esterilizado como no esterilizado. Previamente a la siembra, a cada tubérculo de 30 g de peso con dos brotes cada uno se inoculó por inmersión durante 1 hora a temperatura ambiente las cepas correspondientes a cada tratamiento, con una concentración de 1.6×10^8 UFCml⁻¹. Las plantas se cosecharon a los 120 días después de la siembra.

Experimento 2

En este experimento se aplicaron los mismos tratamientos, pero únicamente con 5 repeticiones cada uno, en total, 15 repeticiones por tratamiento. Previamente a la siembra se inoculó a cada tubérculo de aproximadamente 10 g con 2 brotes, por inmersión durante 1 hora a temperatura ambiente, las cepas correspondientes a cada tratamiento con una concentración de 1.6×10^8 UFCml⁻¹. Las plantas se cosecharon 60 días después de la siembra.

Análisis estadístico

Con el fin de estudiar el efecto de los tratamientos aplicados sobre las variables biométricas determinadas en la papa se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos mediante el programa R Project; posteriormente se utilizó la prueba post-hoc de Tukey a un nivel de significación de $p < 0.05$. Las variables analizadas fueron sometidas a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y a la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de las varianzas, únicamente en el ensayo 1 y 2, las variables longitud de raíz y longitud de tallo se sometieron a una transformación logarítmica con el fin de que tuvieran una distribución normal.

Resultados y discusión

Peso raíz y tallo

Los resultados del experimento 1 (FIGURA 1A) obtenidos al determinar el peso fresco y seco de la raíz, en la prueba de ANOVA mostraron diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,001$ fresco y $p < 0,003$ seco), con un coeficiente de variación de 24 % y 23 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de cinco grupos, de los cuales se puede establecer que la cepa SN112 presentaba el mayor peso radicular en fresco (45,4 g) y en seco (18,6 g) para todos los tratamientos efectuados, siendo significativamente diferente a los tratamientos de inoculación con las cepas SR322 y SR324; sin embargo, en el experimento 2 (FIGURA 1B) para peso fresco y seco de la raíz, en la prueba de ANOVA mostraron diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,0001$ fresco y $p < 0,0003$ seco), con un coeficiente de variación de 21 % y 22 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de tres grupos, los valores más elevados en fresco (4,3 y 4,1 g) y en seco (0,92 y 0,89 g) se obtuvieron para la cepa SR324 y SN112 respectivamente.

Estos datos indican que las plantas inoculadas con la cepa SN112 presentan un mayor desarrollo de las raíces en ambos experimentos; sin embargo, estas diferencias no son significativas con respecto al control, por tanto no se puede concluir que el inóculo SN112 esté favoreciendo de forma evidente el desarrollo radicular, aunque sí se observa una tendencia. Las diferencias en el peso de la raíz en ambos experimentos (1 y 2) estarían relacionadas con la diferencia en el tiempo de la cosecha 120 frente a 60 días.

