

Artículo científico

Evaluación de crecimiento y desempeño productivo del cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) inoculado con *Azospirillum brasilense*

Evaluation of growth and productive performance of the strawberry crop (*Fragaria x ananassa* Duch.) inoculated with *Azospirillum brasilense*

E.L. Villagra^{1*}; J.A. Max¹; L.M. Toffoli²; R.O. Pedraza³

¹ Cátedra Horticultura, Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ-UNT), Universidad Nacional de Tucumán. Florentino Ameghino S/N, Finca El Manantial (T4104AUD), Tucumán, Argentina. *E-mail: villagraelizabeth@gmail.com

² INTA EEA Famaillá. Ruta Prov. 301 Km 32, Famaillá (4132). Tucumán, Argentina.

³ Cátedra Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ-UNT), UNT. Florentino Ameghino S/N, Finca El Manantial (T4104AUD), Tucumán, Argentina.

Resumen

La tendencia mundial en agricultura es disminuir la contaminación ambiental, causada por agroquímicos. Argentina, es el tercer productor sudamericano de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) y tiende a la reducción del empleo de insumos de síntesis, así como a la búsqueda e incorporación paulatina de productos alternativos, caso de los bioinsumos. En este estudio, se evaluó el crecimiento y desempeño productivo de frutilla inoculada con cepas nativas de *Azospirillum brasilense*, como alternativa para promover crecimiento vegetal, producción y una nutrición amigable con el medio ambiente. Se trabajó en Finca El Manantial, Tucumán. Se usaron dos cepas: REC3 (endofítica, aislada de *F. x ananassa*) y 2A1 (aislada de *Petunia* sp.). Los plantines del cultivar 'Camino Real' fueron inoculados de manera independiente, por inmersión radicular en suspensión bacteriana (10^6 UFC·ml⁻¹). Sobre mesones revestidos con polietileno negro, se implantó en contenedores plásticos (2 l) y al aire libre. Los tratamientos fueron: plantas sin inocular; plantas inoculadas con REC3 y plantas inoculadas con 2A1. Se evaluaron parámetros morfo-fisiológicos de plantas y rendimiento de frutos (comercial y total). Con diseño totalmente aleatorizado (3x3), mediante ANOVA y Test de Tukey, se determinó que la inoculación tuvo efecto promotor del crecimiento en plantas. Se evidenció la asociación *A. brasilense*-planta y respuesta según el origen de las cepas. REC3 y 2A1 superaron al control. REC3 logró un rendimiento comercial de frutos 14 % mayor a 2A1. Hubo interacción T-cv. y especificidad con genotipo. Es preciso profundizar estudios sobre manejo/acción de *A. brasilense*, para incrementar uso/beneficio en la producción comercial de frutilla.

Palabras clave: Sustentabilidad; Bioinsumos; *Fragaria x ananassa*; Crecimiento; Rendimiento.

Abstract

The global trend in agriculture, is to reduce environmental pollution caused by agrochemicals. Argentina is the third South American producer of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) And it tends to reduce the use of synthetic inputs, as well as the search and gradual incorporation of alternative products, in case of the bio-inputs. In this study, the growth and productive performance of strawberries were evaluated, inoculated with native strains of *Azospirillum brasilense*, as an alternative to promote plant growth, production and environmentally friendly nutrition. Work was done at Finca El Manantial, Tucumán. Two strains were used: REC3 (endophytic, isolated from *F. x ananassa*) and 2A1 (isolated from *Petunia* sp.). The cultivar 'Camino Real' were inoculated independently, by root immersion in bacterial suspension (10^6 CFU·ml⁻¹). On tables lined with black polyethylene, it was implanted in plastic pots (2 l) and in the open air. The treatments were: uninoculated plants; plants inoculated with REC3 and plants inoculated with 2A1. Morpho-physiological parameters of plants and fruit yield (commercial and total) were evaluated. With totally randomized design (3x3), by ANOVA and Tukey's Test, it was determined that the inoculation had a growth-promoting effect on plants. The association *A. brasilense*-plant and response according to the origin of the strains was evidenced. REC3 and 2A1 outperformed the control. REC3 achieved a commercial fruit yield 14 % higher than 2A1. There was T-cv, interaction and genotype specificity. It is necessary to deepen studies on the management/action of *A. brasilense*, to increase use/benefit in the strawberry commercial production.

Keywords: Sustainability; Bio-inputs; *Fragaria x ananassa*; Plant growth; Fruit yield.

Recibido: 19/05/21; Aceptado: 23/06/21.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Introducción

La frutilla moderna (*Fragaria x ananassa* Duch.) es un híbrido octoploide, producto de la cruce entre *F. virginiana* D. proveniente de sotobosques y *F. chiloensis* L. originaria de playas y ambientes luminosos de Chile. Especies progenitoras de ambientes tan disímiles le confieren alta variabilidad y capacidad de adaptación (Larson, 1994). Es un cultivo hortícola, incorporado al grupo de frutas finas y de importancia mundial. Las frutas finas, constituyen uno de los grupos de productos más dinámicos del comercio alimentario de la última década y de importancia en las regiones templadas de producción (Von Bernard y Obschatko, 2003). Según estadísticas de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), el 80 % de la producción mundial se concentra en China, Estados Unidos, México, Egipto, Turquía, España, Corea y Polonia y el 20 % restante, se distribuye en más de 60 países, entre los cuales, se encuentra Argentina, ocupando el 34^{vo} lugar como productor y 17^{vo} como exportador mundial de frutilla (FAO, 2015). Argentina es el tercer productor de Sudamérica, con aproximadamente 1.300 hectáreas y una producción de 45.500 t. Las provincias con mayores superficies y producción de frutilla son Buenos Aires, Tucumán, Santa Fe, Jujuy y Corrientes. Las tres primeras, representan alrededor del 70 % de la producción nacional. Cerca del 60 % de la fruta se consume fresca y el 40 % se procesa (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2018). Esta distribución posibilita que el consumidor se abastezca de frutos frescos prácticamente todo el año. La mayor producción se realiza en época invernal, con cosechas periódicas de junio a noviembre (Kirschbaum y Mamaná, 2008). Las preferencias del consumidor y los rendimientos en frutos, generan que los cultivares de días cortos e indiferentes al fotoperíodo, sean los más usados en el país (Rodríguez *et al.*, 2009; Undurraga y Vargas, 2013; Kirschbaum *et al.*, 2017). En el mercado global las exigencias de los consumidores en cuanto a calidad del producto, se incrementaron por el aumento de la información, nuevas variedades y ofertas variadas (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2018). En el año 2018, Tucumán tuvo muy buen desempeño productivo y comercial, así, el volumen de frutilla congelada provincial, representó el 85 % de la fruta exportada a nivel nacional. En tanto, ocupó el segundo lugar, en el

