

MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL CON YESO AGRÍCOLA EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) BAJO CASA SOMBRA

VEGETABLE GROWTH PROMOTER MICROORGANISMS WITH AGRICULTURAL PLASTER ON POTATOES (*Solanum tuberosum* L.) UNDER SHADOW HOUSING

José Leal-Almanza¹, Marco A. Gutiérrez-Coronado^{1*}, Luciano Castro-Espinoza¹, Fernando Lares-Villa¹,
Juan M. Cortes-Jiménez², Sergio de los Santos-Villalobos¹

¹Instituto Tecnológico de Sonora. 85000. Calle 5 de febrero 818 sur, Colonia Centro, Cajeme Sonora. (marco.gutierrez@itson.edu.mx). ²Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria. 85000. Calle Dr. Norman E. Borlaug Km. 12, Colonia Valle del Yaqui, Cajeme, Sonora.

RESUMEN

Como alternativa al uso excesivo de fertilizantes sintéticos, los agricultores adoptan el uso de microorganismos promotores de crecimiento en plantas, para potenciar el crecimiento de raíces, fortalecer mecanismos naturales de reacción a enfermedades e insectos y aumentar la producción. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial del yeso agrícola en combinación con *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* como promotor de crecimiento vegetal. Su aplicación al suelo permitirá seleccionar la combinación más productiva, con calidad y rendimiento mayores del cultivo. El diseño fue totalmente al azar, con tres tratamientos aplicados al cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de casa sombra y riego por goteo. Los tratamientos fueron: testigo (T1), *Trichoderma harzianum* combinado con 40 kg ha⁻¹ calcio (T2), *B. cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* combinados con 40 kg ha⁻¹ calcio (T3); la fuente de calcio en T2 y T3 fue yeso agrícola. Las variables evaluadas fueron altura de planta, contenido de clorofila, composición nutrimental de hoja y número, peso y peso volumétrico del tubérculo. La viabilidad de los microorganismos en la rizósfera se determinó con agar selectivo para cada tipo de microorganismo. En el clorofila no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos; el testigo superó significativamente en altura a las plantas de T2 a T4; el número de tubérculos (51.5 %) y rendimiento (49.4 %) de T3 fue significativamente mayor

ABSTRACT

As an alternative to the excessive use of synthetic fertilizers, farmers use microorganisms that promote growth in plants, to increase roots growth, strengthen natural mechanisms that react to diseases and insects and increase production. The objective of this study was to evaluate the potential of agricultural plaster combined with *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* as plant growth promoter. Its soil application will allow selecting the most productive combination, with higher quality and crop yield. The design was completely random, with three treatments applied to potatoes cultivation (*Solanum tuberosum* L.) in shaded house conditions and drip irrigation. The treatments were: control (T1), *T. harzianum* combined with 40 kg ha⁻¹ calcium (T2), *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* and *T. harzianum* combined with 40 kg ha⁻¹ calcium (T3); the source of calcium in T2 and T3 was agricultural gypsum. The evaluated variables were plant height, chlorophyll content, numbers and nutritional composition of leaves, weight and volumetric weight of the tuber. The viability of the microorganisms in the rhizosphere was determined with selective agars for each type of microorganism. There were no statistical differences regard on chlorophyll between treatments; the control significantly exceeded in height compared to the plants from T2 to T4; the number of tubers (51.5 %) and yield (49.4 %) from T3 was significantly higher than T1. At the biocontrol in the tuber for *Streptomyces* T3 was better (9 %) than T1 (32.14 %). T3 had a higher yield and better standard quality.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2017. Aprobado: julio, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 1149-1159. 2018.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., productivity, microbial consortium, biofertilizer.

que T1. En el biocontrol en tubérculo contra *Streptomyces* T3 fue mejor (9%) que T1 (32.14 %). T3 tuvo rendimiento mayor y calidad estándar mejor.

Palabras claves: *Solanum tuberosum* L., productividad, consorcio microbiano, biofertilizante

INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional desarrollada en décadas recientes se caracteriza por el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas, para aumentar la producción agrícola. Esto degrada los suelos y altera sus propiedades físicas, químicas y biológicas, porque la mayoría son altamente tóxicos, alteran las comunidades microbianas y contaminan el suelos y el agua superficial y subterránea (Jiménez, 2011)³.

La alternativa actual para optimizar los cultivos son los productos biológicos o biofertilizantes. La incorporación al sistema productivo de organismos seleccionados por sus funciones en diversos procesos biológicos. Entre los elementos más valiosos en la producción de estos biofertilizantes están los microorganismos promotores de crecimiento vegetal, conocidos como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism), aislados de ambientes diversos, con la habilidad potencial de afectar positivamente el crecimiento de las plantas (Elein *et al.*, 2005; Bashan *et al.*, 2014).

Entre los PGPR más utilizados está *Pseudomonas fluorescens*, que estimula el crecimiento de la planta mediante producción de antibióticos, con lo que evita enfermedades a la planta por otras bacterias y hongos patógenos. También acelera la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas por la síntesis de hormonas, como auxinas, giberelinas y citoquininas, y otras sustancias, como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento (Uribe *et al.*, 1999).

Algunas bacterias son versátiles y pueden presentar varios mecanismos, es el caso de *Bacillus subtilis* que produce auxinas que promueven el crecimiento de tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*; este provoca marchitez y pudrición de las raíces (Gupta *et al.*, 2000).