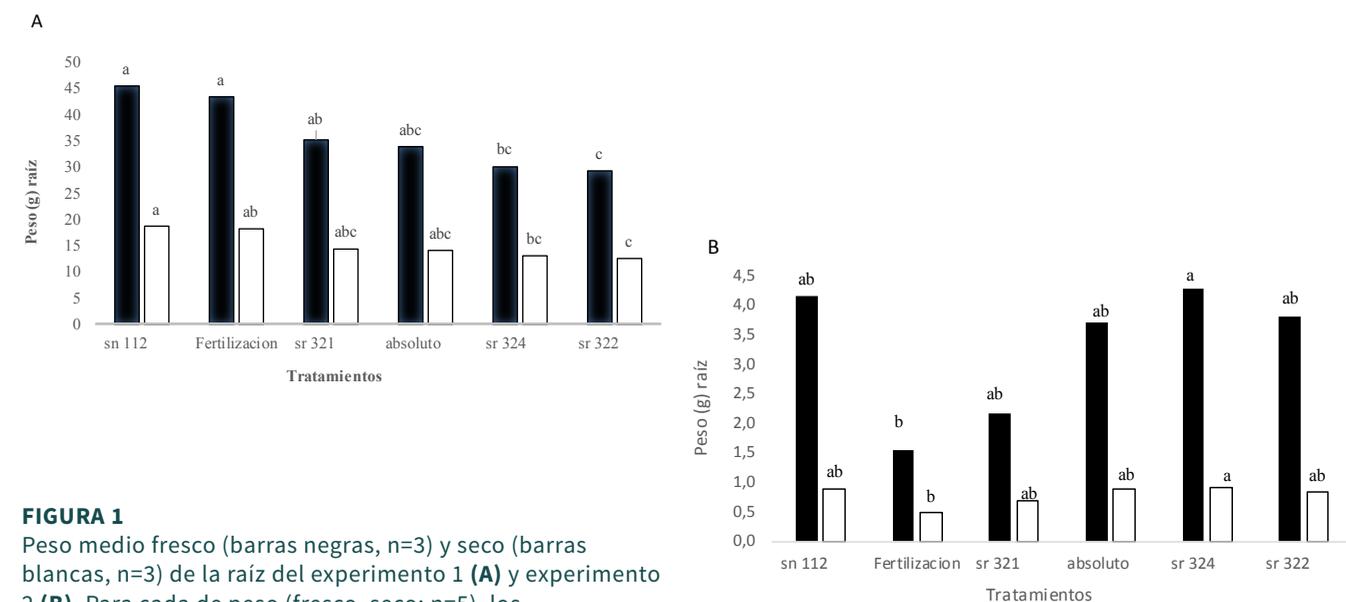


FIGURA 1 Peso medio fresco (barras negras, n=3) y seco (barras blancas, n=3) de la raíz del experimento 1 (A) y experimento 2 (B). Para cada de peso (fresco, seco; n=5), los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

Con relación al peso del tallo (**FIGURA 2**), en el experimento 1, la prueba de ANOVA indica diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,001$ fresco y $p < 0,0001$ seco), con un coeficiente de variación de 27 % y 23 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de dos grupos, de los cuales se puede establecer el mayor peso (410 g fresco y 82 g seco) y se obtuvo en el suelo con fertilización inorgánica, siendo significativamente mayor al resto de tratamientos, sin embargo no se observó la misma tendencia. En el experimento 2, la prueba de ANOVA muestra diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,0001$ fresco y $p < 0,0001$ seco), con un coeficiente de variación de 3,4 % y 4,6 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de tres grupos, en el cual el valor más elevado (2,5 g) en peso seco corresponde con tratamiento con la cepa SR324, aunque no presenta diferencias significativas con respecto al tratamiento de fertilización, lo cual podría indicar que la cepa SR324 es igual de eficiente en la acumulación de la biomasa aérea de la planta de papa que la aplicación de fertilización tradicional. No se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos en el peso fresco del tallo en el caso del experimento 2 (datos no mostrados).