volumen total de fruta ingresada al Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) (Boletín de Frutas y Hortalizas y Corporación de Mercado Central de Buenos Aires, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020). En la provincia se implantaron 340 hectáreas de frutilla que produjeron 10000 t de fruta. El polo frutillero por excelencia se ubica en Lules, seguido por los departamentos de Famallá, Monteros, Chicligasta y Tafí del Valle, siendo esta última, la zona de producción estival, en contra estación (Kirschbaum, 2020). El cultivo de frutilla reviste importancia en Tucumán, por su valor económico-social, desde el punto de vista de generación de ingresos y por el carácter intensivo en el uso de mano de obra para la producción de frutos, con destino a mercados de consumo en fresco y/o procesados. Al ser una provincia exportadora de frutilla, debe usar adecuadamente los agroquímicos, a fin de mantener la calidad del producto. El uso inadecuado no sólo puede afectar la salud humana, sino también el futuro provincial como proveedora de fruta fresca y congelada, tanto para el mercado nacional, como para exportación.

La agricultura actual, evidencia la tendencia mundial y la necesidad de disminuir la contaminación ambiental causada por agroquímicos; estos insumos pueden incrementar los costos de producción, con el consiguiente encarecimiento y a veces, menor disponibilidad de alimentos y pérdidas en los ingresos de los productores (Tan *et al.*, 2005; Adesemoye *et al.*, 2009; Camelo *et al.*, 2011; Choudhary *et al.*, 2011; Palencia *et al.*, 2013; FAO, 2015; Vejan *et al.*, 2016; Olanrewaju *et al.*, 2017). El cultivo convencional de frutilla es dependiente de insumos externos, fundamentalmente agro insumos de síntesis (pesticidas, herbicidas y fertilizantes). De esta manera, el desbalance en los fertilizantes sintéticos empleados, puede generar un impacto ambiental negativo por contaminación de suelos, agua, ambiente y calidad agroalimentaria de los frutos (Armada *et al.*, 2014; Lovaisa *et al.*, 2016; Vejan *et al.*, 2016; Kirschbaum *et al.*, 2019). Es por ello, que se planteó la necesidad de incorporar modificaciones en cuanto a manejo agronómico e insumos, a fin de lograr un sistema productivo sustentable en los aspectos ambientales, económicos, sociales y que, a la vez, sea sostenible en el tiempo. Argentina muestra una tendencia creciente a reducir el uso de agroquímicos e incorporar bioinsumos en la producción de alimentos tales como, cereales y legumbres, entre otros cultivos (Díaz-Zorita *et al.*,

2015). En este marco, la FAO promovió la construcción de una visión común entre los países, para la producción de alimentos a partir de una agricultura sostenible y planteó el uso de microorganismos para el reciclaje de nutrientes (FAO, 2015). Por lo que, una alternativa para la disminución del uso de los fertilizantes de síntesis, lo constituye la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (por su sigla en inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*), como *Azospirillum*, entre otros géneros bacterianos, que colonizan la zona radicular (rizósfera) y/u otros tejidos de la planta huésped y poseen capacidad para estimular o promover su crecimiento (Bashan, 1998; Bashan y de-Bashan 2010; Bashan *et al.*, 2014). Los mecanismos y efectos de estas bacterias en el crecimiento de las plantas y en la productividad son directos, por ejemplo: solubilización de fósforo, fijación biológica de nitrógeno, aumento en la disponibilidad de nutrientes (Dobbelaere *et al.*, 2003; Tortora *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2012; Glick, 2012; Guerrero-Molina *et al.*, 2013; Olanrewaju *et al.*, 2017; Pedraza *et al.*, 2020) o indirectos, por ejemplo: biocontrol de patógenos o competición (Bashan y Holguín, 1998; Tortora *et al.*, 2011; Pedraza *et al.*, 2020). Su distribución es generalizada en el medio ambiente, tanto en las regiones tropicales, subtropicales, como templadas y coloniza más de 100 especies vegetales (Pedraza *et al.*, 2020). Esto genera que estas bacterias sean capaces de mejorar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica y constituyan una alternativa que posibilite la utilización de un proceso amigable con el ambiente y la eliminación y/o disminución de severos problemas de contaminación. Numerosos estudios realizados en condiciones controladas de laboratorio, en invernadero y en campo, demostraron que *Azospirillum* puede promover el crecimiento de las plantas y mejorar el rendimiento de los cultivos, incluida la asociación con frutilla (Bellone *et al.*, 1995; Kirschbaum, 1999; Pedraza *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2014; Lovaisa *et al.*, 2016; Pedraza *et al.*, 2020). En la provincia de Tucumán, *A. brasilense* fue aislado de distintos tejidos de plantas de frutilla (Pedraza *et al.*, 2007) y de plantas ornamentales como *Petunia* sp. (Toffoli *et al.*, 2021). En el trabajo con frutilla, se demostró la ocurrencia y colonización natural de diferentes partes de las plantas por *A. brasilense* en el área de cultivo provincial. Los aislamientos se llevaron a cabo en el cultivar ‘Ca-

marosa’, del cual se aislaron diferentes cepas bacterianas, de la superficie de las raíces (RLC), de tejidos radiculares internos (REC), así como de pecíolos y estolones del cultivar (PEC). Luego de la caracterización microbiológica y molecular (ARDRA) se determinó que los aislamientos pertenecían a la especie *A. brasilense*. Las cepas locales mostraron tres características importantes dentro del grupo PGPB: fijación de nitrógeno, producción de sideróforos e indoles (Pedraza *et al.*, 2007). En el caso de la planta ornamental, para evaluar la presencia natural de *A. brasilense* en plantas de petunia y la capacidad para mejorar el crecimiento y floración, se aislaron cepas locales y se caracterizaron por métodos bioquímicos y moleculares. Se evaluaron tres cepas en condiciones de invernadero 2A1, 2A2 y 2E1, las cuales fueron inoculadas independientemente, por inmersión radicular en una suspensión bacteriana ($\sim 10^6$ UFC·ml⁻¹). Se trabajó con plantas testigo y con plantas con fertilización química. Como resultado, cinco aislados fueron caracterizados como *A. brasilense*, mostrando capacidad para producir indoles y sideróforos, solubilizar fosfato, actividad nitrogenasa y la amplificación de *nifH*-PCR. En general, todos los parámetros del cultivo fueron mejorados en las plantas inoculadas, con variaciones entre las cepas, en comparación con las plantas no inoculadas o fertilizadas (Toffoli *et al.*, 2021). Por otro lado, se destaca que fue secuenciado el genoma completo de la cepa denominada REC3 de *A. brasilense*, utilizando la plataforma Illumina HiSeq (Fontana *et al.*, 2018). En un estudio realizado en México, se evaluó el efecto de la fertilización química y con *A. brasilense* sobre los parámetros crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de frutos de frutilla. Se emplearon los tratamientos: *A. brasilense* a una concentración de $\log 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC)/planta; *A. brasilense* (10^9 UFC/planta) + fertilización química; fertilización química y un testigo o control. La concentración de *A. brasilense* empleada, no tuvo efectos o inhibió el crecimiento y rendimiento de la frutilla, hubo baja producción de biomasa, reducción de tamaño y del peso de frutos. Se observó que la bacteria fue superada por la fertilización química, e incluso hubo valores inferiores al testigo. Por lo cual, los autores sugirieron emplear una concentración inferior en futuras investigaciones, sin precisar cuál (Castañeda-Saucedo *et al.*, 2013). En contraste, otros estudios demostraron que la incorporación