Diferentes especies de *Trichoderma* se utilizan para el control de hongos patógenos del suelo,

INTRODUCTION

Conventional agriculture developed in recent decades has characterized by the intensive use of fertilizers and pesticides to increase agricultural production. Such activities degrade soils and alter their physical, chemical and biological properties because most of them are highly toxic, thus altering microbial communities and pollute soils, surface, and underground water (Jiménez, 2011).

The current alternative to optimize crops is biological products or biofertilizers. The addition into productive systems of selected organisms for their functions in various biological processes. Among the most valuable elements in the production of these biofertilizers are microorganisms that promote plant growth, known as PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism), isolated from diverse environments, with the potential ability to positively affect plants growth (Elein *et al.*, 2005; Bashan *et al.*, 2014).

Pseudomonas fluorescens is among the most used PGPM, which stimulates plant growth through antibiotics production, thereby preventing plant diseases by other pathogenic bacteria and fungi. It will also accelerate seeds germination and plant growth by the synthesis of hormones, such as auxins, gibberellins and cytokinins, and other substances such as amino acids and specific growth promoters (Uribe *et al.*, 1999).

Some bacteria are versatile and present several mechanisms, such as *Bacillus subtilis*, which produces auxins that promote tomato growth and induce systemic resistance to *Fusarium oxysporum*; this causes wilting and roots rotting (Gupta *et al.*, 2000).

Different species of *Trichoderma* are used to control pathogenic fungi in the soil, mainly from the *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Pythium* and *Fusarium* genera, and also have a growth promoting effect due to the production of phytohormones and phosphates solubilization (Cubillos-Hinojosa, 2009).

Certain microorganisms, typically from the rhizosphere, favor root development, atmospheric N fixation, soil P solubilization, production of organic acids and secondary metabolites that act similarly to phytohormones, so they directly influence nutrients

³ Jiménez V., O. 2011. Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas no Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. 141 p.

principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Pythium* y *Fusarium*, además tienen efecto promotor de crecimiento por la producción de fitohormonas y solubilización de fosfatos (Cubillos-Hinojosa, 2009).

Ciertos microorganismos, propios de la rizósfera, favorecen el desarrollo radicular, la fijación del N atmosférico, la solubilización del P del suelo y la producción de ácidos orgánicos y metabolitos secundarios que actúan análogamente a las fitohormonas, por lo que influyen directamente en la disponibilidad de nutrientes y en la estimulación del crecimiento vegetal. Este es el caso de *Pseudomonas* spp. y *Trichoderma* spp. (Puente *et al.*, 2010; Cano, 2011). Los biofertilizantes a base de esos esos microorganismos minimizan notablemente el impacto ambiental que producen los fertilizantes químicos y mejoran el rendimiento de los cultivos, por lo que pueden limitar el uso de los productos tóxicos (Hernandez-Leal *et al.*, 2011; Patiño-Flores y Sanclemente-Reyes, 2014).

La calidad del suelo la define su capacidad para mantener un ecosistema natural o modificado, sostener la productividad vegetal y animal, o mejorar la calidad de agua y aire, y contribuir a la salud humana y habitabilidad. La calidad del suelo la influyen los procesos microbianos que ocurren en él; por lo tanto, la permanencia de la estructura de la comunidad microbiana puede ser indicador de la degradación o empobrecimiento del suelo (Abril, 2003). Los microorganismos expresan variedad de funciones y versatilidad bioquímica, que incluye oxidación, reducción y precipitación de los elementos en el suelo (Atlas, 1984).

Una de las fuentes de Ca usada ahora, por su abundancia y costo bajo, es el yeso agrícola (Ca_2SO_4). Este se recomienda como fertilizante (fuente de Ca y S), enmienda que facilita el desplazamiento del Na de los sitios de intercambio, como mejorador de impedimentos físicos (encostrado o compactación), y acidulante temporal, que favorecen el desarrollarse de microorganismos (Gambaudo, 2006). En el primer caso aporta S y Ca; en el segundo caso, facilita el desplazamiento del Na de los sitios de intercambio y mejora impedimentos físicos (encostrado y compactación) (Gambaudo, 2006).

La necesidad de mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos al control químico para enfermedades agrícolas, con menos riesgo ambiental,

availability and the stimulation of plant growth. This is the case of *Pseudomonas* spp. and *Trichoderma* spp. (Puente *et al.*, 2010, Cano, 2011). Biofertilizers based on these microorganisms notably minimize the environmental impact produced by chemical fertilizers and improve crop yield; therefore, they limit the use of toxic products (Hernandez-Leal *et al.*, 2011; Patiño-Flores and Sanclemente-Reyes, 2014).

Soil quality is defined by its ability to maintain a natural or modified ecosystem, sustain plant and animal productivity, or improve water and air quality, and contribute to human health and habitability. Microbial processes that occur in it influence the quality of the soil; therefore, the permanence of microbial community structure can be an indicator of the degradation or soil impoverishment (Abril, 2003). The microorganisms express a variety of functions and biochemical versatility, which includes oxidation, reduction, and precipitation of soil elements (Atlas, 1984).