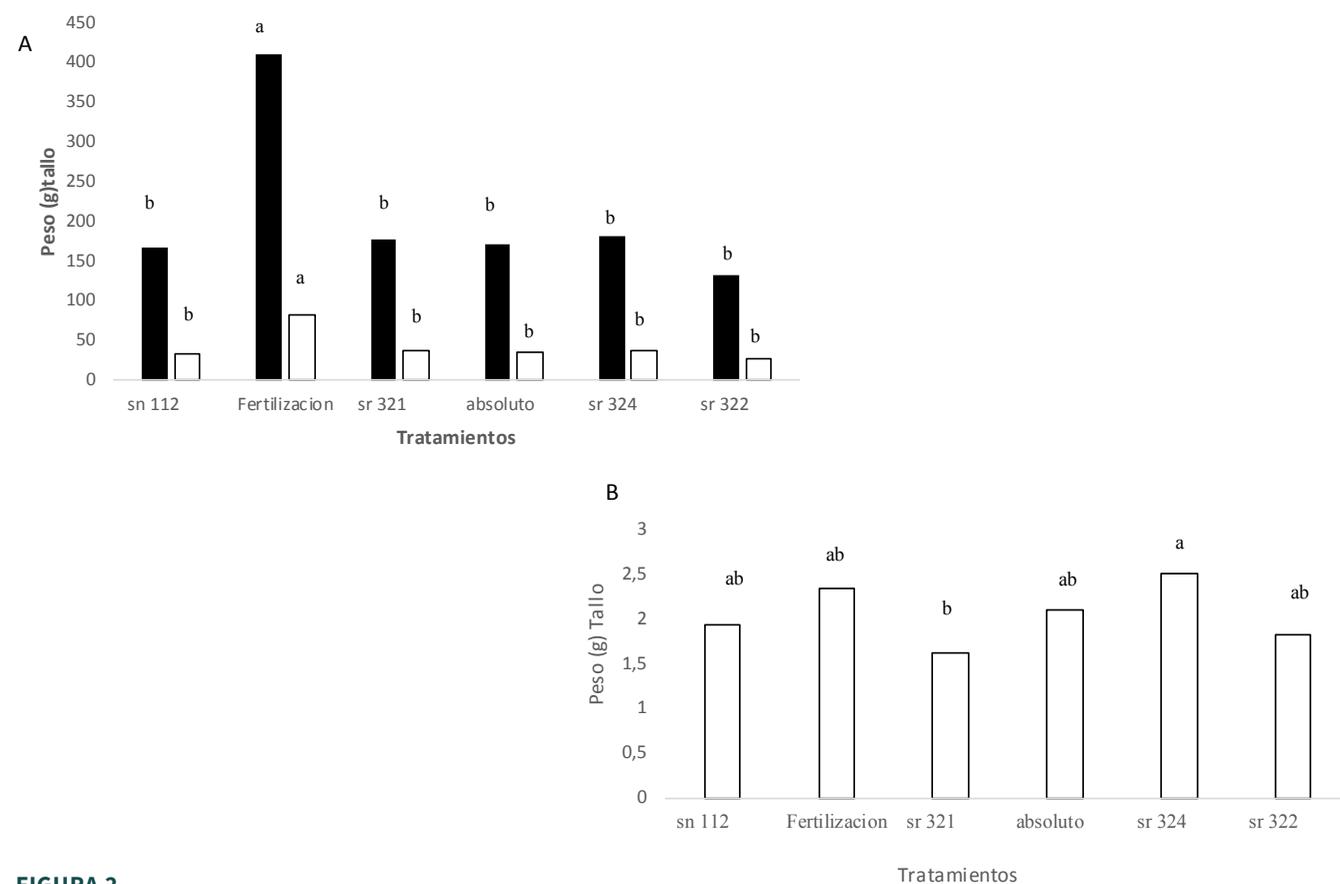


FIGURA 2 Peso fresco (barras negras, $n=3$) y seco (barras blancas, $n=3$) del tallo en el experimento 1 (**A**) y experimento 2 (**B**). Para cada de peso (fresco o seco, $n=5$), los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

Longitud del tallo y de la raíz

Para longitud del tallo y la raíz en el experimento 1 (**FIGURA 3**), la prueba de ANOVA muestra diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,0001$ tallo y $p < 0,007$ raíz), con un coeficiente de variación de 7,8 % y 7,9 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de cuatro grupos, los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento de fertilización, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para la mayoría de los tratamientos en el caso de la raíz, sin embargo, el tratamiento de fertilización sí presentó diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos, excepto el SR324 en el caso del tallo. Estos resultados indicarían que esta cepa bacteriana favorece la elongación del tallo de igual manera que el tratamiento con fertilizante.