de biofertilizantes o bioinsumos, puede mejorar los rendimientos del cultivo de frutilla (Pešaković *et al.*, 2013). Así, en ensayos realizados en Tucumán, se encontró que la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en frutilla, cultivar ‘Camarosa’, produjo aumentos en los volúmenes de rendimientos de frutos totales y frutos comerciales, aunque no significativos desde un punto de vista estadístico. En ese ensayo, se trabajó con cepas aisladas de raíces de frutilla (RLC1-rizosférica y REC3-endofítica) y de estolón (PEC5), las cuales fueron inoculadas independientemente por inmersión radicular. Los rendimientos (g/planta) fueron con la cepa RLC1: 560; con REC3: 501; con PEC5: 564 y con el Testigo: 489 (Salazar *et al.*, 2011). Otro estudio, demostró que plantas tratadas con *A. brasilense* (cepas RLC1 y REC3, de manera independiente) incrementaron el rendimiento total de fruta en el primer año, aunque las plantas no exhibieron un crecimiento vegetativo excesivo (Salazar *et al.*, 2012). Kirschbaum y colaboradores (2019), establecieron que los bioestimulantes podrían reducir el uso de fertilizantes químicos en frutilla, contribuyendo a la sostenibilidad del agro-ecosistema, aunque destacó la necesidad de nuevos estudios para validar estas observaciones, en condiciones de campo. Por lo expuesto, resulta evidente la abundante información sobre el cultivo, las PGPB y diferentes cepas de *A. brasilense* aisladas y caracterizadas a nivel local y empleadas en trabajos tanto, bajo condiciones controladas o no y, sobre todo, junto con insumos de síntesis para la producción de frutos. En este estudio en particular, no se emplearon insumos de síntesis química y surge a fin de evaluar el crecimiento vegetal y el desempeño productivo de frutilla cultivar ‘Camino Real’, inoculado con dos cepas nativas de *A. brasilense*, como alternativa para promover el crecimiento vegetal, la producción de frutos y una nutrición amigable con el ambiente.

Materiales y métodos

Ubicación

El ensayo se realizó en el predio de la Cátedra Horticultura de la Facultad de Agronomía y Zootecnia-UNT en Finca El Manantial; Departamento Lules, en la provincia de Tucumán, Argentina (26°55' S, 65°20' W y 426 m de altitud). Se ubicó en la zona agroecológica de la Llanura Chaco

Pampeana sub húmeda-húmeda, con evapotranspiración de 800-900 mm aproximadamente y con balance hídrico positivo. La temperatura media anual es de 18,9° C con suelo Argiudol típico y drenaje moderado a bueno. El suelo posee buen contenido de materia orgánica y fertilidad, con resistencia al planchado y buen drenaje (Zuccardi y Fadda, 1985). Constituye una de las principales áreas de producción de cultivos hortícolas y frutales menores, entre los cuales se encuentra la frutilla.

Material vegetal

Se trabajó con plantines frescos estándar -sin hojas y con raíz desnuda- provenientes de viveros comerciales del sur del país, de la variedad ‘Camino Real’ (cultivar de día corto, que precisa fotoperíodo inferior a 14 horas de luz para la inducción floral y fructificación y catalogado como “tardío” para la producción de fruta).

Inóculo

Para la etapa pre-plantación se utilizaron dos cepas de *A. brasilense* (Figura 1a): cepa 1: REC3, cepa endofítica de frutilla aislada y caracterizada en la provincia (Pedraza *et al.*, 2007) y cepa 2: denominada 2A1, aislada a partir de raíces en plantas de *Petunia* sp.; también aislada y caracterizada en Tucumán (Toffoli *et al.*, 2021). El inóculo se preparó a partir de un cultivo puro de las cepas REC3 y 2A1 de *A. brasilense*, sembrando una unidad formadora de colonia (UFC) de cada cepa en medio de cultivo malato semisólido libre de N (NFb) (Baldani *et al.*, 2014) e incubado 36-72 h a 30 °C. Se ajustó la concentración final del inóculo a una $DO_{560}=0,2$ que corresponde aproximadamente a 10^6 UFC·ml⁻¹ (Toffoli *et al.*, 2021).

Inoculación

Los plantines fueron inoculados sumergiendo las raíces en cada una de las suspensiones bacterianas de *A. brasilense* (10^6 UFC·ml⁻¹) durante 30 minutos (Figura 1b). Luego, las raíces fueron escurridas durante 10 segundos e inmediatamente se efectuó la plantación en macetas. Para el tratamiento T1 (testigo o control) sin inoculación, las