One of the Ca source currently used due to its low cost and abundance is the agricultural gypsum (Ca_2SO_4). This is recommended as fertilizer (source of Ca and S), an amendment that facilitates the displacement of Na from the exchange sites, as an enhancer of physical impediments (crusting or compaction), and a temporary acidulant, which favor the development of microorganisms (Gambaudo, 2006). In the first case it contributes S and Ca; in the second case, it facilitates the displacement of the Na from the exchange sites and improves physical impediments (crusting and compaction) (Gambaudo, 2006).

The need for mechanisms that increase field productivity has driven the search for alternative methods to chemical control for agricultural diseases, with less environmental, human and health risks. This is now a great challenge for agriculture and its development. The objective of this study was to evaluate the potential of the agricultural gypsum, combined with growth promoting microorganisms (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum*) applied to soil, by means of microbiological, nutritional analysis and physiological and yield variables in potatoes.

MATERIALS AND METHODS

The experimental treatments took place at the Experimental Center and Technology Transfer (CETT-910), from the

sanitario y para la salud humana. Esto es ahora un gran reto para la agricultura y su desarrollo. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial del yeso agrícola, combinado con microorganismos promotores de crecimiento (*B. cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum*) aplicados al suelo, mediante análisis microbiológico, nutricional y variables fisiológicas y de rendimiento en papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los tratamientos experimentales se realizaron en el Centro Experimental y Transferencia de Tecnología (CETT-910), del Instituto Tecnológico de Sonora (Block 910 del Valle del Yaqui, Sonora, México). El diseño experimental fue completamente al azar simple con tres tratamientos, área experimental útil de 2 m² y 10 repeticiones por tratamiento (elegidas al azar). Las unidades experimentales fueron 30 (Cuadro 1). La comparación de medias o prueba de múltiples rangos se evaluó por el método LSD ($p \leq 0.05$), con el software Statgraphics Centurión XVI.

La siembra se hizo con tubérculos-semilla, variedad Atlantic, densidad de cinco tubérculos por metro lineal, en camas separadas 1.50 m y longitud de 30 m, en casa sombra. Las plantas se fertilizaron con 250-100-250 N:P:K, con urea, nitrato de potasio y ácido fosfórico agrícola; el riego fue semanal y por goteo.

Los tratamientos incluyeron aplicación de 10⁸ UFC mL⁻¹ por m² mezcladas con 0.5 kg de yeso agrícola (equivalente a 40 kg de Ca por ha), se aplicaron a 150 m² del cultivo, en seis dosis, desde la emergencia, cada 15 d y a través del sistema de riego.

Variables fisiológicas y de rendimiento evaluadas

Altura de planta

La altura (cm) de la planta se midió con un flexómetro, de la base del tallo al ápice, cada semana desde la primera aplicación de los tratamientos.

Instituto Tecnológico de Sonora (Block 910 of the Yaqui Valley, Sonora, Mexico). The experimental design was completely randomized with three treatments, a useful experimental area of 2 m² and 10 repetitions per treatment (chosen at random). The experimental units were 30 (Table 1). The means comparison or multiple range test was evaluated *via* the LSD method ($p \leq 0.05$), with the Statgraphics Centurión XVI software.

The sowing was done with seed-tubers, of the Atlantic variety, in a five tubers per linear meter density, in beds separated 1.50 m and length of 30 m, in shade house. The plants were fertilized with 250-100-250 N: P: K, with urea, potassium nitrate and agricultural phosphoric acid; and weekly irrigated by dripping.

The treatments included a 10⁸ CFU mL⁻¹ per m² mixed with 0.5 kg application of agricultural gypsum (equivalent to 40 kg of Ca per ha), these were applied to 150 m² of the crop, in six doses, from the emergence, every 15 d *via* the irrigation system.

Evaluated physiological and performance variables

Plant height

The height (cm) of the plants was weekly measured with a flexometer, from the base of the stem to the apex, starting at the first application of the treatments.

Chlorophyll content index

The chlorophyll content index was measured weekly on the physiologically mature leaf, from 11 am to 2 pm, with Spad 502 (Minolta), and was reported in chlorophyll units (UC).

Yield and number of tubers

The total yield was the weight of the tubers per treatment then extrapolated to t ha⁻¹. The number of tubers represented the experimental units per treatment.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal combinado con yeso agrícola en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casa sombra.

Table 1. Treatments evaluated with microorganisms that promote plant growth combined with agricultural gypsum in the cultivation of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in shaded greenhouse.

Tratamiento	Descripción
T1	Testigo
T2	40 kg ha ⁻¹ de Ca+ <i>Trichoderma harzianum</i>
T3	40 kg ha ⁻¹ de Ca+ (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>)

Índice de contenido de clorofila

El índice del contenido de clorofila se midió cada semana en la hoja fisiológicamente madura, de las 11 a las 14 h, con Spad 502 (Minolta), y se reportó en unidades de clorofila (UC).

Rendimiento y número de tubérculos

El rendimiento fue el peso total de los tubérculos por tratamiento y se extrapoló a $t\ ha^{-1}$. El número de tubérculos representó a las unidades experimentales por tratamiento.

Incidencia de *Fusarium* y *Streptomyces*

La incidencia de dos de los microorganismos patógenos más comunes se determinó. La identificación fue por medio del daño producido por *Fusarium* y *Streptomyces*, con base en el manual de calidad “Muestreo y análisis de papa en campo” (PEPSICO Alimentos México, 2014). Todos los tubérculos de las unidades experimentales se inspeccionaron, la relación de infectadas y sanas se obtuvo, y se reportó como porcentaje de incidencia.