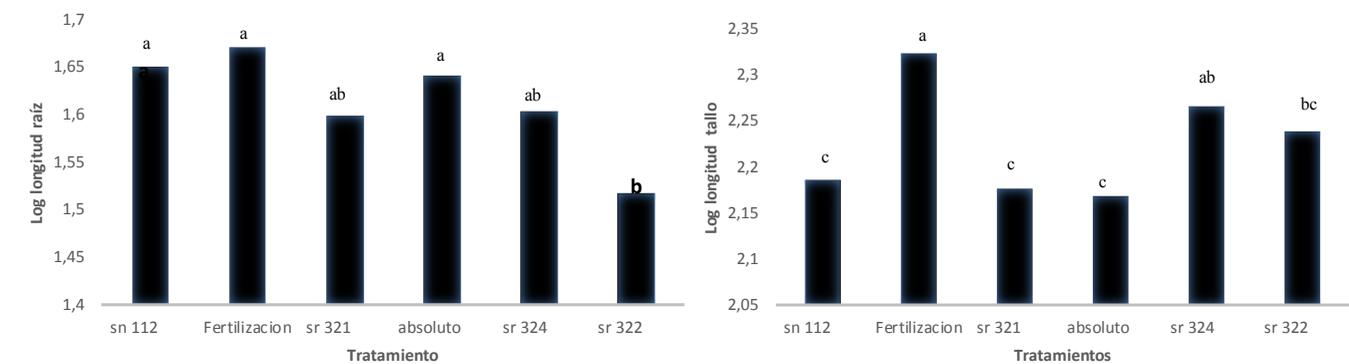
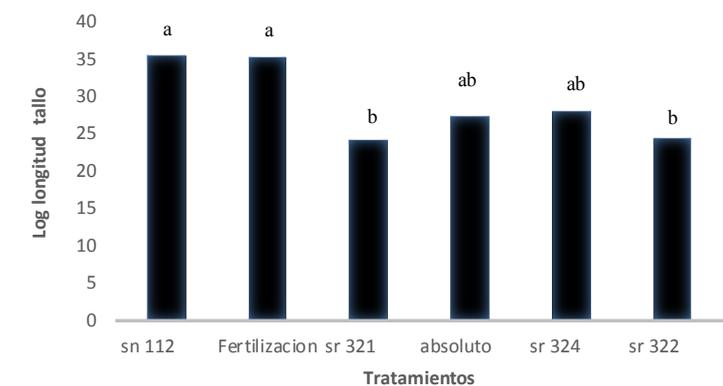


FIGURA 3 Logaritmo de la longitud del tallo y la raíz ($n=3$) en el experimento 1. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

En el experimento 2 (**FIGURA 4**) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en la raíz (gráfica no mostrada). En el caso de la medición de la longitud del tallo, la prueba de ANOVA muestra diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,0001$), con un coeficiente de variación de 29 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de cuatro grupos, de los cuales los tratamientos de fertilización y de la inoculación con la cepa SN112 presentan los valores más elevados, siendo estos estadís-

FIGURA 4 Logaritmo de la longitud del tallo ($n=5$) en el experimento 2. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia



ticamente significativos frente a los tratamientos con las cepas SR321 y SR322, pero no con respecto al control y el SR324.

En ambos experimentos, la elongación del tallo es mayor en los tratamientos de fertilización e inoculación con las cepas SN112 y SR324.

Rendimiento

La evaluación de los resultados del rendimiento en la producción del cultivo de papa en el experimento 1 (FIGURA 5), al hacer la prueba de ANOVA muestra diferencias significativas para tratamientos ($p < 0,04$), con un coeficiente de variación de 29 %, la prueba de rangos múltiples Tukey ($p < 0,05$) determina la existencia de tres grupos, de los cuales el valor más elevado es con el tratamiento SN112, no siendo significativamente diferente al resto de tratamientos, excepto al SR322.

Los resultados han mostrado que no hay diferencias significativas entre el tratamiento control (absoluto) y el resto de tratamientos, principalmente fertilización y cepas SR324 y SN112, aplicados para la mayoría de las variables analizadas. Este hecho podría estar relacionado con que los suelos empleados son los procedentes del cultivo de papa y suelen estar sometidos a una excesiva fertilización, con lo cual podría no ser observado desde el punto de vista estadístico el efecto positivo de estas cepas solubilizadoras de P o del fertilizante en la mejora del crecimiento de las plantas, ya que hay un exceso de nutrientes en los suelos control.

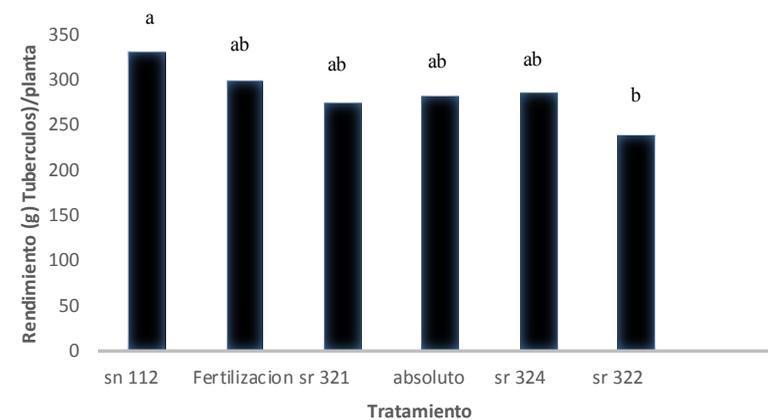


FIGURA 5
Rendimiento g de tubérculos/planta ($n=3$) en el experimento 1. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).
Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