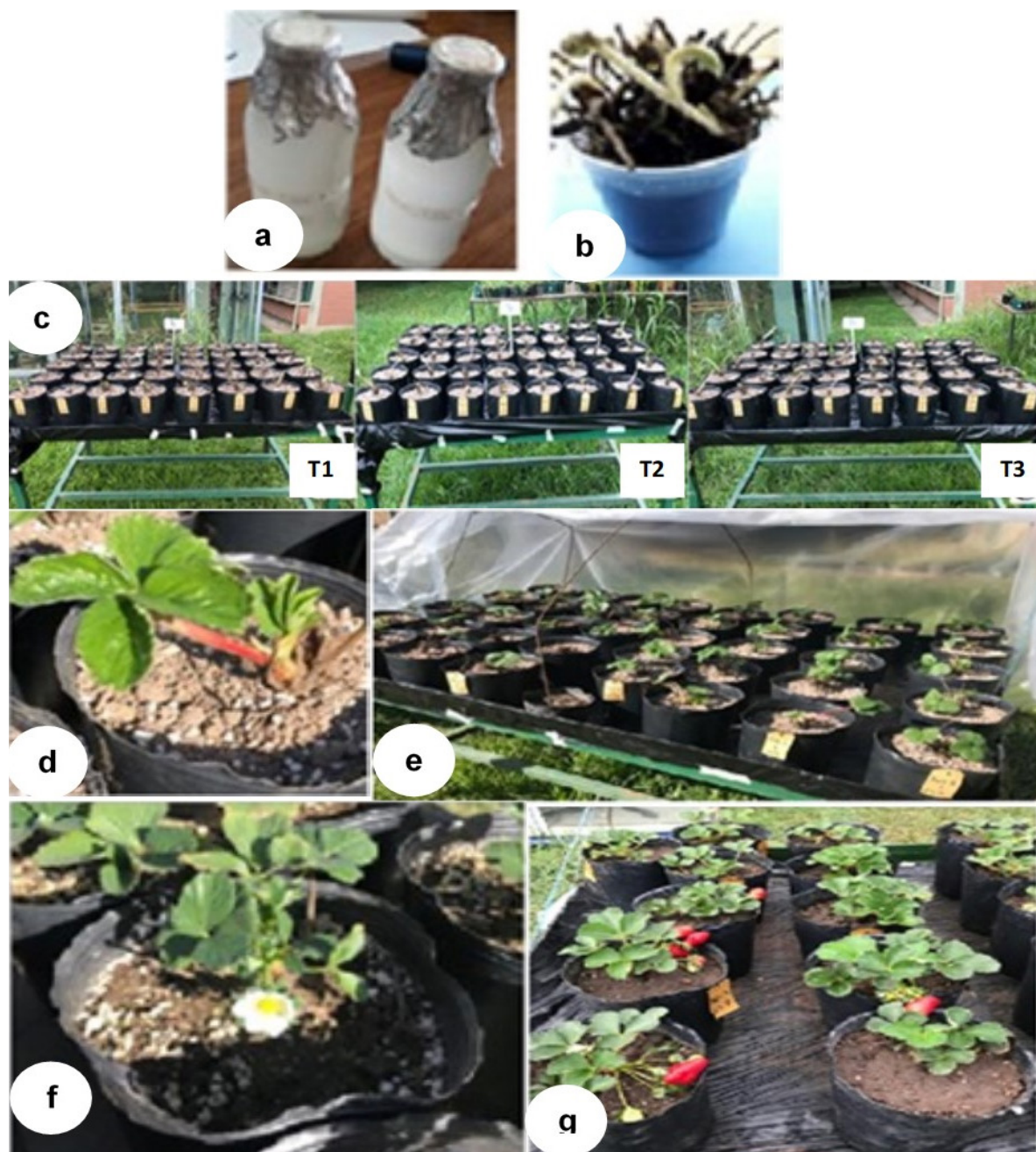


Figura 1. Ensayo de inoculación de plantas de frutilla cv. 'Camino Real' con *Azospirillum brasilense* REC3 o *A. brasilense* 2A1. a: inoculantes líquidos de ambas cepas. b: inoculación por inmersión de raíces en una suspensión de 10^6 UFC.ml⁻¹. c: implantación del ensayo (02/05/2018) y tratamientos aplicados; T1 (control sin inoculación); T2 (inoculado con REC3); inoculado con 2A1. d: planta a los 4 días de su implantación. e: plantas inoculadas con REC3 a los 14 días de implantación. f: planta inoculada con 2A1 a los 77 días de implantación en inicio de floración (IF). g: fructificación en plantas inoculadas con REC3 (inicio de agosto).

raíces de los plantines fueron sumergidas en agua destilada igual tiempo, escurridas y de inmediato se realizó la plantación.

Plantación

Previo a la implantación, se efectuó el análisis físico-químico del suelo que se utilizó en la prepa-

ración del sustrato. El muestreo de suelo consistió en dividir en cinco puntos el terreno (extremos y centro) y extraer muestras individuales hasta una profundidad de 0,30 m. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de la Cátedra Edafología de FAZ-UNT. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de suelo. Determinación cuali y cuantitativa de la muestra obtenida en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018).

Parámetro	Valor
pH	6,6
CE (dS/m)	0,2
MO (%)	2,13
N Total (%)	0,1
CIC (cmolc/kg)	13,9
Ca (cmolc/kg)	6
Mg (cmolc/kg)	0,6
K (cmolc/kg)	1,3
Na (cmolc/kg)	0,3

CE: conductividad eléctrica del extracto de saturación; MO: materia orgánica (método de Walkley – Black); N Total: nitrógeno total (método de Kjehldal); CIC: capacidad de intercambio catiónico.

El ensayo se condujo en contenedores y al aire libre, en condiciones naturales. En la etapa previa y posterior a la plantación no se aplicaron agroinsumos de síntesis química (no se practicó desinfección de suelo, aplicación de fertilizantes ni biocidas). La plantación se realizó el 02 de mayo de 2018, en macetas de plástico soplado comerciales, número 12 (2 l). El sustrato para el llenado de los contenedores estuvo compuesto por una mezcla de suelo de El Manantial (Tabla 1), arena y perlita agrícola en una proporción de 2:0,5:0,5 respectivamente. Las macetas o contenedores se colocaron sobre tres mesones cubiertos con plástico negro, de 1 m de ancho por 1,5 m de largo cada uno. La frecuencia de riego fue de tres a cinco veces/semana, para mantener la humedad a capacidad de campo del sustrato; para ello, se aplicó una lámina casi constante de 0,02 m de altura por mesón donde se encontraban las macetas. Entre el 30 de mayo y el 04 de setiembre de 2018, el ensayo se cubrió con microtúneles de polietileno cristal de 100 μ de espesor, para proteger al cultivo de posibles heladas.

Diseño estadístico

El diseño experimental del ensayo fue completamente aleatorizado (DCA). Se emplearon 40 plantas/tratamiento. Los tratamientos (T), como se muestra en la Figura 1c, fueron: T1: Plantas sin inocular (Testigo o control); T2: Plantas inoculadas con cepa 1: REC3; T3: Plantas inoculadas con cepa 2: 2A1.