Análisis nutrimental de hoja

La concentración de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes (Mn, Zn, Fe y Cu) se determinó en una muestra compuesta del tejido vegetal, en floración, con un espectrofotómetro (DR2100) y el método HACH (Alcántar y Sandoval, 1999), con modificaciones ajustadas a la naturaleza de las muestras.

Microbiología de la rizósfera

El recuento viable se hizo al inicio, a la mitad y al término del ciclo de cultivo. Una muestra de cada unidad experimental se usó para formar una muestra compuesta por tratamiento. La técnica de diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se utilizó para vaciado en placa, por triplicado, en los medios para *B. subtilis* y *B. cereus* (agar manitol-yema de huevo-polimixina, MYP), *T. harzianum* (agar dextrosa de papa) y *P. fluorescens* (agar aislamiento de *Pseudomonas* F); para bacterias se mantuvieron a 30 °C y para hongos a 25 °C. El recuento se hizo después de 24-48 h y 120 h, respectivamente, con un contador manual de colonias; los resultados se reportaron como UFC g^{-1} de suelo (Pepper y Gerba, 2004).

Prueba de calidad de fritura de papa

La calidad de fritura se evaluó con el método usado en el laboratorio de AGROBO y con base en el manual de Muestreo

Incidence of *Fusarium* and *Streptomyces*

The incidence of two of the most common pathogenic microorganisms was determined. Their identification was through the damage they produced, following the quality manual “Sampling and analysis of potatoes in the field” (PEPSICO Alimentos México, 2014). All tubers from the experimental units were inspected; the infected and healthy ratio was obtained and reported as an incidence percentage.

Leaves nutrimental analysis

The macronutrients (N, P, K, Ca and Mg) and micronutrients (Mn, Zn, Fe and Cu) concentrations were determined in a composite plant tissue sample, at flowering, with a spectrophotometer (DR2100) following the HACH method (Alcántar and Sandoval, 1999) with modifications adjusted to the nature of the samples.

Rhizosphere microbiology

The viable counts were made at the beginning, in the middle and at the end of the cultivation cycle. A sample of each experimental unit was used to form a composite sample by treatment. The 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} dilution technique was used for plate casting, by triplicate, in media for *B. subtilis* and *B. cereus* (mannitol-egg yolk-polymyxin agar, MYP), *T. harzianum* (potato dextrose agar) and *P. fluorescens* (isolation agar of *Pseudomonas* F); for bacteria were kept at 30 °C and for fungi at 25 °C. The count was made after 24-48 h and 120 h, respectively, with a manual colony counter; the results were reported as CFU g^{-1} of soil (Pepper and Gerba, 2004).

Quality test of potato frying

The frying quality was evaluated with the AGROBO laboratory method based on the potato quality sampling manual and field analysis (PEPSICO Alimentos México, 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Height

The height in T1, except of the first week, was higher than T2 and exceeded T3 only in week 5 (Table 2).

The plants in T2 and T3 could be the highest due to the effect of the micro-organisms from the *Bacillus* genus, growth promoters (Izzeddin and Medina,

y análisis de papa en campo (PEPSICO Alimentos México, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Altura

La altura en T1, con excepción de la primera semana, fue mayor que en T2 y superó a T3 sólo en la semana 5 (Cuadro 2).

Las plantas en T2 y T3 podrían ser las más altas, por efecto de los microorganismos del género *Bacillus*, promotores de crecimiento (Izzeddin y Medina, 2011), aplicados en los tratamientos, con crecimiento mayor de raíces y pelos absorbentes por la presencia de *T. harzianum* (Calvo y Zuñiga, 2010; Jiménez *et al.*, 2011) y por la solubilización de grupos fosfatos por la presencia de *P. fluorescens* (Molina-Romero *et al.*, 2015). Pero T1 y T3 presentaron crecimiento mayor que T2.

Índice de contenido de clorofila

T2 presentó índices mayores de clorofila que el testigo en las semanas 3, 6 y 7 y mayor a T3 sólo en la semana 8 (Cuadro 3).

Todos los valores estuvieron entre las 43 y 34 unidades de clorofila (Cuadro 3). Esto pudo deberse a que la fertilización con N fue adecuada. La caída de los valores hacia el final se debió a la senescencia del cultivo. Giletto *et al.* (2010) compararon el índice verde del cultivo de papa en dependencia del contenido de N en la planta; ellos confirmaron que la fertilización adecuada (30 a 50) con N se asocia al aumento en las unidades de clorofila.

2011) applied in the treatments, with greater roots growth and absorbent hairs due to the presence of *T. harzianum* (Calvo and Zuñiga, 2010; Jiménez *et al.*, 2011), and by the solubilization of phosphate groups by the presence of *P. fluorescens* (Molina-Romero *et al.*, 2015). But T1 and T3 showed higher growth than T2.

Chlorophyll content index

T2 had higher chlorophyll rates than control at weeks 3, 6 and 7 and greater than T3 only at week 8 (Table 3).