Las 4 cepas bacterianas del género *Pseudomonas* seleccionadas para llevar a cabo los tratamientos de inoculación en papa han mostrado diferentes resultados en el desarrollo y rendimiento del cultivo de papa, siendo las cepas SN112 y SR324 las que podrían ser utilizadas para desarrollar un potencial biofertilizante debido a que favorecen el crecimiento y rendimiento de las plantas de papa.

Con respecto a uso de las dos variedades se puede concluir que en las variedades tardías (120 días) como la superchola, el efecto de las bacterias solubilizadoras es menos

patente, ya que la diferencia de crecimiento y peso entre el mayor y menor valor es del 30 %, a diferencia en las variedades precoces (INIAP-Libertad), es del 60 %.

Futuras investigaciones son necesarias para corroborar la tendencia observada en los tratamientos con las cepas SN112 y SR324 en suelos deficientes en nutrientes y especialmente en fósforo.

Referencias

- Adhya, T.; Kumar, N.; Reddy, G.; Podile, A.; Bee, H.; Samantaray, B. (2015). *Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils*. Curr. Sci. 108, 1280-1287.
- Behbahani, M. (2010) *Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria*. Sci. Hort. 124, 393-399.
- Calvo P.; Nelson L.; Kloepper J. (2014) *Agricultural uses of plant biostimulants*. Plant Soil. 383: 3-41.
- Castillo, C.; Huenchuleo, M.; Michaud, A.; Solano J. (2016) *Mycorrhizae in a potato crop added Twin-N biofertilizer in an Andisol of the Araucanía Region*. Idesia (Arica) 34 : 1: 39-45.
- Da Costa, E.; de Lima, W.; Oliveira, S.; de Souza, F. (2015) *Phosphate-solubilising bacteria enhance Oryza sativa growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate*. Ecological Engineering 83: 380-385.
- Hanif, M.; Hameed, S.; Imran A.; Naqqash, T.; Shahid, M.; VanElsas, J. (2015) *Isolation and characterization of a β -propeller gene containing phosphobacterium Bacillus subtilis strain KPS-11 for growth promotion of potato (Solanum tuberosum L.)*. Front. Microbiol. 6:583.
- Hariprasad, P.; Niranjana, S. (2009) *Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato*. Plant Soil, 316:13-24.
- Kureka, E.; Ozimeka, E.; Sobiczewskib, P.; Stomkaa, A.; Jaroszuik J. (2013) *Effect of Pseudomonas luteola on mobilization of phosphorus and growth of young apple trees (Ligol)—Pot experiment*. Scientia Horticulturae 164: 270-276.
- Leggett, M.; Newlands, N.; Greenshields, D.; West, L.; Inman, S.; Koivunen, M. (2015) *Maize yield response to a phosphorus-solubilizing microbial inoculant in field trials*. Journal of Agricultural Science, 153: 1464-1478.
- Liu, Z.; Li, Y.; Zhang, S.; Fu, Y.; Fan, X.; Patel, J.S.; Zhang, M. (2015) *Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils*. Applied Soil Ecology 96: 217-224.
- Oliveira C.; Alves, V.; Marriel, I.; Gomes, E.; Scotti, M.; Carneiro, N.; Guimaraes, C.; Schaffert, R.; Sa, N. (2009) *Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome*. Soil Biology and Biochemistry 41: 1782-1787.
- Pereira, S.; Castro, P. (2014) *Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils*. Ecological Engineering 73: 526-535.
- Srinivasan R.; Alagawadi, A.; Yandigeri, M.; Meena, K.; Saxena, A. (2012) *Characterization of phosphate-solubilizing microorganisms from salt-affected soils of India and their effect on growth of sorghum plants [Sorghum bicolor (L.) Moench]*. Ann Microbiol 62: 93-105.