Parámetros morfo-fisiológicos de crecimiento y desarrollo

Las variables evaluadas fueron: número de hojas por planta (NH), inicio de floración (IF), inicio de cosecha (IC), número de frutos por planta (NF), peso medio de frutos comerciales (PMFC), diámetro medio de frutos comerciales (DMFC), porcentaje de frutos eliminados o podridos (% FP) y peso total de frutos/planta (rendimiento total, incluyendo descarte y frutos con valor comercial). El NH se obtuvo por conteo cada 10 días. Para IF e IC, se registraron las fechas, considerando días desde plantación como referencia. El NF se obtuvo por conteo de todos los frutos cosechados por planta (inoculadas o no). Para el PMFC, indicador de calidad de fruta, se estableció como comercial a todo fruto con ≥ 75 % de superficie color rojo, peso ≥ 10 g, sano y sin deformaciones; el PMFC se obtuvo al dividir el peso de los frutos comerciales cosechados en cada tratamiento respecto al número total de esos frutos/T. Para el DMFC se clasificaron los frutos según el diámetro ecuatorial en: tamaño chico: < 18 mm; mediano: 18 a 24 mm o grande: > 24 mm. Se midió con calibre. El diámetro medio se obtuvo dividiendo el diámetro de todos los frutos comerciales cosechados en cada T, en la cantidad de esos frutos. El % FP se calculó dividiendo el número de éstos en NF. El rendimiento (expresado en gramos por planta) se obtuvo dividiendo el peso de todos los frutos cosechados/T, en el número de plantas de ese T (Kirschbaum *et al.*, 2014). La frecuencia de cosecha fue de 3 a 4 pasadas por semana entre fines de julio y principios de noviembre. En cada cosecha, se recolectaron todos los frutos maduros de cada T. En cada evaluación se registró el número de plantas o pérdidas por T.

Análisis estadístico de los datos

El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza con posterior test de Tukey con el procesamiento estadístico mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Resultados y discusión

Durante el período de ensayo, se efectuaron determinaciones morfo-fisiológicas para evaluar el

crecimiento vegetal y desempeño productivo de plantas de frutilla inoculadas con dos cepas nativas de *A. brasilense*, en comparación con las plantas no inoculadas. A continuación, se detallan los valores obtenidos según las variables analizadas:

Número de hojas (NH)

Para esta variable se hicieron seis conteos cada 10 días (Figura 2) y se determinó que hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 2). El T2 fue el que presentó el mayor valor, el T1 el menor y el T3 valores intermedios (Figura 3). Desde el punto de vista fenológico, la mayor diferencia en cuanto a número de hojas se evidenció entre los 30 y 40 días de implantación del ensayo (Figuras 1d, 1e y 2). Estos resultados muestran un efecto promotor del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *A. brasilense* con respecto a las plantas sin inocular e indican los efectos benéficos de la bacteria en las condiciones ensayadas.

Inicio de floración (IF)

Los tratamientos inoculados T3 (Figura 1f) y T2 iniciaron floración al cabo de 77 y 79 días desde la plantación respectivamente y mostraron diferencias significativas con respecto a las plantas sin inocular correspondientes al T1 (Tabla 2), cuyo inicio de floración se produjo a los 87 días de la plantación (Figura 4). Estos resultados explican la incidencia de la inoculación sobre el desarrollo y precocidad del cultivo.

Inicio de cosecha (IC)

Desde la implantación del ensayo hasta el inicio de la cosecha de frutos, transcurrieron entre 112 hasta 114 días y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 2). Sin embargo, en algunas plantas de T2 y T3 -inoculadas- se inició la cosecha a los 78 días, siendo las más precoces desde el punto de vista fenológico y si bien, estadísticamente no arrojaron diferencias (Tabla 2 y Figura 1g), se sugiere una asociación positiva bacteria-planta para precocidad en producción de fruta.

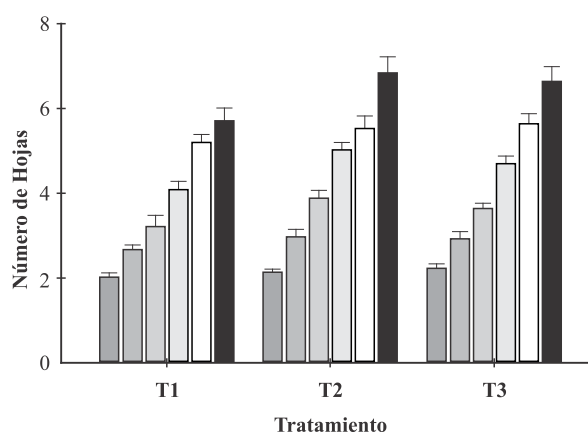


Figura 2. Valores medios resultantes del conteo de número de hojas (NH) por planta/T del cv. 'Camino Real' en seis fechas (60 días) en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018).

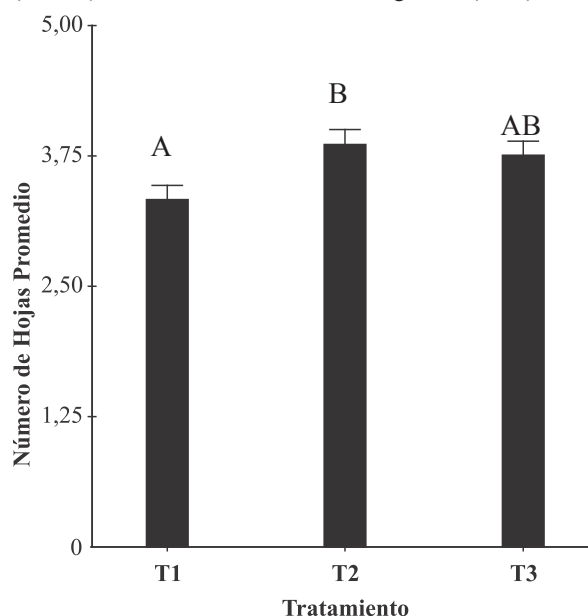


Figura 3. Número de hojas promedio de frutilla cv. 'Camino Real' por tratamiento ensayado en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018). Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Número de frutos/planta (NF)

El número de frutos cosechados con valor comercial en los tratamientos ensayados, tuvo numerosas variaciones. En el análisis de los valores medios se pudo observar que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 2). Las plantas de T2 (REC3) produjeron mayor cantidad de frutos comerciales, mostrando diferencias significativas con respecto a T3 (2A1) e igual comportamiento respecto del (T1) (Figura 5). La diferencia significativa entre el número de frutos en T2 indicaría una asociación genotipo de frutilla - cepa bacteriana (REC3) positiva.

Tabla 2 Análisis de la varianza de las variables consideradas para el cultivo de frutilla cv. ‘Camino Real’ inoculado con dos cepas de *A. brasilense* en comparación con las plantas control no inoculadas para el período de evaluación en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018).