All values were between 43 and 34 chlorophyll units (Table 3). This could be because fertilization with N was adequate. The decrease in the values towards the end was due to the senescence of the crop. Giletto *et al.* (2010) compared the green index of potato crops regard the N content in the plants; they confirmed that adequate fertilization (30 to 50) with N is associated with the increase in chlorophyll units.

Variables of the yield

Number of tubers

The highest yields in the number of tubers were obtained at T2 and T3, the latter exceeded by 51.5 % the control and was slightly higher than T2 (47 %) (Figure 1).

The favorable effect of *T. harzianum*, *B. subtilis* and *P. fluorescens* on the development was evident with the higher number of tubers in T2 and T3. This effect is because microorganisms produce growth hormones, which favor the root system development and improve nutrition (Cubillos-Hinojosa *et al.*,

Cuadro 2. Efecto de microorganismos y yeso agrícola en altura (cm) de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.).
Table 2. Effect of microorganisms and agricultural gypsum on the height (cm) of potato plants (*Solanum tuberosum* L.).

Tratamientos	†S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Testigo	19a	43b	61b	76b	87b	86b	86b	86b	93b
40 kg ha ⁻¹ de Ca <i>Trichoderma harzianum</i>	12a	31a	45a	56a	71a	72a	73a	70a	73a
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>)	18a	42b	60b	73b	78a	81 ab	82ab	79ab	85b

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (LSD; p≤0.05). †S: semanas. ❖ Means with different letters in a column are statistically different (LSD; p≤0.05). †S: weeks.

Cuadro 3. Efecto de microorganismos y yeso agrícola en el contenido de unidades de clorofila en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.).**Table 3. Effect of microorganisms and agricultural gypsum on the chlorophyll content units in potato plants (*Solanum tuberosum* L.).**

Tratamientos	Unidades de clorofila							
	S [†] 1	S [†] 2	S [†] 3	S [†] 4	S [†] 5	S [†] 6	S [†] 7	S [†] 8
Testigo	42a	38a	37a	41a	41a	34a	34a	34a
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ <i>Trichoderma harzianum</i>	43a	40a	40b	41a	43a	37b	38b	37b
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>)	43a	40a	41b	42a	42a	36ab	36ab	34a

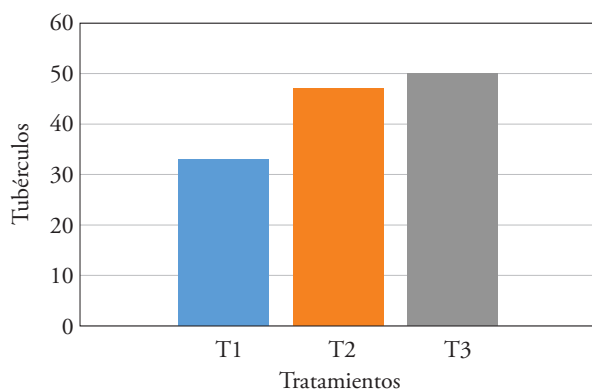
Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (LSD; $p \leq 0.05$). [†]S: semanas. ❖ Averages with different letters in a column are statistically different (LSD; $p \leq 0.05$). [†]S: weeks.

Variables de rendimiento

Número de tubérculos

Los rendimientos mayores del número de tubérculos se obtuvieron en T2 y T3, este último superó con 51.5 % al testigo y fue ligeramente mayor que T2 (47 %) (Figura 1).

El efecto favorable de *T. harzianum*, *B. subtilis* y *P. fluorescens* en el desarrollo fue evidente con el número de tubérculos mayor en T2 y T3. Este efecto se debe a que los microorganismos producen hormonas de crecimiento, que favorecen el desarrollo del sistema radicular y mejoran la nutrición (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009). Pozo (1997) señaló que la presencia de hormonas de crecimiento incrementó la tuberización; por lo que T1, sin inocular, mostró número menor de tubérculos.



2009). Pozo (1997) noted that the presence of growth hormones increased tuberization; so that T1, without inoculation, showed a smaller number of tubers.

Yield

T3 showed higher yield (26.5 t ha⁻¹) and surpassed by 49.4 % the control (Figure 2). The yield in T3 was the highest. In this case, the action of the growth promotion of *T. harzianum* was also demonstrated (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009). Puente *et al.* (2010) noted that *B. cereus*, *B. subtilis* and *P. fluorescens* are used for their direct promoter functions, based on their production of phytohormones and P solubilizers that increase crop yield.

The incidence of *Fusarium* and *Streptomyces* in the harvested tuber of the experimental units was

Figura 1. Número de tubérculos por tratamiento en el cultivo de papa, T1: testigo, T2: 40 kg ha⁻¹ de Ca+ *T. harzianum*, T3: 40 kg ha⁻¹ de Ca+ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*.

Figure 1. Number of tubers per treatment in evaluated potato crop, T1: control, T2: 40 kg ha⁻¹ of Ca+ *T. harzianum*, T3: 40 kg ha⁻¹ of Ca+ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*.

Rendimiento

T3 mostró rendimiento mayor (26.5 t ha^{-1}) y superó con 49.4 % al testigo (Figura 2). El rendimiento en T3 fue el mayor. En este caso también se demostró la acción de los promoción de crecimiento de *T. harzianum* (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009). Puente *et al.* (2010) señalaron que *B. cereus*, *B. subtilis* y *P. fluorescens* se utilizan por su función promotora directa, basada en producción de fitohormonas y solubilizadores de P, en el aumento del rendimiento del cultivo.