FV	SC	CM	F	p-valor
Número de hojas (NH) por plantas/T	3,19	1,59	4,21	0,0192
Inicio de floración (IF)	1126,45	563,23	8,64	0,0005
Inicio de cosecha (IC)	60,21	30,11	0,29	0,7504
Número de frutos por planta (NF)	40,21	20,11	3,83	0,0268
Peso promedio de frutos comerciales –PMFC	2,30	1,15	0,99	0,3766
Diámetro medio de frutos comerciales (DMFC)	1,47	0,73	0,56	0,5743

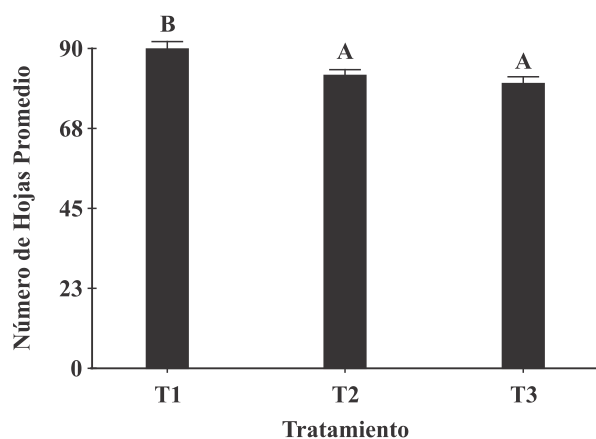


Figura 4. Número de días a inicio de floración (IF) del cv. ‘Camino Real’ según tratamientos en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018). Los valores medios con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

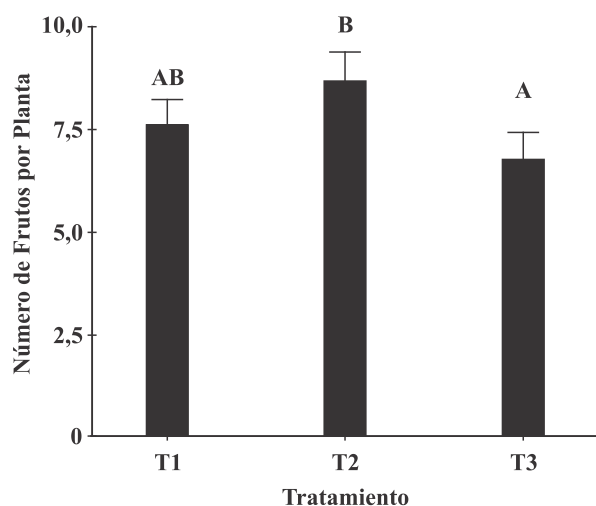


Figura 5. Número de frutos promedio por planta de frutilla (NF) cv. ‘Camino Real’ inoculadas con dos cepas de *A. brasilense* en comparación con plantas no inoculadas, para el período de evaluación en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018).

Peso promedio de frutos comerciales (PMFC)

Esta variable es un importante indicador de calidad de fruta; se estableció como comercial a todo fruto con ≥ 75 % de su superficie de color rojo, ≥ 10 g, sano y sin deformaciones. En el análisis no se

encontraron diferencias significativas entre T1, T2 y T3 (Tabla 2). Sin embargo, se pudo observar durante el período de cosecha evaluado, una alta variabilidad entre pesos de frutos/T, encontrándose desde frutos chicos hasta frutos de 19 g, correspondiendo los valores inferiores a T1, siendo intermedios los de T3 y los de mayor peso los de T2. Estos resultados reafirman la tendencia de la especificidad e influencia positiva de la asociación de la cepa bacteriana REC3 con el genotipo de la planta.

Diámetro promedio de frutos comerciales (DMFC)

En esta variable los mayores valores se encontraron en T2 = 20,18 mm y T3 = 20,24 mm comparado con T1 = 19,90 mm, pero no hubo diferencias estadísticas significativas al comparar el diámetro promedio (Tabla 2). En los tres tratamientos, el diámetro ecuatorial promedio de los frutos comerciales fue de tamaño mediano (18 a 24 mm). Sin embargo, al igual que con los pesos medios de los frutos comerciales, hubo variabilidad en los valores, encontrándose desde frutos de tamaño chico (menor a 18 mm) hasta frutos grandes (mayores a 24 mm). En tanto, los mayores valores de DMFC se encontraron en T2 - T3 (inoculados) respecto a T1 o control.

Porcentaje de frutos podridos

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, los mayores valores correspondieron a plantas inoculadas (T2 = 8,3 % y T3 = 8,5 %) respecto a T1 = 7,8 %).

Rendimiento total de frutos

El período de producción de frutos evaluado en el ensayo abarcó los meses de producción temprana-

na o primicia y parte de estación (julio hasta inicios de noviembre). Los rendimientos expresados en gramos por planta, tanto de frutos con valor comercial como de producción total (comercial y descarte) se extrapolaron a $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. El análisis estadístico de los resultados mostró que existen diferencias significativas entre los rendimientos alcanzados por las plantas de frutilla que fueron inoculadas con la cepa REC3 respecto a las inoculadas con la cepa 2A1 (T3) y el control (T1), como se observa en la Figura 6.

Durante la evaluación realizada en el ensayo no se completaron los datos de rendimientos correspondientes al mes de noviembre (no se efectuó la cosecha), lo que probablemente habría generado incrementos productivos por tratarse de una variedad tardía; sin embargo, al contrastar con valores provinciales promedio, obtenidos en la campaña 2018, con el mismo cultivar, en campo y con manejo convencional (empleando agro-insumos), se obtuvieron los siguientes resultados “rendimiento total de frutos (RT) $23.200 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ y comercial (RC): $21.370 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ” (valores no publicados por variedad, D. Kirschbaum comunicación personal, 2021). Estos niveles de rendimientos también son comparables a los alcanzados por Lovaisa y colaboradores (2016). Los volúmenes de RT y RC alcanzados en el presente estudio, sin empleo de insumos de síntesis, indicarían el efecto benéfico de la inoculación, la interacción y especificidad de la asociación de la cepa REC3 (aislada de frutilla) con el genotipo de la planta. Las plantas inoculadas con la cepa 2A1, quizás por su origen (aislada de petunia), alcanzaron niveles de rendimientos menores a REC3 y aunque logró mayor volumen de fruta que el testigo, no hubo diferencias estadísticas con el mismo. REC3 logró un RC 14 % por encima del alcanzado por las plantas inoculadas con 2A1 y 17 % más que el control. 2A1 superó en 4 % el RC del control. De acuerdo con estos resultados y considerando algunas experiencias citadas en la introducción, en el presente trabajo se empleó una dosis de $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ de *A. brasilense*, la cual demostró ser adecuada y causar efectos positivos sobre parámetros morfo-fisiológicos (de crecimiento) y desarrollo (floración y fructificación) en plantas de frutilla. De esta forma, se obtuvieron resultados contrapuestos a los de Castañeda y colaboradores (2013), quienes emplearon una concentración elevada ($10^9 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) y arribaron a

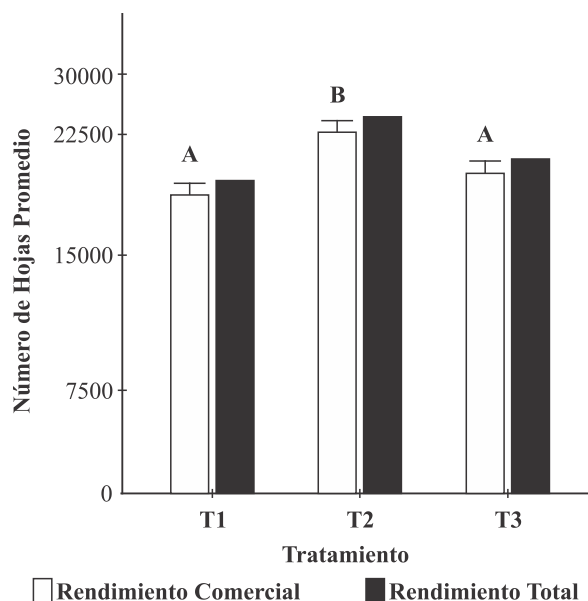


Figura 6. Rendimiento de frutos comerciales (RC) y rendimiento total de frutos (RT) de frutilla cv. ‘Camino Real’ inoculada con cepas nativas REC3 (T2) y 2A1 (T3) o no (T1) en El Manantial, Tucumán, Argentina (2018). Valores medios con misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

resultados negativos para el cultivo.

En ensayos efectuados en Tucumán, Argentina, se estableció que la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en frutilla, los rendimientos no mostraron diferencias significativas entre las plantas del cv. ‘Camarosa’ inoculadas y las no inoculadas, o entre las cepas empleadas (Salazar *et al.*, 2011). En otro estudio, las plantas tratadas con *A. brasilense* (cepa REC3) aumentaron el rendimiento total de fruta en el primer año (Salazar *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta dichos resultados, se coincide con el incremento en rendimientos de frutos totales (comerciales y descarte). En tanto, en este ensayo hubo diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el testigo absoluto, tanto en la etapa de crecimiento, como en precocidad y producción de flores y frutos comerciales. La cepa nativa REC3 tuvo un desempeño diferencial con respecto a la cepa 2A1, lo cual evidencia la interacción tratamiento-cultivar y especificidad de la cepa REC3 con el genotipo de frutilla.

Conclusiones

La inoculación de plantines de frutilla con *A. brasilense*, sin empleo de insumos de síntesis química durante el ciclo de cultivo, mostró efectos positivos como bacteria promotora del crecimiento del cultivo.

En este estudio, se evidencia la asociación *Azospirillum*-planta y respuesta diferencial según el origen de las cepas, tanto en plantas (parámetros morfo-fisiológicos, de crecimiento) como en rendimiento de frutos totales y comerciales. Así, la cepa REC3 (endofítica y aislada de *F. x ananassa*) superó en cuanto a su desempeño, a la cepa nativa 2A1 (aislada de *Petunia* sp.). Esto evidencia interacción tratamiento-cultivar y especificidad de la asociación de la cepa REC3 con el genotipo de la planta.

Existen variaciones en los valores de peso y diámetro promedio de frutos comerciales, según el origen de las cepas.

Los niveles de rendimientos de frutos totales y comerciales resultan alentadores, sin embargo, se considera necesario realizar estudios que permitan profundizar los conocimientos sobre manejo y acción de las cepas locales de *A. brasilense*, para incrementar su efecto benéfico tanto para el suelo como para el cultivo en campo.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), en el marco del Proyecto A621/2 “Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y de un inductor proteico flagelar en el cultivo sustentable de frutilla”. El material vegetal e inóculo fueron aportados por el PNHFA 1106073 (PE INTA). Un reconocimiento especial a los Revisores y Comité Editor por sus valiosos aportes.

Referencias bibliográficas

- Adesemoye A.O., Torbert H.A., Kloepper J.W. (2009). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. *Microbial Ecology* 58; 921-929.
- Armada E., Roldán A., Azcón R. (2014). Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native *Lavandula* and *Salvia* plants species under drought conditions in natural arid soil. *Microbial Ecology* 67, 410-420.
- Baldani J.I., Reis V.M., Videira S.S., Boddey L.H., Baldani V.L.D. (2014). The art of isolating nitrogen fixing bacteria from non leguminous plants using N free semi solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*. 384: 413-31.
- Bashan Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16 (4): 729-770.
- Bashan Y., Holguin G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry* 30 (8-9): 1225-1228.
- Bashan Y., de-Bashan L.E. (2010). Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77-136. In: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8), consulta: mayo 2021.
- Bashan Y., de Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *A Marschner Review - Plant Soil* 378: 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>, consulta mayo 2021.
- Bellone C.H., Bellone S.C., Pedraza, R.O. (1995). Chitinase expression in strawberry root colonized by *Azospirillum brasilense* and V.A. mycorrhiza. En: *Azospirillum* VI Related Microorganisms. Fendrik I.; del Gallo M., Vanderleyden J. Zamaroczy M. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. Alemania. 37: 161-165.
- Boletín de Frutas y Hortalizas - Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. (2019). Panorama del cultivo de Frutilla en Argentina. N° 99. 14 pp. <http://www.mercadocentral.gob.ar/sites/default/files/docs/boletin-INTA-CMCBA-99-frutilla.pdf>, consulta: mayo 2021.
- Calvo P., Nelson L. Kloepper J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383: 3-41.
- Camelo M., Vera S., Bonilla R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12 (2): 159.
- Castañeda-Saucedo M.C., Gómez-González G., Tapia-Campos E., Núñez Maciel O., Barajas-Pérez J.S., Rujano-Silva M.L. (2013). Efecto de *Azospirillum brasilense* y fertilización química sobre el crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch). *Interciencia* 38 (10): 737-744.
- Choudhary D.K., Sharma K.P., Gaur R.K. (2011). Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology Letters* 33: 1905-1910.
- Díaz-Zorita M., Fernández-Canigia M.V., Bravo O.A., Berger A., Satorre E.H. (2015). Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. In: Cassán F.D., Okon Y., Creus C.M. (Eds.) *Handbook for Azospirillum*. Springer Int. Publishing. Suiza: Pp. 435-445.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. (2003). Plant

- growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107-149.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2015). World fertilizer trends and outlook to 2018. Roma, Italia. 66 p. En: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/db95327a-5936-4d01-b67d-7e55e532e8f5/>, consulta: noviembre 2018.
- Fontana C.A., Salazar S.M., Bassi D., Puglisi E., Lovaisa N., Toffoli L.M., Pedraza R., Cocconcell P.S. (2018). Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* REC3, Isolated from Strawberry Plants. *Genome Announcements* 6 (8): e00089-18-n/a. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00089-18>.
- Glick B.R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica, Canadá.
- Guerrero-Molina M.F., Lovaisa N.C., Salazar S.M., Díaz-Ricci J.C., Pedraza R.O. (2013). Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3 assessed by scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Plant Biology* 16: 726-731.
- Kirschbaum D. (1999). Efecto de *Azospirillum* sobre la productividad del cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.). En: *Biología del Suelo Fijación Biológica de Nitrógeno*. Stegmayer A.R.; Pernasetti D.S., Gómez Bello C. (Eds.). Universidad de Catamarca. Argentina. Pp. 165-167.
- Kirschbaum D.S., Mamana R. (2008). Present and future of the strawberry industry in Argentina. VI International Strawberry Symposium. Huelva, España. P. 429.
- Kirschbaum D.S., Jerez E.F., Salazar S.M., Borquez A.M., Meneguzzi N.G., Agüero J.J., Conci V.C., Conci L.R., Salame T.P., Santos B.M. (2014). Causes of non-marketable fruit production throughout the strawberry harvest season in subtropical environments. *Acta Horticulturae* 1049: 887-892.
- Kirschbaum D.S., Vicente C., Cano T.M., Gambardella M., Veizaga-Pinto F.K., Antunes L.E. (2017). Strawberry in South America: from the Caribbean to Patagonia. *Acta Horticulturae* 1156: 947-956.
- Kirschbaum D.S., Heredia A.M., Funes C.F., Quiroga R.J. (2019). Efectos de aplicaciones de bioestimulantes en el rendimiento y la calidad del cultivo de frutilla o fresa. *Horticultura Argentina* 38 (95): 25-40.
- Kirschbaum D. (2020). Frutillas y actualidad. En: <https://www.infocampo.com.ar/las-claves-del-inta-para-producir-frutillas-de-calidad-todo-el-año>, consulta: abril 2021.
- Larson K.D. (1994). Strawberry. En: *Handbook of environmental physiology of fruit crops*. Schaffer B., Andersen P. (Eds.). CRC Press: Boca Raton, Florida. EEUU. Pp. 271-297.
- Lovaisa N.C., Guerrero Molina M., Delaporte-Quintana P., Salazar S. (2016). Short communication. Total and marketable fruit yield of strawberry plants grown under different levels of nitrogen fertility and inoculated with *Azospirillum brasilense* REC3. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 36 (1): 43-46.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. (2018). Argentina es el tercer país productor de frutillas de sudamérica. En: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-argentina-es-el-tercer-pais-productor-de-frutillas-de-sudamerica>, consulta: noviembre 2020.
- Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33 (197): 1-16.
- Palencia P., Martínez F., Medina J.J., Medina J.L. (2013). Strawberry yield efficiency and its correlation with temperature and solar radiation. *Horticultura Brasileira* 31: 93-99.
- Pedraza R.O., Motok J., Tortora M.L., Salazar S.M., Díaz-Ricci J.C. (2007). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. *Plant and Soil* 295: 169-178.
- Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Díaz Ricci J.C. (2010). Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 265-272.
- Pedraza R.O., Filippone M.P., Fontana C., Salazar S.M., Ramírez-Mata A., Sierra-Cacho D., Baca B.E. *Azospirillum*. (2020). En: *Beneficial microbes in agro-ecology*. Amaresan N., Senthil Kumar M., Annapurna K., Kumar K., Sankaranarayanan A., (Eds.). Elsevier Inc; Londres, Reino Unido. Pp. 73-105.
- Pešaković M., Karaklajić-Stajić Ž., Milenković S., Mitrović O. (2013). Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and soil microorganisms. *Scientia Horticulturae* 150: 238-243.
- Rodríguez G., Pérez D., Paredes V. (2009). El cultivo de frutilla en Tucumán: superficie implantada, rendimientos, destino de la producción, precios y gastos de producción. *Reporte Agroindustrial EEAOC* 32: 1-6.
- Rodríguez G., Pérez D., Paredes V., Lobo R. (2020). Actividad comercial del cultivo de frutilla en la Argentina y Tucumán, campaña 2019. *Reporte Agroindustrial. Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos EEAOC. RA N° 168. ISSN 2346-9102*. En: <https://www.eeaoc.gob.ar/?publicacion=ra-194-actividad-comercial-del-cultivo-de-frutilla-en-la-argentina-y-tucuman-campana-2019>, consulta: abril 2021.
- Salazar S.M., Toffoli L.M., Tortora M.L., Kirschbaum D.S., Pedraza R.O. (2011). Efecto de la Inoculación con *Azospirillum brasilense* en la Producción de

- Frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.). Ciencia 6: (22): 103-111.
- Salazar S.M., Lovaisa N.C., Guerrero-Molina M.F., Ragout A.L., Kirschbaum D.S., Díaz-Ricci J.C., Pedraza R.O. (2012). Comunicación breve. Rendimiento frutal de plantas de fresa inoculadas con *Azospirillum brasilense* RLC1 y REC3 en condiciones de campo. Revista Agronómica del Noroeste Argentino 32 (1-2): 63-66.
- Tan Z.X., Lal R., Wiebe K.D. (2005). Global Soil Nutrient Depletion and Yield Reduction. Journal of Sustainable Agriculture 26 (1): 123-146.
- Toffoli L.M., Martínez-Zamora M.G., Medrano N.N., Fontana C.A., Lovaisa N.C., Delaporte-Quintana P., Elias J.M., Salazar S.M., Pedraza R.O. (2021). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in petunia with capacity to improve plant growth and flowering. Journal of Basic Microbiology 1-12.
- Tortora M.L., Díaz-Ricci J.C., Pedraza, R.O. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Archives of Microbiology 193 (4): 275-286.
- Undurraga P., Vargas S. (2013). Manual de frutilla. Boletín INIA N° 262. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Nasrullah B.A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability - A Review. Molecules 21 (5): 573.
- Von Bernard T. Obschatko. (2003). Estudios agroalimentarios. Componente A: fortalezas y debilidades del sector agroalimentario. Documento 8. Frutas Finas. IICA: Argentina.
- Zuccardi R.B., Fadda G.S. (1985). Bosquejo agrológico de la provincia de Tucumán. Miscelánea N° 86. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia. Argentina.