La incidencia de *Fusarium* y *Streptomyces* en el tubérculo cosechado de las unidades experimentales fue mayor en T1, con un porcentaje de incidencia de ambos patógenos de 32.14 % y 1 %, respectivamente. Por el contrario, el T3 tuvo menos incidencia con sólo el 9 % para *Streptomyces* y sin presencia de *Fusarium* (Figura 3).

Los efectos de los microorganismos aplicados en los tratamientos fueron positivos con respecto al testigo sin recibir tratamiento, el que mejor calidad o menor incidencia de *Streptomyces* o *Fusarium*, por la acción de los microorganismos presentes en el T3 que actuaron como antagonistas para estos patógenos. Esto se puede comparar con estudios realizados

higher in T1, with an incidence percentage for pathogens with 32.14 % and 1 %, each. On the contrary, T3 was the one that had less incidence with only 9 % for *Streptomyces* and without *Fusarium* presence (Figure 3).

The effects of the applied microorganisms in the treatments were positive respect to the control, which no received microorganisms; this had a better quality or lower incidence of *Streptomyces* or *Fusarium*. The microorganisms in the T3 acted as antagonists for these pathogens. This can be compared with studies where the bacilli are used as antagonists against microorganisms' precursors of diseases as shown by Sharga and Lyon (1998), when using *B. subtilis* to inhibit *Pectobacterium carotovorum* growth that causes soft rot in potatoes. Ezziyyani *et al.* (2004) used *Trichoderma harzianum* as biocontrol against *Phytophthora capsici* causing the "sadness" in green pepper cultivation, obtaining results of up to 65 % inhibition in pots and 80 % at greenhouse. To all the above, it is to be added that *Pseudomonas* spp. has also been shown to have antagonistic power for various pathogenic microorganisms, as pointed out by Walsh *et al.* (2001).

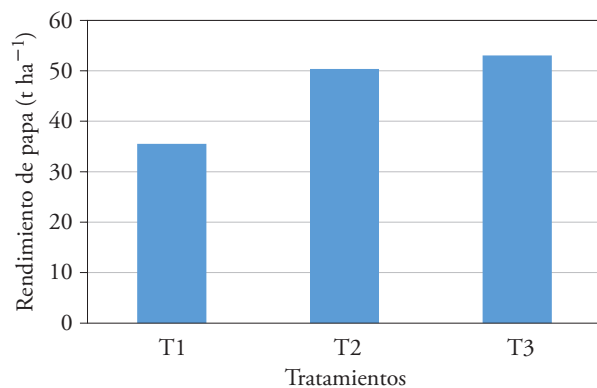


Figura 2. Efecto de microorganismos y yeso agrícola en el rendimiento de papa (t ha^{-1}). T1: testigo, T2: 40 kg ha^{-1} de Ca + *T. harzianum*, T3: 40 kg ha^{-1} de Ca + *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*.

Figure 2. Effect of microorganisms and agricultural gypsum on potato yield (t ha^{-1}). T1: control, T2: 40 kg ha^{-1} of Ca + *T. harzianum*, T3: 40 kg ha^{-1} of Ca + *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*.

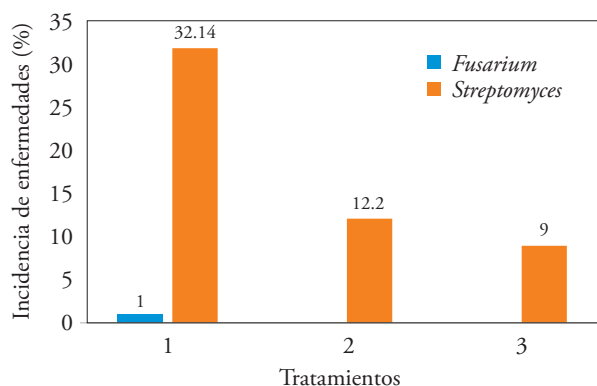


Figura 3. Incidencia de *Fusarium* y *Streptomyces* en tres tratamientos aplicados al cultivo de papa. 1: testigo, 2: 40 kg ha^{-1} de Ca + *T. harzianum*, 3: 40 kg ha^{-1} de Ca + *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. fluorescens*, *T. harzianum*.

Figure 3. *Fusarium* and *Streptomyces* incidence in three treatments applied to the potato crops. 1: control, 2: 40 kg ha^{-1} of Ca + *T. harzianum*, 3: 40 kg ha^{-1} of Ca + *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. fluorescens*, *T. harzianum*.

donde los bacilos se utilizan como antagonicos ante microorganismos precursores de enfermedades como lo mostraron Sharga y Lyon (1998), al usar *B. subtilis* para inhibir el crecimiento del *Pectobacterium carotovorum* que causa la podredumbre blanda en la papa. Ezziyyani *et al.* (2004) usaron como biocontrol a *Trichoderma harzianum* frente a *Phytophthora capsici* causante de la “tristeza” en el cultivo de pimiento verde, obteniendo resultados de inhibición de hasta 65 % en macetas y 80 % en invernadero. Si a todo lo anterior, se suma que *Pseudomonas spp.* también se ha demostrado que tiene poder antagonico para diversos microorganismos patógenos, según Walsh *et al.* (2001).

Los macro y micronutrientes en hoja se cuantificaron en valores cercanos a los promedios referenciados. Los contenidos de Cu fueron superiores a los documentados por Jones *et al.* (1991), debido al tratamiento preventivo con $\text{Cu}(\text{OH})_2$ para posibles enfermedades en el cultivo de papa. En T3 la concentración de P fue superior a los valores estándar, debido a que *P. fluorescens* produce metabolitos solubilizadores de P que lo hace disponible para la planta. Katiyar y Goel (2003) indicaron que la presencia de *Pseudomonas* aumenta las concentraciones de P porque solubiliza los fosfatos inorgánicos. En el caso de N, la acción solubilizadora de los microorganismos permitió su absorción y transporte eficiente, lo que condujo al llenado del tubérculo, productividad alta y su concentración en el tejido foliar en los niveles documentados por Jones *et al.* (1991) y Gilletto *et al.* (2010); en este caso el índice verde, en unidades de clorofila, fue 40 (Cuadro 4).

Análisis microbiológico del suelo de la rizósfera

El recuento viable de la microflora de cada tratamiento se realizó a los 50 y 90 d de la emergencia, y se determinó el número de microorganismos por g de peso seco. Este mostró que las condiciones ambientales y nutrimentales fueron aceptables para el desarrollo óptimo y prevalencia en el suelo rizosférico (Cuadro 5).

Las poblaciones de microorganismos en los tratamientos en este estudio fueron similares a los de González *et al.* (1999), cuantificados en rizosfera, de $4.3 \times 10^5 \pm 17\ 460$ (microorganismos g^{-1} de suelo seco) de papas tratadas con conidias de *T. harzianum*.

The macro and micronutrients in leaf were quantified in values close to the referenced averages. The Cu contents were superior to those documented by Jones *et al.* (1991), due to preventive treatment with $\text{Cu}(\text{OH})_2$ for possible diseases in potato crops. At T3 P concentration of was higher than the standard values, this is due to the fact that *P. fluorescens* produces P solubilizing metabolites that make it available for the plant. Katiyar and Goel (2003) indicated that the presence of *Pseudomonas* increases P concentrations because it solubilizes inorganic phosphates. In the N case, the solubilizing action of the microorganisms allowed its absorption and efficient transport, which led to tuber filling, high productivity and its concentration in leaf tissue at levels documented by Jones *et al.* (1991) and Gilletto *et al.* (2010); in this case the green index in units of chlorophyll, was 40 (Table 4).

Rhizosphere soil microbiological analysis

The viable count of the microflora from each treatment was assessed at 50 and 90 d from the emergence, and the number of microorganisms per g of dry weight was determined. This showed that environmental and nutrient conditions were acceptable for optimal development and prevalence in rhizospheric soil (Table 5).

The microorganism populations in the treatments in this study were similar to those reported by González *et al.* (1999), quantified in rhizosphere. These were of $4.3 \times 10^5 \pm 17\ 460$ (microorganisms g^{-1} of dry soil) of potatoes treated with conidia of *T. harzianum*.

Reinoso *et al.* (2006) indicated that bacteria of the *Bacillus* genus are part of a group with an important inhibitory effect on the growth of *P. carotovorum*, which is the causal agent of soft potato rot. Sharga and Lyon (1998) obtained similar results for the inhibition of this pathogen with *Bacillus subtilis*. Therefore, it is important that these microorganisms are present in the rhizosphere.

Quality test for potato frying

In T3, 1 % the sample showed internal, external and discoloration damages and contrasted with 5 % of T1 and T2, but all treatments complied with the maximum damage value, which is 10 % in the leaflets.

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de microorganismos y yeso agrícola en el contenido nutrimental de la hoja de papa (*Solanum tuberosum* L.).

Table 4. Effect of the application of microorganisms and agricultural gypsum on the nutritional content of potatoes leafs (*Solanum tuberosum* L.).

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Zn	Mn
	(%)					(ppm)			
Testigo	2.4	0.20	6.1	1.32	0.75	232	20	24	80
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ <i>T. harzianum</i>	3.09	0.32	5.7	1.19	1.22	48	132	32	280
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ (<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>T. harzianum</i>)	3.84	0.68	6.5	1.76	1.17	182	44	88	160
Referencia †	3.0-4	0.25-0.4	6.00-8.0	1.5-2.5	0.70-1.0	7.0-20	40-100	30-200	30-250

† Jones *et al.* (1991).

Cuadro 5. Microorganismos viables aplicados directo al suelo con cultivo de papa, a los 50 y 90 días después de la emergencia (UFC g⁻¹ de suelo seco).

Table 5. Viable microorganisms directly applied to soil with potato culture, at 50 and 90 days after emergence (CFU g⁻¹ of dry soil).

Tratamiento	Cuenta de microorganismos viables (UFC g ⁻¹ de suelo)			
	<i>B. Subtilis</i>	<i>B. Cereus</i>	<i>Pseudomona</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
Testigo	†	†	†	†
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ <i>T. harzianum</i>	†	†	†	1.0×10 ⁴ ††1.0×10 ⁴
40 kg ha ⁻¹ de Ca+ (<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>T. harzianum</i>)	7.9×10 ⁴ ††1.02×10 ⁵	2.0×10 ³ ††6×10 ⁵	3.0×10 ⁵ ††2.9×10 ⁶	1.0×10 ⁴ ††1.0×10 ⁴

†No detectado; †† conteo 90 días. ❖ † Not detected; †† count at 90 days.

Reinoso *et al.* (2006) indicaron que las bacterias del género *Bacillus* integran un grupo con efecto inhibitorio importante en el crecimiento de *P. carotovorum*, que es el agente causal de la pudrición blanda de la papa. Sharga y Lyon (1998) obtuvieron resultados similares de inhibición de este patógeno con *Bacillus subtilis*. Por lo tanto, es importante que estos microorganismos estén presentes en la rizósfera.

Prueba de calidad de fritura de la papa

En T3, 1 % la muestra mostró daños internos, externos y decoloración y contrastó con el 5 % de T1 y T2, pero todos los tratamientos cumplieron

CONCLUSIONS

The application of the microbial consortium with agricultural gypsum under shade house positively affects the overall development of the crop on its productivity, although the quality of potatoes does not significantly increase.

—End of the English version—



con el valor máximo de daño, que es 10 % en las hojuelas.

CONCLUSIONES

La aplicación del consorcio microbiano con yeso agrícola bajo casa sombra, afecta positivamente el desarrollo integral del cultivo sobre la productividad, aunque la calidad de papa no aumenta considerablemente.

LITERATURA CITADA

- Abril A. 2003. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral* 13: 195-204.
- Alcántar G., G., y M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Publicación Especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 156 p.
- Atlas, R. M. 1984. Diversity of microbial communities. *In*: K. C. Marshall (ed). *Advances in Microbial Ecology* 7: 1-47. Plenum Press, New York, USA.
- Bashan, Y., L. E. de-Bashan, S. R. Prabhu, and J. P. Hernandez. 2014. *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013)*. *Plant Soil* 378: 1-33.
- Calvo P., y D. Zúñiga. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol. Apl.* 9: 31-39.
- Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 14: 15-31.
- Cubillos-Hinojosa J., L. Mejía, y N. Valero. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agron. Colomb.* 27: 81-86.
- Elein T., A., Á. Leyva, y A. Hernández. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 7: 47-54.
- Ezziyany M., C. Pérez-Sánchez, A. Sid-Ahmed, M. E. Requena, y M. E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *An. Biol.* 26: 35-45.
- Gambaudo, S. 2006. Calidad del yeso natural para uso agrícola. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información Técnica de Cultivos de Verano. Campaña 2006. *Pub. Miscelánea* 6: 110-113.
- Giletto C., M, C. Díaz, J. E. Rattín, H. E. Echeverría, and D. O. Caldiz. 2010. Green index to estimate crop nitrogen status in potato processing varieties. *Chil. J. Agric. Res.* 70: 142-149.
- González S., L. Rodríguez, C. Arjona, A. Puerta, y M. Fonseca. 1999. Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizósfera de Solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. *Invest. Agrar. Produc. Invest. Veg.* 14: 297-30.
- Gupta, V.P., H., Bochow, S. Dolej and I. Fischer. 2000. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against Fusarium wilt. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.* 107: 145-154.
- Hernández-Leal, T. I., G. Carrión, y G. Heredia. 2011. Solubilización *in vitro* de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia* 45: 881-892.
- Izzeddin N., y L. Medina. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus* 15: 8-12.
- Jiménez C., N. S. de Albarracín, G. Altuna, y M. Alcano. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Rev. Fac. Agron. LUZ* 28: 1-10.
- Jones, Jr. J. B., B. Wolf, and H. A. Mills. 1991. *Plant Analysis Handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Micro-Macro Publishing, Inc., Athens, Georgia, USA. pp:184-185
- Katiyar V., and R. Goel. 2003. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Res.* 158: 163-168.
- Molina-Romero D., M. Bustillos-Cristales, O. Rodríguez-Andrade, Y. Morales-García, Y. Santiago-Saenz, M. Castañeda-Lucio, y J. Muñoz-Rojas. 2015. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas* 17: 24-34.
- Patíño-Torres, C. O., y O. E. Sancelmente-Reyes. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado* 10: 288-297.
- Pepper I., L., and C. P. Gerba. 2004. *Environmental Microbiology a Laboratory Manual*. 2a. ed. Elsevier Academic Press. USA, 197 p.
- PEPSICO Alimentos México. 2014. Muestreo y análisis de papa en campo. 7a ed. México. pp: 31.
- Pozo C., M. 1997. Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. Producción de Tubérculos-semillas de Papa Manual de Capacitación. Fascículo 2.3 Centro Internacional de la Papa.
- Puente M., J. García, E. Rubio, y A. Peticari. 2010. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados como inoculantes en trigo. *INTA EEA Rafaela, Pub. Miscelánea* 116: 39-44.
- Reinoso P., R. Casadesús, S. García, P. Gutiérrez, y R. Álvarez. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10: 187-191.
- Sharga B., and G. Lyon. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 As an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria, *Can. J. Microbiol.* 44: 777-783.
- Uribe D., E. Ortiz, M. Portillo, G. Bautista y J. Cerón. 1999. Diversidad de *Pseudomonas* fluorescentes en cultivos de papa de la región cundiboyacense y su actividad antagonista *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2: 50-58.
- Walsh U., F., J. P. Morrissey, and F. O'Gara. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotech.* 12: 289-295.